

*Estrés oxidativo y fibrogénesis en la  
diabetes mellitus tipo 1:  
Influencia del control glucémico y del  
consumo de tabaco*

*Memoria presentada por*

*Lilliam Flores Meneses*

*Para optar al grado de doctor en Medicina y Cirugía*

*Barcelona, 15 de Diciembre de 2005.*

*“Saber no es suficiente, debemos aplicar.  
Desear no es suficiente, debemos hacer.”  
Johann Wolfgang von Goethe*

*A mi madre “La Emerita”*



---


## Agradecimientos

## Abreviaturas


<b>Introducción teórica.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.....</b>	<b>2</b>
1.1    Incidencia y Prevalencia de la diabetes mellitus tipo 1 y 2.....	2
1.2    Epidemiología de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.....	4
1.2.1    Complicaciones microvasculares.....	4
1.2.1.1    Retinopatía.....	4
1.2.1.2    Nefropatía.....	5
1.2.1.3    Neuropatía.....	6
1.2.2    Complicaciones macrovasculares.....	7
<b>2. Factores implicados en la aparición de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.....</b>	<b>8</b>
2.1    Hiperglucemia.....	8
2.2    Hipertensión.....	14
2.3    Dislipemia.....	22
2.4    Consumo de tabaco.....	26
<b>3. Mecanismos patogénicos de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.....</b>	<b>30</b>
3.1    Vía de los polioles.....	31
3.2    Productos finales de glicosilación avanzada.....	34
3.3    Estrés oxidativo .....	37
3.3.1    Bioquímica y origen de los RLO.....	37
3.3.2    Mecanismo de defensa antioxidante .....	39
3.3.3    Cuantificación y caracterización del EO.....	40
3.3.3.1    Aldehídos, sutancias TBARS, dienes conjugados...41	
3.3.3.2    Isoprostanos .....	43
3.3.3.3    Oxidación proteica, DNA.....	51
3.3.3.4    Capacidad antioxidante .....	53

---

3.3.4	Papel del estrés oxidativo en las complicaciones de la diabetes mellitus .....	54
3.4	Activación de la Proteína Kinasa C .....	58
<b>4.</b>	<b>Mediadores del daño inducido por la hiperglucemia.....</b>	<b>61</b>
4.1	Factor de crecimiento del endotelio vascular.....	61
4.2	Factor de crecimiento epidermal.....	63
4.3	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas .....	63
4.4	Factor transformador del crecimiento $\beta_1$ .....	65
4.4.1	Acción fibrogénica .....	67
4.4.2	Acción inmunológica.....	71
	<b>Justificación e hipótesis.....</b>	<b>73</b>
	<b>Objetivos .....</b>	<b>78</b>
	<b>Control Glucémico</b>	
	<b>Objetivo .....</b>	<b>80</b>
1.	Justificación del objetivo .....	81
2.	Metodología general .....	84
3.	Desarrollo del objetivo .....	89
4.	Resultados .....	91


 “*F<sub>2</sub> isoprostanes is already increased at the onset of type 1 diabetes mellitus: Effect of glycaemic control*”

*Metabolism 2004;53:1118-1120.*


 “*Transforming growth factor  $\beta_1$  at onset of type 1 diabetes mellitus. A pilot study*”

*Diabetic Medicine 2004;21:818-822.*

---

 “The effect of improved metabolic control on transforming growth factor  $\beta_1$  at onset of type 1 diabetes mellitus”


*38<sup>th</sup> Annual Meeting of the EASD,  
Budapest, Sep-5, 2002.*

 “El factor beta de transformación del crecimiento ( $TGF\beta_1$ ) y control glucémico: Efecto de la insulinización en el debút de la diabetes mellitus tipo 1”


*XIV Congreso de la Sociedad Española de Diabetes,  
Cadiz, del 22 al 25 de Marzo de 2002.*

## **Consumo de tabaco**

<b>Objetivo</b> .....	98
1. Justificación del objetivo.....	99
2. Metodología general.....	101
3. Desarrollo del objetivo .....	103
4. Resultados .....	104


 “The effect of smoking and its cessation on 8-epi- $PGF_{2\alpha}$  and transforming growth factor  $\beta_1$  in type 1 diabetes mellitus”

*Diabetic Medicine 2004;21:285-289.*

 “The effect of smoking on transforming growth factor  $\beta_1$  levels and lipid peroxidation in diabetes mellitus”

*35<sup>th</sup> Annual Meeting of the EASD,  
Brussels, 28 Sept- 2 Oct. de 1999*

---

 “Cessation smoking decrease transforming growth factor  $\beta_1$  plasma and urinary levels in patients with type 1 diabetes mellitus”

37<sup>th</sup> Annual Meeting of the EASD, Glasgow,  
9 Sep -13 Sep de 2001.

<b>Discusión</b> .....	110
<b>Conclusiones</b> .....	120
<b>Bibliografía</b> .....	122



## **Agradecimientos**

---

Escribir una tesis es una tarea complicada o al menos resultó serlo para mí. No sé si habré logrado un balance justo entre la exactitud y la claridad de los argumentos o entre el atractivo y la importancia del tema expuesto, así como un nivel de exposición que haya hecho este trabajo accesible a todos. Si este balance se obtuvo, será en gran medida gracias a un número de personas que han influido en mi formación.

Debo mi fascinación por este tema al Dr. Enric Esmatjes, mi director de Tesis, quién demostró desde su inicio confianza en mí y en este proyecto. Quiero expresarle mi agradecimiento por sus constantes consejos fruto de su experiencia y sobre todo por su dedicación absoluta para que este trabajo saliera adelante.

A mi co-director de tesis Alex Cases agradecerle también su confianza en mí y por todas sus sugerencias e ideas que han guiado siempre el progreso de esta tesis y de las que tanto provecho he sacado.

Quiero agradecer a todos los miembros del servicio de Endocrinología y de la Unidad de Investigación de Diabetes del Hospital Clinic por su acogida desde el primer momento y el apoyo recibido durante todos los años en que forme parte del mismo. Agradezco al profesor Enric Vilardell y al Dr Ramón Gomis la oportunidad de vivir esta grata experiencia, profesional y humana en el Servicio de Endocrinología.

Desde la residencia hasta mis años de becaria he tenido la suerte y satisfacción de conocer y de trabajar con personas que me han ayudado en la consecución de esta tesis, por lo que quiero manifestarles mi profundo agradecimiento a todos los que, directa o indirectamente, han contribuido al resultado de este trabajo, ya que el hecho de exponer una lista de personas siempre supone el riesgo de olvidar a algunas de ellas.



A Rosa María le agradezco sinceramente su invaluable contribución a este trabajo, por su ayuda experta en la revisión gramatical de ésta Tesis.

Agradezco también a mi nueva familia laboral, que han vivido conmigo mis ilusiones, mis desganas, mis agobios y mi alegría, mostrándome en todo momento una comprensión paciente y un constante apoyo, que ha posibilitado que esta Tesis Doctoral, viera la luz.

Finalmente, agradecer a mis padres (Emerida y Enrique) y a mis hermanos (Ileana, Virna y Enrique). En particular a mi madre que en la distancia siempre me acompaña y que con la terminación de este trabajo elimino su preocupación ya que pasaban los años y el final de la Tesis no acababa de llegar.

---

## **Abreviaturas**

	Publicación en revista indexada
	comunicación en congreso
<b>ADA</b>	<i>American Diabetes Association</i>
<b>DM</b>	diabetes <i>mellitus</i>
<b>DM1</b>	diabetes mellitus tipo 1
<b>DM2</b>	diabetes mellitus tipo 2
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>UKPDS</b>	The United Kingdom Prospective Diabetes Study
<b>DCCT</b>	The Diabetes Control and Complications Trial
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	hemoglobina glucosilada A <sub>1c</sub>
<b>EC</b>	enfermedad coronaria
<b>CV</b>	cardiovascular
<b>ND</b>	nefropatía diabética
<b>EUA</b>	excreción urinaria de albumina
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>IECAs</b>	inhibidores de la enzima convertora de la angiotensina II
<b>ARA II</b>	antagonista de los receptores AT <sub>1</sub> de la angiotensina II
<b>DAG</b>	Diacélglicerol
<b>AGEs</b>	productos finales de glicosilación avanzada
<b>EO</b>	estrés oxidativo
<b>PKC</b>	proteína cinasa C
<b>RLO</b>	Radicales libres de oxígeno
<b>IsoP<sub>s</sub>-F<sub>2</sub></b>	Isoprostanos
<b>TGFβ<sub>1</sub></b>	Factor transformador del crecimiento beta 1

## **Introducción teórica**

## 1. Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus

### 1.1 Incidencia y prevalencia de la diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades con mayor repercusión socio-sanitaria, debido a su elevada prevalencia, al impacto de sus complicaciones crónicas y a la alta mortalidad que conlleva. A nivel mundial, la prevalencia de DM diagnosticada ha aumentado drásticamente en los últimos 40 años. En 1985 había aproximadamente 30 millones de personas afectas de DM, en 1995 este número se incrementó, afectando a 135 millones (4% de la población mundial), y para el 2025 las proyecciones estiman que su prevalencia aumentará un 42%, afectando a 300 millones de personas ( 5,4 % de la población mundial). Más del 90 % de los casos serán DM tipo 2 (DM2), esperándose que la incidencia de DM tipo 1 (DM1) permanecerá estable. En el 2025, los países con mayor número de personas afectas de DM serán la India (>57 millones; prevalencia del 6%), China ( > 37 millones; prevalencia de 3,4%) y los Estados Unidos (> 21 millones; prevalencia de 8,9%) (1)

Actualmente, en España, se dispone de estudios epidemiológicos con datos fiables sobre la epidemiología tanto de la DM1 como de la DM2. La prevalencia de la DM2 conocida e ignorada, varía dependiendo de la población estudiada y de la edad, habiéndose descrito desde un 5,5 % en la población de la Cerdanya (Cataluña) hasta un 18,7 en el estudio Guía efectuados en población Canaria, utilizando los criterios diagnósticos de la OMS propuestos en 1985. (En la tabla 1, se resumen los estudios realizados en España) (2).

**Tabla 1:** Prevalencia de la DM2 e intolerancia a la glucosa en España

Autor, año	Área	Edad (años)	Muestra	Prevalencia DM2	Prevalencia TAG	Criterios diagnósticos
Franch J (3), 1992	León	>18	572	5,6%	10,3%	1985
Bayo J (4), 1993	Lejona	>30	862	6,4%	10,4%	1985
Vila L (5) 1994	Cerdaña	>6	692	5,5%	No	1985
Muñiz J (6), 1995	Galicia	40-69	1275	7,5%	No	1985
Tamayo B (7),1997	Aragón	10-74	995	6,1%	7,2%	1985
Castell C (8), 1999	Cataluña	30-89	3839	10,3%	11,9%	1985
Botas P,(9) 2001	Asturias	30-75	1034	9,9%	13,2%	1985
De Pablos P(10), 2001	Canarias	>30	691	15,9%	17,1%	1997
Masía R(11), 2004	Girona	25-74	1748	10,0%	8,6%	1997

Adaptada de la referencia 2

De entre estos estudios destaca el estudio REGICOR (11), que ha sido recientemente publicado y utiliza los criterios diagnósticos de la DM propuestos por la ADA en 1997 (12), y evalúa la prevalencia de DM2 en la provincia de Girona (Cataluña), describiendo una prevalencia de DM estandarizada para edad del 10% ( 95% IC 9,6-10,5 ). Con relación a la DM1 en España, el único estudio de prevalencia fue publicado en 1987 de los resultados de la Encuesta Nacional de Salud elaborada por el Ministerio de Sanidad y Consumo, que aunque no especifica el tipo de DM, el margen de edad restringe los casos prácticamente sólo a la DM1. En este estudio la prevalencia declarada en personas de 1 – 15 años fue del 0,3% (13).

La incidencia de la DM2 es difícil de establecer debido a que esta enfermedad tiene una primera fase en la que su curso es silente. En estudios europeos, la incidencia de DM2 varía entre 1,2 y 4,1 casos/1000 personas año (14;15). En la población española los datos de la incidencia de la DM2 se han obtenido principalmente de los resultados de una segunda prueba de tolerancia a la glucosa (TTOG) practicada en la población de Lejona (Vizcaya) que había participado 10 años antes en el estudio de prevalencia de DM2. Se observó una incidencia acumulada de DM2 de 8 casos por 1000 habitantes y 10 años, lo que la sitúa por debajo del 1% anual (16). En este estudio, como era de esperar, la edad se confirma como un factor de riesgo muy importante mostrando un mayor incremento después de los 60 años de edad. Por lo tanto, si la expectativa de vida continúa aumentando, también lo hará la incidencia de DM2 en los próximos años.

En España, los datos de incidencia de la DM1, se obtienen principalmente del registro en Cataluña, en el que desde 1987 se registran anualmente todos los casos de DM1 diagnosticados de edad entre 0-29 años. Los primeros datos que se publicaron son del período de 1987-1990, sobre la población de toda la comunidad autónoma < 30 años ( 2.690.394 habitantes). Se estableció una incidencia de nuevos casos de DM1 en el grupo de edad de 0 a 14 años del 11,3/100.000 habitantes año (IC del 95%, 10,3-12,4%) y para el grupo de 15-29 años de 9,9/100.000 habitantes/año (IC del 95% 9,8-10,8%). La incidencia fue mínima entre los 0-5 años y máxima entre los 13-14 años. No se observó diferencia en la incidencia por sexos entre los 0 a 14 años, mientras que entre los 15 y 30 años, se observa un claro predominio de varones. Al igual que en otros países, la incidencia de DM1 sigue un patrón estacional, con picos de incidencia en los meses fríos del año (17). Otros estudios realizados en Madrid (18), Navarra

(19), Extremadura (20) y Canarias (21) incluyendo también el grupo de edad 0-14 años, muestran resultados similares. Merece una descripción especial los resultados acerca de la incidencia de la DM1 en Málaga, publicados en el 2002 y que describen entre el período de 1997-2001, los niveles de incidencia más elevados en España con un 20,8 por 100.000 habitantes /año (22).

## **1.2 Epidemiología de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus**

La DM es un grupo heterogéneo de alteraciones metabólicas, caracterizadas principalmente por hiperglucemia como el resultado de un defecto en la secreción de insulina, en su acción o ambos, y por complicaciones crónicas específicas que incluyen las complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía), y el desarrollo precoz de la enfermedad aterosclerótica macrovascular (enfermedad cardíaca, cerebral y la enfermedad vascular periférica).

### **1.2.1 Complicaciones microvasculares**

En la actualidad, en los países industrializados, una de las causas principales de ceguera, de insuficiencia renal crónica terminal y de amputación no traumática es la DM, como consecuencia directa de las complicaciones microvasculares de la DM.

#### **1.2.1.1 Retinopatía**

La retinopatía se presenta en todas las formas de DM y, como en todas sus complicaciones específicas, el desarrollo de la retinopatía esta muy relacionado con la duración de la enfermedad (23;24). En la DM1, la historia natural de la retinopatía ha sido mejor definida al poderse determinar con exactitud el inicio clínico de la enfermedad. En general, la retinopatía no-proliferativa no aparece hasta después de 3-5 años. Después de 7 años aproximadamente el 50% de los pacientes con DM1 tienen algún grado de retinopatía detectable y después de 20 años del diagnóstico, prácticamente el 100% presentan retinopatía diabética (25). La historia natural de la retinopatía en la DM2 es más difícil de definir, debido a que la DM2 esta presente muchos años antes de ser diagnosticada. Por ello, al diagnóstico de la enfermedad un porcentaje no despreciable de pacientes con DM2 ya presentan retinopatía e incluso, aunque con menor frecuencia presentan un grado avanzado de retinopatía, como ha sido evidenciado en el estudio "United Kingdom Prospective Diabetes Study" (UKPDS) en el que se estableció una



prevalencia de retinopatía en el momento del diagnóstico del 21% (26). La retinopatía afecta entre el 15-50% de los pacientes con DM2, siendo alrededor del 10% retinopatías proliferativas. El riesgo de retinopatía en la DM se relaciona también de manera directa con el grado de control de la hiperglucemia. El estudio “The Diabetes Control and Complications Trial” (DCCT) en pacientes con DM1 (27) y el UKPDS en DM2 (26) mostraron de manera concluyente que un mejor control de la glucemia puede disminuir la incidencia de retinopatía diabética. El DCCT demostró también que un estricto control de la glucosa retrasa la progresión de la retinopatía de fondo y la no proliferativa (28). Por lo tanto, la prevención primaria y la secundaria de la retinopatía pueden conseguirse efectivamente por un manejo estricto del control glucémico y por un cribaje oftalmológico regular.

### **1.2.1.2 Nefropatía**

La nefropatía diabética (ND) se desarrolla en aproximadamente el 35% de los pacientes afectados de DM1 y entre el 15 al 60% de los pacientes con DM2. Si no se trata de forma adecuada es una de las principales causa de insuficiencia renal crónica terminal, afectando a un tercio de los pacientes que reciben diálisis (29;30). Debido a que la prevalencia de la DM2 es 15 veces mayor que la DM1, no es de extrañar que entre el 60-90% de los pacientes diabéticos que inician programa de diálisis-transplante sean pacientes con DM2 (30;31). La historia natural de la ND ha sido caracterizada principalmente en pacientes con DM1 por el Dr. E Mogensen. Después de 7-13 años de evolución de la DM se desarrolla la nefropatía incipiente, caracterizada por la presencia de microalbuminuria [excreción urinaria de albúmina (EUA) > 30 mg/día o 20 µg/minuto] que es la manifestación clínica precoz de ND, cuya presencia indica un mayor riesgo de progresión a nefropatía establecida así como del desarrollo de eventos cardiovasculares. La ND establecida se inicia después de 10-20 años de DM y se caracteriza por un continuo incremento de la proteinuria clínica o macroalbuminuria (excreción urinaria de albúmina > 300 mg/día o 200 µg/minuto). En esta fase el filtrado glomerular inicia una disminución gradual y la presión arterial aumenta progresivamente, lo que condiciona la aparición de la insuficiencia renal crónica progresiva que conlleva a la insuficiencia renal terminal (32). De igual forma que con la retinopatía, el control estricto de la glucemia se ha demostrado que es de suma importancia como medida de prevención primaria contra el desarrollo de la ND.

En España se han realizado varios estudios sobre la prevalencia de las distintas fases de la ND. En las muestras estudiadas, la prevalencia de microalbuminuria es del 13-16% para la DM1 y del 23% para la DM; la proteinuria macroscópica es del 4,6% al 5% y la de insuficiencia renal del 4,8 al 8,4% (33-37).

### **1.2.1.3 Neuropatía**

De todas las complicaciones crónicas de la DM, la neuropatía diabética es la más frecuente, pero la menos conocida. Alrededor del 40% de los pacientes afectos de DM presentan algún tipo de alteración neuropática. La prevalencia varía mucho de unos estudios a otros, dependiendo de los criterios diagnósticos empleados y de la sensibilidad de las pruebas utilizadas. Su prevalencia aumenta con el tiempo de evolución. Así, el 50% de los pacientes con DM presentarían neuropatía con una evolución de la enfermedad de 25 años o más (38). El estudio UKPDS en pacientes con DM2, observó que más del 50% de los pacientes al momento del diagnóstico presentaban algún grado de neuropatía (26). En España, la prevalencia de neuropatía en DM1 ha sido descrita del 14% y en la DM2 del 30% (39). La detección precoz de la neuropatía disminuye las hospitalizaciones de pacientes con pie diabético y las amputaciones de extremidades inferiores, por lo que en ausencia de una clara evidencia, los consensos de expertos recomiendan anualmente que a todos los pacientes con DM se les realice un examen sensorial y la vigilancia de ulceraciones en los pies.

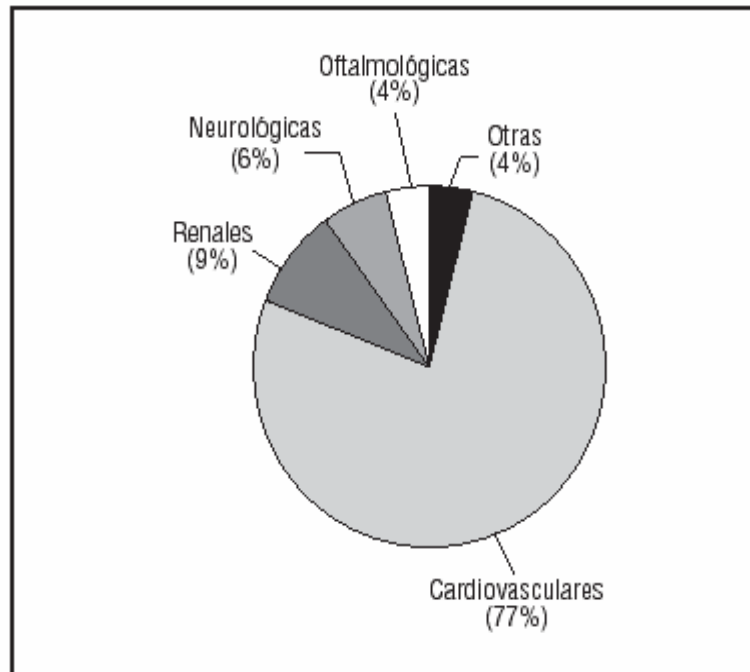
### **1.2.2 Complicaciones macrovasculares**

El estudio Framingham demostró que la presencia de DM incrementaba de manera significativa el riesgo cardiovascular (CV), principalmente en la mujer, confirmando a la DM como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de aterosclerosis (40). La enfermedad CV en pacientes con DM es la responsable de más del 80% de todas las muertes y del 75% de todas las hospitalizaciones, a expensas principalmente de la enfermedad coronaria (EC), seguida por los eventos vasculares cerebrales y periféricos (41). *Figura 1.* Con relación a la población general, los sujetos con DM2 tienen un riesgo relativo de desarrollar EC e insuficiencia cardíaca, entre 2-4 veces (42) y 2-5 veces (43) superior, respectivamente. Incluso los estados prediabéticos, como la intolerancia a la glucosa, se asocian a mayor mortalidad por EC (44;45). La DM es la causa más común de EC en personas jóvenes. Asimismo, más del 50% de los pacientes recién diagnosticados de DM2 tienen EC en el momento del diagnóstico de DM (41). Haffner et al (46), concluyó, basado en los resultados de un estudio poblacional finlandés, que los pacientes con DM2, que no han desarrollado aún EC presentan

el mismo riesgo de desarrollarla y una mortalidad similar a la de los individuos no diabéticos que ya la padecen. En el Joslin Diabetes Center se realizó un seguimiento prolongado de pacientes con DM1 que demostró un elevada mortalidad CV en comparación con la población general. Hasta pasados los 30 años de evolución de la DM, no se detectó un aumento de riesgo coronario en estos pacientes. Los primeros casos de EC se detectaron a finales de la tercera década o principios de la cuarta, independientemente de la edad de inicio de la DM. El riesgo de EC aumentó con rapidez después de los 40 años y, alrededor de los 55 años el 35% de los sujetos con DM1 habían fallecido de EC (47).

Los pacientes con DM tienen tres veces más riesgo de desarrollar accidentes cerebrovasculares (ACV) que la población general (48). En el estudio Honolulu Heart Program los pacientes varones con DM tenían el doble de riesgo de desarrollar ACV de origen tromboembólico que los pacientes no diabéticos, y este incremento en la incidencia fue independiente de otros factores de riesgo conocidos para el desarrollo de ACV. Además, en este estudio se observó que los pacientes que presentaban un ACV tenían más probabilidad de que tuvieran una DM2 no diagnosticada (49). Los pacientes con DM tienen menos probabilidad de sobrevivir a un ACV que los pacientes no diabéticos y más probabilidad de tener secuelas permanentes si sobreviven (50). En el estudio Framingham los sujetos con intolerancia oral a la glucosa tenían el doble probabilidad de presentar infartos cerebrales que los pacientes con normogluemia (40). La evidencia científica demuestra pues que la incidencia de ACV es mayor y que comporta un peor pronóstico en los pacientes con DM.

La enfermedad vascular periférica (EVP) es 4 veces más frecuente en pacientes con DM. La EVP en pacientes con DM involucra principalmente las arterias de las pantorrillas (arterias tibial y peroneal) y también tienen mayor dificultad para desarrollar circulación arterial colateral en las extremidades inferiores. Los síntomas incluyen claudicación intermitente, dolor de reposo en las extremidades inferiores, pérdida del vello en el dorso de los pies, frialdad distal y disminución o ausencia de pulsos periféricos (51).



**Figura 1.** Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus (adaptada de la cita 41)

## **2. Factores implicados en el desarrollo de las complicaciones crónicas en la diabetes mellitus.**

### **2.1 Hiperglucemia**

La relación causa-efecto entre la hiperglucemia crónica y las complicaciones microvasculares de la DM fue sugerida durante mucho tiempo por estudios experimentales y clínicos. En pacientes con DM1 los resultados del DCCT establecen de forma concluyente que el riesgo relativo para el desarrollo de las complicaciones diabéticas aumenta a medida que los niveles medios de HbA<sub>1c</sub> incrementan. En este estudio los pacientes con DM1 que recibieron tratamiento intensificado con insulina, mantuvieron un nivel de HbA<sub>1c</sub> un 2% menor que los que recibieron tratamiento convencional con insulina, y presentaron una reducción del 76% en la incidencia de la retinopatía, del 54% en la incidencia de la nefropatía y del 60% de la neuropatía (27). Después de los resultados del DCCT, no hay duda de que mantener los niveles de glucemia lo más cerca de la normalidad con el tratamiento intensificado con insulina disminuye el riesgo de las complicaciones microvasculares. Sin embargo, continua el debate sobre cual es el nivel de HbA<sub>1c</sub> óptimo en los pacientes con DM1, y si existe un umbral para

HbA<sub>1c</sub> por debajo del cual el riesgo de desarrollar complicaciones microvasculares es mínimo. Sucesivos análisis del grupo DCCT señalaron que no parecía que existiese un umbral por debajo del cual el riesgo de progresión de la retinopatía fuera eliminado, y han reiterado que el riesgo de progresión de la retinopatía, de desarrollo de microalbuminuria y neuropatía es continuo, aunque no lineal para los diferentes niveles de HbA<sub>1c</sub> (52). Recientemente, la publicación de la evolución de los pacientes que participaron en el estudio DCCT tras 8 años de finalizar el estudio, reafirman que el efecto beneficioso del tratamiento precoz intensivo con insulina, persiste para la EUA, lo que demuestra que retarda la progresión de la ND y disminuye la incidencia de hipertensión. Así como, en el desarrollo y progresión de la retinopatía (53;54).

El UKPDS en pacientes con DM2, al igual que los resultados del DCCT en pacientes con DM1, estableció la importancia del control intensivo de la hiperglucemia crónica en la reducción del riesgo de complicaciones microvasculares. Muchos de los estudios observacionales en pacientes con DM2, también sugerían una relación entre el control glucémico y las complicaciones diabéticas. Sin embargo, previo al estudio UKPDS, solo 2 estudios controlados y randomizados habían valorado el beneficio del control glucémico sobre la incidencia de las complicaciones microvasculares, con conclusiones variables. El primero de estos estudios fue el University Group Diabetes Program efectuado en pacientes con DM2, que no mostró un beneficio del control glucémico en estos pacientes. En este estudio, el tamaño de la muestra fue pequeño (200 pacientes) y en los años en que se realizó este estudio (publicado en 1970) aún no se disponía de la HbA<sub>1c</sub> como índice del control metabólico, de tal manera que la diferencia entre los pacientes del grupo de tratamiento intensivo y los otros grupos de tratamiento fue sólo de 30 mg de glucemia en ayunas. Sin embargo, el hallazgo más relevante de este estudio fue la observación de que el uso de sulfonilureas (tobultamida) y la biguanida (fenformina) para reducir la hiperglucemia se asociaba con un incremento de la mortalidad CV (55). El segundo estudio controlado fue publicado en 1995, realizado en una pequeña muestra (110 pacientes Japoneses) en el que se mostró que el tratamiento con múltiples dosis de insulina producía un mejor control glucémico (HbA<sub>1c</sub>=7,1) comparado con el tratamiento convencional (HbA<sub>1c</sub>=9,4%), y reducía significativamente las complicaciones microvasculares de la DM (56). La reducción del riesgo en este estudio fue similar al observado en pacientes con DM1 en el estudio DCCT, sugiriendo que el mecanismo principal de las complicaciones microvasculares en

DM2 es idéntico al de la DM1, es decir, la hiperglucemia. La DM2 tiene una naturaleza heterogénea, pudiendo variar la susceptibilidad a las complicaciones crónicas en función del grupo poblacional estudiado. En el UKPDS, la diferencia de 0,9% de HbA<sub>1c</sub> entre la terapia intensiva y la convencional fue suficiente para demostrar un beneficio en la retinopatía, nefropatía y la neuropatía. Estas complicaciones microvasculares disminuyeron en un 25% y mostraron una relación continua con la glucemia, de tal manera que por cada punto de disminución en la HbA<sub>1c</sub> (por ejemplo de 9 a 8%) hubo un 35% de reducción en el riesgo de complicaciones. Tanto para la retinopatía, como para la nefropatía, el beneficio del control glucémico fue mayor en los estadios precoces de la enfermedad (26). Los resultados de otros estudios son también interesantes, el estudio The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetes Retinopathy ha valorado sistemáticamente la importancia del control glucémico para el desarrollo de las complicaciones micro y macrovasculares en 1370 sujetos y demostró tras un seguimiento de 10 años, que el rango de progresión de la retinopatía incrementaba sustancialmente del menor al mayor cuartil de HbA<sub>1c</sub>, sugiriendo que la progresión de la retinopatía es dependiente del nivel de hemoglobina glicosilada, en donde 1% de incremento en los niveles de HbA<sub>1c</sub> resultaba en un 70 % de incremento en la retinopatía proliferativa y en un 20% de incremento de la proteinuria (57;58).

A pesar de que nadie duda de la relación de la hiperglucemia con el desarrollo de las complicaciones microvasculares de la DM, su asociación con las complicaciones macrovasculares es menos clara. En pacientes con DM1, existen pocos estudios prospectivos que evalúen la relación entre la hiperglucemia y la enfermedad CV, siendo sus resultados contradictorios ya que en algunos estudios se ha observado una asociación independiente, mientras en otros no. En el DCCT, a pesar de que se produjeron pocos eventos CV para extraer conclusiones sólidas, en el grupo de tratamiento intensivo los eventos CV se redujeron aunque no significativamente (41%) (59). Otro estudio prospectivo de 7 años de seguimiento mostró que el mal control glucémico ( HbA<sub>1c</sub> > 10.4%) es la principal variable asociada con EC después de ajustar para otros factores de riesgo CV (60). En el estudio Pittsburg Epidemiology of Diabetic Complications Study of type 1 diabetes (EDC), con 108 eventos CV ocurridos durante los 10 años de seguimiento, así como en el EURODIAB Complications Study, los resultados no demuestran a la HbA<sub>1c</sub> como predictor de futuros eventos CV (61;62). Por el contrario, el análisis anticipado del estudio EDC y los resultados del Wisconsin

Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy señalaron a la HbA<sub>1c</sub> como un factor predictor independiente de la EVP (63;64).

Los primeros estudios de la glucosa como factor de riesgo de complicaciones CV en pacientes con DM2, fueron publicados en 1965 en el Reino Unido (el estudio Bedford) (65) y en los Estados Unidos (estudio Tecumseh) (66). Estos análisis transversales sugerían que la elevación de la glucosa podría estar asociada con la mortalidad de origen CV y realmente el seguimiento de ambos grupos verificó esta hipótesis. En 1979 el International Collaborative Group publicó un meta-análisis de 11 estudios con un seguimiento entre 4–15 años sobre la glucosa como factor de riesgo CV, estos autores concluyeron que en los 11 estudios evaluados no se encontró una asociación consistente entre la hiperglucemia y la enfermedad CV. Probablemente ésta conclusión sea consecuencia de varios factores tales como un período corto de seguimiento, el pequeño tamaño de la muestra en algunos estudios o el menor grado de estandarización de las pruebas de tolerancia oral de la glucosa cuando se desarrolló el análisis (67). Desde 1993, algunos grandes estudios prospectivos en sujetos con DM2, han demostrado que el control glucémico es importante para el riesgo CV. El primer estudio de esta serie en demostrar una asociación positiva entre control glucémico y la enfermedad CV fue publicado por Uusitupa et al, en 1993, que estudiaron 133 sujetos con DM2 de edad media y de reciente diagnóstico, y observándose que la mortalidad CV a los 10 años de seguimiento era tres veces superior en el tercil mayor de glucosa y de HbA<sub>1c</sub> y que la hiperglucemia, valorada al tiempo del diagnóstico o a los 5 o 10 años continuaba siendo un predictor constante para la mortalidad CV a los 15 años de seguimiento (68). Estas observaciones fueron confirmadas por Kuusisto et al en un grupo de pacientes con DM2 de edad entre 65 y 74 años al inicio del estudio, en donde observaron que la HbA<sub>1c</sub> fue un predictor significativo no solo de la EC, sino también de los ACV fatales y no fatales (69;70). El estudio UKPDS incluyó 2693 sujetos con DM2 de reciente diagnóstico, de edad entre 25 y 65 años y mostró que el control intensivo de la hiperglucemia con sulfonilureas o insulina disminuye el riesgo de enfermedad macrovascular (infarto de miocardio fatal y no fatal y de muerte súbita), un 16% de reducción, aunque no alcanzó significación estadística ( $P=0.052$ ), por lo que este estudio se ha considerado como negativo para la asociación entre hiperglucemia y enfermedad CV. Solo el análisis del subgrupo pequeño en tratamiento con metformina (342 pacientes obesos) demostró que reducía el riesgo de infarto de miocardio, por lo que el tratamiento con

metformina es el fármaco de primera elección en los pacientes con DM2 y sobrepeso. Esta incapacidad del UKPDS para demostrar un beneficio del control de la hiperglucemia, probablemente este relacionado con el diseño del estudio o las propias limitaciones de la terapia estudiada o por la propia naturaleza multifactorial de la enfermedad CV, en donde otros factores como hipertensión, dislipemia o consumo de tabaco, contribuyen al desarrollo de aterosclerosis en pacientes con DM (71-73).

La DM2 está precedida por un período de tiempo variable de hiperglucemia asintomática, conocido como prediabetes, que fue por primera vez aceptado en 1980 cuando la OMS revisó los criterios diagnósticos para DM e intolerancia oral a la glucosa (IOG), definiendo a la IOG como una categoría intermedia entre la tolerancia normal de la glucosa y la DM. En este estadio prediabético, los niveles de glucemia en ayunas se mantienen cerca de la normalidad, mientras que los niveles de glucosa postprandial son ligeramente elevados. Varios estudios han descrito que los sujetos con IOG tienen un riesgo dos veces superior de enfermedad CV (74;75), así como, que al diagnóstico de la DM2 es ya frecuente la presencia de complicaciones CV (76). A pesar de lo dicho, queda aún por demostrar de manera concluyente el beneficio del control de la glucemia en la prevención de la enfermedad macrovascular en los pacientes con DM.

La tabla 2 muestra algunos estudios prospectivos que incluyen un gran número de sujetos con DM2 en los que se observa que el control glucémico es importante para el riesgo CV.

**Tabla 2:** Estudios prospectivos que demuestran una asociación entre los eventos CV y el control glucémico en pacientes con DM2

País	Año de publicación	Número de pacientes	Edad (años)	Duración del seguimiento	Evento final	Referencia
------	--------------------	---------------------	-------------	--------------------------	--------------	------------



(años)						
<b>Finlandia</b>	1993	133	45-64	10	Mortalidad CV	Uusitupa et al. (68)
<b>Finlandia</b>	1994	229	65-74	3.5	Mortalidad y morbilidad por EC	Kuusisto et al.(69)
<b>Finlandia</b>	1994	229	65-74	3.5	Incidencia de ACV	Kuusisto et al. (70)
<b>Suecia</b>	1995	411	23-94	7	Mortalidad y morbilidad por EC	Andersson and Svärdsudd (77)
<b>EEUU</b>	1995	1,370	>30	10	Mortalidad por EC e incidencia de ACV	Klein (58)
<b>Dinamarca</b>	1995	328	20-65	5	Mortalidad CV	Gall et al (78)
<b>Suecia</b>	1995	620	59-77	1	Mortalidad CV	Malmberg et al (79)
<b>Alemania</b>	1996	1,139	30-55	11	Incidencia de infarto de miocardio	Hanefeld et al. (80)
<b>Alemania</b>	1996	290	<76	10	Mortalidad CV	Standl et al (81)
<b>Finlandia</b>	1996	1,059	45-64	7	Mortalidad y morbilidad por ACV	Lehto et al. (82)
<b>Finlandia</b>	1997	1,059	45-64	7	Mortalidad y morbilidad por EC	Lehto et al (83)
<b>U.K.</b>	1998	2,693	25-65	8	Mortalidad y morbilidad por EC	Turner et al.(71)
<b>EEUU</b>	1998	471	25-64	7.5	Mortalidad CV	Wei et al (84)
<b>Dinamarca</b>	2003	160	48-62	8	Morbilidad y mortalidad CV	Gaede et al (85)

Adaptada de referencia (41)

## 2.2 Hipertensión

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo CV y de enfermedad renal, asociándose con elevada frecuencia a la DM y su prevalencia en la población con DM es mucho mayor que en la población general. La HTA es un determinante de la morbilidad y mortalidad asociada a la DM ya

que acelera el desarrollo de las lesiones tanto microvasculares (nefropatía y retinopatía) (86), como el desarrollo de aterosclerosis y sus manifestaciones de EC, ACV y EVP (87). La prevalencia de la HTA en la DM, así como el momento de su aparición a lo largo de la historia natural de la enfermedad, difieren según el tipo de DM. Dado que la frecuencia de DM2 es nueve veces superior al de la DM1 y que en la primera el riesgo de desarrollar HTA es también mayor, en números absolutos, la problemática de la HTA en la DM es mucho mayor en la DM2 (88).

En la DM1, la prevalencia de HTA es cerca del doble de la que se encuentra en la población general, dependiendo en gran parte de la presencia y grado de nefropatía diabética (89;90). Antes del desarrollo de la nefropatía, cuando los pacientes tienen una EUA normal o presentan una MIC persistente, lo habitual es que los niveles de presión arterial (PA) se encuentren dentro de los límites considerados normales. Cuando la proteinuria está presente, indicando que la nefropatía está establecida, un elevado porcentaje de pacientes son hipertensos, cifras que alcanzan prácticamente el 90% cuando se llega al estadio de insuficiencia renal. Los pacientes que no desarrollan ND permanecen normotensos a lo largo de la vida, a no ser que se asocie una HTA esencial (91;92). En la DM2, la prevalencia de HTA es muy elevada alcanzando con los criterios actuales valores > 80% a lo largo de la historia natural de la enfermedad. A diferencia de la DM1, el desarrollo de la HTA en los pacientes con DM2 es independiente de la presencia o no de la lesión renal, aunque el desarrollo de la nefropatía aumentará aún más la prevalencia de HTA. Además, estos pacientes presentan con mayor frecuencia otras alteraciones renales como son la pielonefritis crónica y la enfermedad vascular renal que pueden desarrollar o agravar la HTA.

En la patogénesis de la HTA en la DM existe una asociación de factores genéticos y adquiridos que intervienen en mayor o menor intensidad según cada caso. La importancia de cada uno de los factores implicados ya sean genéticos (93-95), celulares (96), metabólicos (97) y hemodinámicos (98), no está del todo aclarada, en parte por sus interrelaciones, que hacen difícil deslindar el peso específico de cada uno. Entre los factores genéticos se han implicado alteraciones de la actividad del cotransporte Na/Li y de la actividad del transportador Na/H *antiporter* (94;99). Se ha estudiado el polimorfismo I/D del gen de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA), comprobándose que el genotipo DD confiere mayor riesgo CV (100). Los factores fetales también pueden influir, ya que se ha visto que el retraso del crecimiento intrauterino predispone al

desarrollo de HTA y DM (101). Entre los factores ambientales, la obesidad y el consumo excesivo de sal son los más importantes en la DM2 y entre los factores metabólicos, la hiperglucemia y la hiperinsulinemia. La hiperglucemia aumenta la reabsorción de sodio en el túbulo proximal por un mecanismo insulino dependiente que se acompaña de mayor reabsorción de agua en el segmento distal, aumentando el volumen extracelular (102). La hiperinsulinemia por su parte, ocasiona hiperactividad adrenérgica (103), aumenta la reabsorción de sodio en el túbulo distal (104), incrementa la proliferación celular, produce disfunción endotelial que contribuye al aumento de las resistencias periféricas y reduce la distensibilidad vascular (105). Aunque en el desarrollo de la HTA, los factores metabólicos son de gran importancia, el efecto de esta alteración metabólica se manifiesta a través de las repercusiones sobre el riñón y los vasos.

La HTA en los pacientes con DM tiene algunas características que aunque no son específicas, se presentan con mayor frecuencia en estos pacientes. Una de las principales características es la tendencia a una mayor elevación de la PA sistólica sobre la diastólica, con una elevada prevalencia de la llamada hipertensión sistólica aislada y una presión del pulso aumentada que es una consecuencia de la severa afectación de la distensibilidad de los grandes vasos. El ortostatismo, debido a la neuropatía autonómica subyacente también es frecuente. Un aspecto recientemente detectado con la introducción de los equipos automáticos para la monitorización ambulatoria de la PA ha sido las alteraciones de la variabilidad circadiana que puede ser un factor de mayor gravedad o incluso un factor patogénico del daño vascular y/o renal. Lurbe et al, observaron en un grupo de pacientes con DM1, que la atenuación de la caída fisiológica de la PA se asocia con el desarrollo de microalbuminuria, así como también demostró que, aún en el rango de normotensión, existen diferencias de PA nocturna entre el grupo de pacientes con normoalbuminuria y los microalbuminúricos, con niveles más altos en los últimos (106). Además, se ha descrito que la EUA tiene una mejor correlación con la PA sistólica nocturna y con la mayor variabilidad de la PA diurna (107).

Ya se ha comentado el mayor riesgo CV y/o renal de los pacientes con DM comparados con la población general no diabética, y diversos estudios de intervención han demostrado el gran beneficio que se consigue con el control de la PA. Así, el adecuado control de la PA reduce las complicaciones CV y/o renales asociadas a la DM en magnitud comparable, cuando no superior, a las que se consiguen con el correcto control metabólico. Además, los estudios de

intervención nos han proporcionado información referente a los valores de PA que deben alcanzarse con el tratamiento antihipertensivo, y el beneficio del tratamiento de la HTA sistólica aislada. Los resultados de estos estudios prospectivos, randomizados, han contribuido a que el objetivo de tratamiento para los pacientes con DM haya disminuido progresivamente desde 1990, tanto para los niveles de PA sistólica como diastólica. Actualmente, el objetivo de la PA del tratamiento antihipertensivo es una presión arterial media casual  $\leq 130/80$  mmHg para todos los pacientes que pueden tolerar esta reducción de la PA sin presentar efectos secundarios. Aún no se ha establecido, cual es la definición de normalidad para la monitorización de la presión arterial ambulatoria en pacientes con DM, a pesar del cual, la incorporación de este sistema de medida de la PA es de gran utilidad en el detección de las alteraciones del perfil durante 24 horas de la PA en este grupo poblacional (108;109).

Aunque existen algunos estudios de intervención realizados específicamente en población diabética, la mayor parte de ellos se han realizado en población hipertensa en general, que incluía un número de pacientes con DM2 o tanto pacientes con DM1 y DM2 sin diferenciarlos específicamente, pero que han permitido realizar el análisis por separado entre población con DM y población general no diabética. Los resultados de estos análisis muestran que el beneficio de la reducción de la morbimortalidad CV en los pacientes con DM es superior a la obtenida en los pacientes no diabéticos con la misma clase y duración del tratamiento hipotensor. Sin pretender revisar todos los estudios realizados en población con DM, me centraré en aquellos grandes ensayos clínicos, que por el diseño (carácter prospectivo, grandes muestras, seguimiento prolongado, aleatorización, doble ciego de los tratamientos...), han aportado datos de suficiente calidad para la obtención de recomendaciones en el manejo del paciente hipertenso con DM. En pacientes con DM1 los primeros ensayos clínicos se han enfocado en la protección del riñón, abundando las publicaciones sobre la regresión farmacológica de la microalbuminuria con el objetivo de preservar la función renal y retardar la progresión de microalbuminuria a proteinuria. Lewis et al, demostraron por primera vez el efecto renoprotector de los IECAs en el *Collaborative Study* que analizó los datos de un gran número de pacientes con DM1 (207 pacientes recibieron captopril y 202 recibieron placebo) en los que el tratamiento con captopril se asoció a un 50% de reducción en el riesgo del evento final combinado (muerte, diálisis y transplante), e incluso un mayor beneficio fue observado en aquellos pacientes cuyo nivel de creatinina

basal fue >1,5 mg/dl (110). Varios estudios en pacientes con DM1 también han confirmado que el tratamiento intensivo de la hipertensión (independientemente del agente antihipertensivo utilizado) permite la remisión de los niveles de EUA, incluso en niveles de rango nefrótico (111;112). En un estudio posterior del *Collaborative Study* con ramipril, Lewis et al, demostraron que un nivel de PA media de 92 mmHg o menor se asociaba con una disminución significativa en los niveles de excreción de proteinuria (de 1,043 mg/día a 535 mg/día), 32 de los 126 pacientes alcanzaron al final del estudio una excreción de proteinuria total menor de 500 mg/día, demostrando este estudio que el control estricto de los niveles de PA junto con una combinación de IECAs puede lograr una remisión o aparente remisión de la ND (113). Actualmente existe evidencia de que pacientes con DM1 y ND incipiente, incluso con normotensión se benefician del tratamiento con IECAs. El meta-análisis realizado por el “*Diabetic Nephropathy Trialist Group*” establece de manera definitiva que en pacientes normotensos con DM1 y microalbuminuria, los IECAs reducen significativamente la progresión a macroalbuminuria y aumentan la posibilidad de regresión de la lesión renal (114). Aportando evidencia de que los IECAs tienen efectos adicionales al hemodinámico, ya que los cambios en los niveles de PA que se observan con estos agentes, no explican completamente el efecto antiproteinurico de esta clase de fármacos.

En pacientes con DM2, uno de los estudios más significativo es el subestudio del UKPDS que incluyó a 1148 pacientes con DM2 de reciente diagnóstico, que tenían unos niveles de PA de 160/94 mmHg y fueron randomizados ó al grupo con control de la PA estricto (n=758) ó al grupo con cuidado habitual de la PA (=390). En el grupo de control estricto, 400 pacientes recibieron tratamiento con captopril y 358 con atenolol que es un bloqueador  $\beta_1$  selectivo. La diferencia obtenida de los niveles de PA entre los dos grupos fue de 10/5 mmHg (144/82 vs. 154/87 mmHg), un descenso de los niveles de PA, suficiente para demostrar un beneficio importante con una reducción en el grupo de tratamiento estricto del 44% de los ACV, del 56% de la insuficiencia cardiaca, del 34% en la retinopatía, del 37% de la enfermedad microvascular (sobre todo a expensas de una reducción de la fotocoagulación retiniana) y del 32% de todas las muertes relacionadas con la DM, a pesar de que los valores de PA obtenidos en este grupo fueron muy superiores a los que se recomiendan actualmente (76;115).  
Tabla 3.

**Tabla 3:** Subestudio del UKPDS, el efecto es expresado como reducción porcentual del riesgo (control estricto frente a moderado).

	Control Riesgo	Glucémico* p	Control Riesgo	P. arterial** p
Mortalidad global	-6%	0,44	-18%	0,17
Mortalidad por DM¶	-10%	0,34	-32%	0,01
Morbilidad por DM#	-12%	0,03	-24%	0,04
Morbilidad microvascular†	-25%	<0,002	-37%	<0,002
IAM	-16%	0,05	-21%	0,13
ACV	+11%	0,52	-44%	0,01
Vasculopatía periférica‡	-35%	0,15	-37%	0,17

¶: incluye muerte súbita o por IAM, vasculopatía periférica, ACV, fallo renal, hipoglucemia o hiperglucemia. #: incluye muerte súbita, muerte por hipo e hiperglucemia, IAM, angina, fallo cardíaco, ACV, fallo renal, amputación, hemorragia vítrea, fotocoagulación retiniana, ceguera, faquectomía. †: incluye retinopatía con fotocoagulación, hemorragia vítrea y fallo renal, IAM: incluye casos mortales y no mortales, y muerte súbita. ACV: incluye casos mortales y no mortales. (-): Reducción. (+) Incremento. (\*): HbA<sub>1c</sub> 7,0% frente a 7,9%. (\*\*): PA sistólica /diastólica 144/82 mmHg frente a 154/85 mmHg. (76;115)

El estudio HOT (Hypertension Optimal Treatment) analizó cual es el nivel óptimo de reducción de los valores de la PA para conseguir una mayor reducción de la morbilidad y mortalidad CV. En este estudio se incluyeron 18.000 pacientes, observándose que la reducción de la PA diastólica conseguía reducir la morbilidad CV, pero que valores inferiores a 83 mmHg no implicaban un mayor beneficio. Sin embargo, el subanálisis de los 1.501 pacientes diabéticos incluidos mostraba que una reducción de la PA diastólica < 80 mmHg continuaba reduciendo el riesgo CV en este grupo poblacional (116). En prevención primaria recientemente se ha publicado, el estudio Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT). En este estudio se evaluó en 1204 pacientes con DM2, hipertensos con EUA normal, el efecto de 2 mg/día de un IECA el trandolapril más 180 mg/día de verapamilo (que es un bloqueador de los canales de calcio no dihidropiridínicos, en su formulación de liberación sostenida), frente a trandolapril solo (2 mg/día), verapamilo solo (en su formulación sostenida de 240 mg/día) y un grupo control con placebo. Se podía utilizar en el estudio otros fármacos hipotensores para obtener unos niveles de PA < 120/80 mmHg. Con un seguimiento de 3,6 años, trandolapril + verapamilo y trandolapril solo, retraso el inicio de microalbuminuria por un factor de 2,6 y 2,1 veces, respectivamente (117).

En los últimos años los resultados de varios estudios específicamente diseñados en población hipertensa con DM2, han evaluado la regresión farmacológica de la microalbuminuria (prevención secundaria), la disminución de la EUA así como, variables de morbimortalidad. Nos referimos al estudio IDNT (Irbesartan Diabetic Nephropathy Study) (118), el RENAAL (Reduction of Endpoints in NIDDM with the AII Antagonist Losartan) (119), el IRMA II (Irbesartan Microalbuminuria Type II Diabetes Mellitus in Hypertensive Patients) (120) y al estudio LIFE (Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension) (121). En la tabla 4 se muestra los resultados de los estudios con ARAII en pacientes con Nefropatía diabética establecida.

**Tabla 4:** Principales resultados de estudios con ARA II en pacientes hipertensos con DM2. Resultados expresados como reducciones porcentuales del riesgo

Riesgo (%)		Creat x2	Proteinuria	IRT	Mortalidad	Eventos CV
	IRB frente a C	-29*	-33	23*	-8	-9
IDNT	IRB frente a AML	-39*	-10	0	-12	-12
	AML frente a C	+15	-6	23*	+4	-3
RENAAL		-25*	-35*	-28*	+2	-10

\*:Diferencias estadísticamente significativa. IRB: irbesartán. AML: amlodipino. C: grupo control. Creat x2: tiempo hasta doblar el valor basal de creatinina. IRT: insuficiencia renal terminal. (+) Incremento del riesgo. (-): Disminución del riesgo(118;119).

Estos grandes ensayos clínicos han demostrado el beneficio del control estricto de la HTA en el paciente con DM, en donde el efecto del control de los niveles de PA sobre las complicaciones microvasculares es comparable con el obtenido con el control glucémico estricto, y superior a este, al considerar la morbilidad CV. También el beneficio del control de la PA es mayor en los pacientes hipertensos con DM respecto a los pacientes hipertensos no diabéticos. En la actualidad, el tratamiento antihipertensivo es la principal herramienta de la renoprotección, particularmente desde la introducción hace más de 20 años, de los agentes que bloquean el sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) en la que se ha realizado un avance en retrasar la progresión del deterioro de la función renal tanto en la enfermedad renal no diabética como de la ND. Algunos grandes ensayos clínicos sugieren que la eficacia renoprotectora del bloqueo del SRAA, no

solo es debido al hecho de que los bloqueadores del SRAA son eficaces agentes hipotensores en la población renal, sino también a propiedades renoprotectoras de este bloqueo. Como he descrito, en pacientes con DM1 se ha demostrado el efecto nefroprotector de los IECAs, mientras que en pacientes con DM2 los antagonistas de los receptores ARA II han sido establecidos como renoprotectores. Sin embargo, otros grandes estudios no han confirmado la superioridad renoprotectora del bloqueo del SRAA frente a otros agentes hipotensores. El estudio ALLHAT, que es el estudio más grande, que compara diferentes clases de agentes hipotensores en más de 30,000 sujetos hipertensos, no consigue demostrar un beneficio adicional del tratamiento con IECAs frente a otros agentes hipotensores, tanto en pacientes con o sin DM (122). Además, los resultados del estudio UKPDS, tampoco confirmaron una mejor renoprotección del bloqueo del SRAA sobre el bloqueo beta, lo que sugiere que la clave de la nefroprotección mediante el tratamiento antihipertensivo reside en el control estricto de la PA. Aunque si bien, existen evidencias concluyentes del especial beneficio de la inhibición farmacológica del SRAA, por lo que este tipo de intervención probablemente constituya la base del tratamiento nefroprotector. Sin embargo, no hay que olvidar que la mayoría de los pacientes precisarán 2 o más fármacos antihipertensivos para alcanzar el grado de control idóneo de la PA.

En la tabla 5 se muestra los principales estudios en pacientes con DM que establecen una relación entre el control de la PA y el desarrollo de eventos CV.

**Tabla 5:** Relación entre la disminución de los niveles de presión arterial y el riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes con diabetes mellitus

Estudio	# de Pac.	Dur. (a)	Control de la PA		Tratam. inicial	Evento primario	RR,%
			Menos estricto	Estricto			
<b>SHEP 1996</b>	583	5	152/72	143/68	Clortalidona	ACV Ev. CV	ns 34
<b>Syst-Eur 1999</b>	492	2	162/82	153/78	Nitrendipino	EC ACV Ev. CV	56 69 62
<b>HOT 1998</b>	1501	3	144/85	140/81	Fenlodipino	Ev. CV IM ACV Mort. CV	51 50 ns 67
<b>UKPDS 1999</b>	1148	8,4	154/87	144/82	Captopril o atenolol	Ev. DM Muerte ACV Ev. Micro	34 37 44 37
<b>HOPE Micro-HOPE</b>	3577	4,5	Disminución en la PA sistólica de 2,4	.....	Ramipril vs.	Ev. CV Mort. CV	25 37



<b>2000</b>			mmHg y de 1,0 mmHg en la PA diastólica		placebo	IM ACV Mort. Tot	22 33 24
<b>CAPP 2001</b>	572	7	155/89 vs. 153/88	.....	Captopril vs. diuréticos o	IMF+IMNF +ACV+Mort. CV.	41
<b>IDNT 2001</b>	1715	2,6	≤ 135/85	.....	β-bloquean. Irbesartán vs. Amlodipino o placebo	Creat x2+ IRT+ Mort.total	23 20. .
<b>IRMA 2001</b>	590	2	144/83 143/83 141/83	.....	IRB 150 mg IRB 300 mg Placebo	Inicio de Nefropatía diabética	35 65
<b>RENAAL 2001</b>	1513	3,4	152/82 vs. 153/82	.....	Losartán vs. Placebo	Creat x2 IRT Muerte	25 28 ns
<b>LIFE 2002</b>	1195	4,8	146/79 vs. 148/79	.....	Losartán vs. Atenolol	Ev. CV Mort. Tot en DM	22 39

*SHEP: Systolic Hypertension In the Elderly Program (123); Syst-Eur: Systolic Hypertension in Europe (124); HOT: Hypertension Optimal Treatment (116); HOPE: Heart Outcomes Prevention Evaluation study; Micro-HOPE sub-study of HOPE in microalbuminuria (125); CAPP: Captopril Prevention Project (126); IDNT: Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial (118); IRMA: Irbesartan MicroAlbuminuria in type 2 diabetes (120); RENAAL: Reduction in End points in NIDDM with Angiotensin II Antagonist Losartan (119); LIFE: Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension Study (121). ACV: accidente cerebro-vascular; EC enfermedad coronaria; Ev. CV: eventos cardiovasculares; IM: infarto de miocardio; IMF: infarto de miocardio fatal; IMNF: infarto de miocardio no-fatal; Mort. CV: Mortalidad de origen CV; EV. DM: eventos relacionados con la DM; EV. Micro: Eventos microvasculares; Creat x2: Doblar los niveles de creatinina sérica; IRT: Insuficiencia renal terminal; Mort. Tot en DM: Mortalidad total en DM. Adaptado de referencia (127)*

### **2.3 Dislipemia**

En la DM2 además de las alteraciones del eje glucosa-insulina, se producen notables cambios en la composición y distribución de las partículas de las lipoproteínas, que asociado a la mayor prevalencia de otros factores de riesgo CV, justifica que la incidencia de eventos CV sea de 2 a 5 veces mayor que en la población no diabética (128;129).

La dislipemia diabética se caracteriza por:

- Un incremento de la lipemia post-prandial con aumento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, quilomicrones y partículas VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad),
- Por niveles disminuidos de lipoproteínas de elevada densidad (C-HDL),
- Aumento de la apo-lipoproteína-B,

- Un predominio de partículas pequeñas y densas de lipoproteínas de baja densidad ( C-LDL), que son LDL modificadas por oxidación y glucosilación de gran poder aterogénico. Estas alteraciones se presentan en muchos pacientes, incluso a pesar de niveles de C-LDL normales
- Un aumento discreto de los niveles de colesterol total y de los ácidos grasos libres (130).

Con frecuencia, sujetos con IOG presentan un modelo aterogénico de factores de riesgo que incluyen niveles elevados de colesterol total, C-LDL y triglicéridos y niveles bajos de C-HDL (131;132). Hay evidencias de que cada una de las alteraciones en el metabolismo lipídico que se presentan en los pacientes con DM, está asociado con incremento del riesgo de eventos CV. Numerosos estudios han demostrado una asociación entre el tamaño de las partículas de C-LDL o en su densidad y la EC (133-136). Además, estudios recientes han indicado que los niveles de partículas pequeñas y densas de C-LDL son un factor predictivo para eventos coronarios independiente de otros factores de riesgo CV (137-139). La dislipemia diabética está modificada por múltiples factores como el tipo de DM, el tratamiento, el grado de control metabólico, el grado de resistencia a la insulina, la presencia de complicaciones ( la nefropatía agrava la dislipemia) y factores genéticos como el fenotipo de la apo-E y la actividad de la lipoprotein-lipasa. Estas modificaciones tienen importantes implicaciones terapéuticas, ya que el mal control glucémico incrementa la dislipemia diabética, de esta forma, el control glucémico estricto disminuirá el flujo de ácidos grasos libres que son el sustrato que le llega al hígado para fabricar lipoproteínas ricas en triglicéridos y VLDL, que por otra parte son el sustrato para el aumento de la síntesis de glucosa y el bloqueo de su captación por parte de los tejidos periféricos (140). El aumento de los ácidos grasos libres aumenta la resistencia a la insulina por tres mecanismos: a) produciendo más hiperinsulinismo al actuar directamente sobre las células  $\beta$ , b) sobre el hígado incrementado la producción de las VLDL y de las partículas LDL, así como sirviendo de sustrato para la gluconeogénesis y c) sobre el músculo interfiriendo en la captación de glucosa. Además la disminución de la actividad de la lipoprotein-lipasa se traduce en una disminución de la degradación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, con lo que permanecen elevadas en el plasma más tiempo y, en consecuencia, se produce una acumulación de las lipoproteínas no sólo por el aumento de la síntesis sino también por la disminución en la degradación (141-143).

Los principales objetivos del tratamiento de la dislipemia en pacientes con DM son evitar el desarrollo de eventos CV y disminuir la mortalidad que estos eventos conllevan. Los cambios del estilo de vida con modificaciones dietéticas, reducción de peso, ejercicio, cesación del hábito tabáquico disminuyen las alteraciones metabólicas y lipídicas que se observan en los pacientes con DM, por lo que son una parte integral de cualquier esquema terapéutico en la DM (144). Aunque, estas modificaciones del estilo de vida pueden mejorar la dislipemia diabética, con frecuencia se necesita recurrir al tratamiento farmacológico para alcanzar los objetivos terapéuticos en este grupo poblacional. Grandes estudios clínicos epidemiológicos y de intervención, han demostrado el beneficio del tratamiento hipolipemiante en los pacientes con DM. Los fármacos con más datos remarcables en pacientes con DM son los inhibidores de la 3- hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa o estatinas. Hasta hace poco, en prevención primaria, solo se disponía de datos del análisis del pequeño subgrupo de pacientes con DM2 del estudio (Airforce/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS), en el cual los pacientes fueron randomizados a tratamiento con lovastatina 20-40 mg, o al grupo en tratamiento con placebo y se observó una reducción del riesgo del 43% en los eventos CV (infarto del miocardio fatal y no fatal y de muerte súbita) (145). En el año 2002, se publicaron los resultados del estudio HPS (Heart Protection Study), en el que se randomizó a 5.963 sujetos entre 40-80 años de edad con DM y/o enfermedad vascular y colesterol total > 135 mg/dl a simvastatina o placebo. Entre los 2.912 sujetos con DM incluidos en el estudio sin evidencia de aterosclerosis al inicio del estudio (prevención primaria), hubo una reducción del 34% en el riesgo del evento final combinado (eventos coronarios agudos, ACV y procesos de revascularización) durante un período de seguimiento de 5 años, evidenciando que el tratamiento con estatinas es claramente beneficioso en los pacientes con DM2 (146). Muy recientemente, los datos del estudio CARDS (Primary prevention of cardiovascular disease in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study) confirman los resultados de estos estudios previos en prevención primaria. En este estudio, se planificó un seguimiento durante 5 años de 2838 sujetos de entre 40-75 años, con DM2 sin historia de enfermedad cardiovascular pero con alto riesgo de desarrollarla (presentando además uno o más de los siguientes factores de riesgo: retinopatía, albuminuria, ser fumador activo o hipertenso) con niveles de C-LDL < 130 mg/dl, de los cuales 1428 fueron aleatoriamente asignados al grupo de tratamiento con atorvastatina 10 mg. La

variable primaria fue el tiempo a la aparición de primer evento cardiaco, proceso de revascularización o ACV. El estudio fue suspendido 2 años antes de la finalización prevista debido a la eficacia que se observó en el grupo de tratamiento con atorvastatina con una reducción del 37% en el riesgo de desarrollar un evento CV, o dicho de otra manera, el tratamiento con 10 mg de atorvastatina evitaría 37 eventos CV mayores por cada 1000 personas tratadas durante 4 años (147).

Los análisis retrospectivos de los estudios de prevención secundaria, el estudio 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study) (148), del CARE (Cholesterol And Recurrent Events) (149), LIPID (The longterm Intervention with pravastatin in Ischaemic Disease) (150) han demostrado que el tratamiento con estatinas reducía el riesgo de eventos CV en pacientes diabéticos con EC y niveles elevados de C-LDL en un 55%, 24%, 17%, respectivamente. Estos resultados han sido recientemente reforzados en el estudio MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering ) que incluyó 3.086 pacientes con angina inestable o infarto de miocardio no-onda Q, de los que aproximadamente 710 pacientes tenían DM2, demostrándose que el tratamiento con 80 mg de atorvastatina iniciado 24 a 96 horas del evento coronario agudo, durante 16 semanas, producía una reducción significativa en el riesgo relativo del 16% [riesgo relativo (RR) 0,84; 95% de Intervalo de Confianza (IC), 0,70-1,00; P= 0.048] del evento final primario definido como muerte, infarto de miocardio agudo no-fatal, paro cardiaco con reanimación, o isquemia miocárdica recurrente sintomática (151).

El otro grupo farmacológico hipolipemiente son los fibratos cuyo mecanismo de acción induce una discreta elevación de los niveles de C-HDL y disminución de los niveles de triglicéridos. En el estudio VA-HIT ( Veterans Affairs High Density Lipoprotein Cholesterol Interventions trial) 2.531 pacientes varones con historia de EC, niveles normales de C-LDL y niveles bajos de C-HDL fueron randomizados a tratamiento con gemfibrozilo o placebo. Durante un período de seguimiento de 5,1 años hubo una reducción del 32% en los 769 pacientes con DM incluidos (25%) en los eventos CV mayores definidos como muertes por EC, infarto de miocardio no-fatal y ACV, por lo que los fibratos pueden ser útiles en pacientes con niveles elevados persistentemente de triglicéridos y niveles bajos de C-HDL a pesar de un control glucémico correcto (152). La tabla 6 resume la evidencia actual entre en tratamiento con estatinas y el desarrollo de eventos CV en pacientes con DM

**Tabla 6.** Relación entre el tratamiento hipolipemiante con estatinas y riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes con diabetes mellitus

Estudios (Subgrupo Diabetes)	# de pacientes	% de Placebo	eventos Estatinas	Reducción del Riesgo	Evento primario
<b>Prevención primaria</b>					
<b>AFCAPS, 1998(145)</b>	155	8,4	4,8	43	IMF+ IMNF, MS
<b>CARDS, 2004(147)</b>	2838	9,0	5,8	37	IMF+IMNF+RV+ACV
<b>Prevención secundaria</b>					
<b>4S, 1999(148)</b>	202	45	22	55	ECF + IMNF
<b>CARE, 1996(149)</b>	602	37	29	24	ECF+IMNF+RV
<b>LIPID, 1998(150)</b>	782	23	19	17	ECF + IMNF
<b>MIRACL, 2001(151)</b>	710	...	...	16	Muerte, IMNF, reanimación
<b>Prevención primaria y secundaria</b>					
<b>HPS, 2002(146)</b>	5963	...	...	24	IMF+IMNF + ACV + RV

*IMF: infarto de miocardio fatal; IMNF: infarto de miocardio no-fatal; MS: muerte súbita; ECF: enfermedad coronaria fatal; RV: revascularización; ACV: accidente cerebro-vascular. Adaptado de referencia (127).*

#### **2.4 Consumo de tabaco**

El humo del tabaco contiene tanto como 4.000 constituyentes químicos y su composición varía de manera sustancial, dependiendo del origen del tabaco y de la vía de consumo. Se han identificado cerca de 60 tóxicos en el humo de tabaco que incluyen el monóxido de carbono, amonio y carcinógenos conocidos como las nitrosaminas y los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Los efectos adversos del consumo de tabaco (CT) sobre la salud son en general aceptados y han sido bien documentados en sujetos con DM, ya que existen numerosas evidencias clínicas y epidemiológicas de que el CT está asociado con el desarrollo y progresión de las complicaciones macrovasculares y microvasculares en pacientes con DM. Sin embargo, su uso continúa siendo muy habitual, el principal problema es que produce adicción y la nicotina ha sido identificada como la sustancia presente en el humo del tabaco que causa esta adicción. El CT en España es un problema de Salud Pública importante, ya que su prevalencia es de alrededor del 35%. Al analizar la magnitud del problema en pacientes con DM nos encontramos con que, a pesar de la frecuente relación con el personal sanitario, la

prevalencia del CT en pacientes con DM es muy similar y en ocasiones superior a la descrita en la población general. En 1995, en Australia, se analizó en una amplia muestra poblacional de 9.402 sujetos la prevalencia del CT entre individuos mayores de 15 años con o sin DM, observando un porcentaje similar de fumadores entre los dos grupos, pero cuando se estratificó para la edad había una prevalencia más alta de fumadores con DM en sujetos menores de 40 años (55%), con relación a los sujetos del grupo sin DM (32%) (153). En España, existen muy pocos datos acerca de la prevalencia del CT en pacientes con DM, sin embargo extrapolando de los datos del estudio Diamante sobre la prevalencia de la ND en pacientes con DM1, se observó sobre un total de 1,882 pacientes, que un 40% eran fumadores activos, 12,2 eran ex-fumadores y 47,8 eran no fumadores (33).

Algunos grandes estudios prospectivos y poblacionales han permitido comprobar el papel favorecedor del CT en el desarrollo de DM2 en hombres y en mujeres. En el Physicians'Health Study, 21.068 varones fueron seguidos durante 12 años, y 770 nuevos casos de DM fueron registrados, después de ajustar para múltiples factores de riesgos, el riesgo relativo para el desarrollo de DM2 fue de 1,7 (95% de IC: 1,3-2,3) para fumadores actuales de  $\geq 20$  cigarrillos/día y de 1,5 (95% de IC 1,0-2,2) para fumadores actuales  $< 20$  cigarrillos/día comparados con los que nunca habían fumado (154). En el estudio Nurse'Health Study en 114,247 mujeres que fueron seguidas durante 8 años, se registraron 2333 nuevos casos de DM2 y después de ajustar para múltiples factores de confusión, el riesgo relativo para desarrollar DM2 en mujeres que fumaban  $\geq 25$  cigarrillos/día comparado con mujeres que nunca habían fumado fue de 1,42 (95% de IC 1,18-1,72) (155). El mecanismo por el cual el CT incrementa el riesgo de desarrollar DM2 aún no se ha aclarado, sin embargo, algunos estudios experimentales han demostrado que el CT produce resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos, lo que junto con la estimulación de la liberación de hormonas contrarreguladoras, provocaría que los niveles de glucosa en el plasma se incrementen en aquellos sujetos susceptibles para el desarrollo de DM.

El CT es uno de los factores de riesgo modificables para el desarrollo de las complicaciones crónicas en la DM sobre el que se puede y debe intervenir. Numerosos estudios han valorado los efectos adversos del CT sobre la ND. Las primeras observaciones ya demostraron que el CT es más prevalente entre los pacientes con DM1 y DM2 con ND (microalbuminuria o proteinuria) (156;157). Christiansen et al, proporcionaron la primera evidencia de que los pacientes con DM1 fumadores tenían un mayor riesgo de desarrollar ND y esta observación fue

posteriormente confirmada en algunos estudios retrospectivos y prospectivos (158). La evidencia científica ha establecido al CT como un factor de riesgo independiente en el desarrollo de MIC (159-161), de progresión acelerada de microalbuminuria hasta proteinuria, es decir a ND (160;162), así como de progresión desde ND hasta enfermedad renal terminal (163). Se ha demostrado, que el impacto del CT sobre el riñón en pacientes con DM es independiente de la edad del paciente, de la duración de la enfermedad y del tipo de DM. Scott et al, en un estudio prospectivo en 943 pacientes con DM1 y normoalbuminuria al inicio del estudio, demostraron que el CT magnifica el efecto deletéreo del mal control glucémico, aumentando el riesgo de desarrollar microalbuminuria (164). En otros dos estudios prospectivos realizados por Chuahirun et al, el efecto negativo del CT fue confirmado, incluso en pacientes que recibían un óptimo tratamiento hipotensor en que se incluía un bloqueador del SRAA (165;166). Los mecanismos a través del cual el CT ejerce sus efectos adversos sobre la función renal en la DM no han sido aclarados, pero varios estudios han sugerido que el CT puede incidir sobre la PA, la hemodinámica renal o incrementando el EO, factores todos ellos que pueden estar involucrados en la patogenia de la ND (167-170). En la retinopatía diabética la relación del CT con su desarrollo es menos definida, sin embargo, existe información válida de una peor evolución de la retinopatía en pacientes fumadores con DM. Se ha hipotetizado que el CT disminuye el flujo sanguíneo al nivel de la retina, creando un ambiente hipoxico (isquémico), que a su vez es el principal estímulo para la síntesis del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) responsable de la neo-angiogénesis que se observa en la retinopatía diabética proliferativa (171;172).

El CT se ha demostrado como un factor aditivo en el riesgo de enfermedad CV en los pacientes con DM. En el estudio “*Múltiple Risk factor Intervention Trial*” (MRFIT) se observó que los pacientes varones con DM, que consumían  $\geq 26$  cigarrillos/día presentaban un incremento del riesgo absoluto de 33,3% personas/año de mortalidad de origen CV, comparados con los pacientes no fumadores con DM (173). El estudio prospectivo (8 años de seguimiento) “*World Health Organization Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics*”, mostró que el CT es significativamente asociado con un riesgo aumentado para EC, pero no de ACV, tanto en pacientes con DM1 y DM2 (174). En el DCCT, el CT no fue un factor de riesgo significativo para el desarrollo de eventos CV, sin embargo, los sujetos que participaron en este estudio fueron relativamente jóvenes, de tal manera, que este estudio no fue diseñado para evaluar de manera óptima el papel

del CT en el desarrollo de la enfermedad macrovascular (59). En pacientes con DM2, el UKPDS demostró claramente que el CT es un factor de riesgo significativo e independiente para EC, ACV y EVP (71;175;176). En un análisis reciente del anteriormente mencionado Nurse'Health Study, se observó una relación con el número de cigarrillos consumidos/día (dosis) y mortalidad, de tal manera, que el riesgo de mortalidad de cualquier causa es de 1,64 en mujeres con DM que fumaban entre 15-34 cigarrillos/día, y 2,19 en mujeres que fumaban más de 34 cigarrillos/día(177).

Actualmente, también hay datos que han demostrado que el cese del CT produce beneficios evidentes en cuanto a la reducción del riesgo del desarrollo de DM, de las complicaciones crónicas específicas de esta enfermedad, así como de la morbi-mortalidad CV originada por el tabaco. Un estudio Británico, con un seguimiento cercano a los 17 años, demostró en varones fumadores que el aumento del riesgo de desarrollar DM disminuía después de 5 años y se normalizaba 20 años después del cese del CT (178). Los datos del "*Cancer Prevention Study*" fueron usados para analizar la correlación entre el CT y el riesgo de desarrollar DM tanto en hombres como en mujeres, y observaron que el cese del CT producía que el riesgo de desarrollar DM se normalizara después de 5 años en mujeres y de 10 años en varones (179). En un estudio prospectivo con 359 pacientes con DM1, se detectó en el 20% de los 28 pacientes clasificados como ex-fumadores una reducción de la EUA durante el seguimiento de 2,4 años, sugiriendo un efecto beneficioso del cese del CT sobre la ND (160). Por otro lado, Stegmayr y cols, describieron en un grupo de 34 pacientes, que la mortalidad CV al año de ocurrir la enfermedad renal terminal era significativamente menor en ex-fumadores que en fumadores (180). Chuahirun et al, en un estudio prospectivo evaluaron el efecto del cese del CT en la evolución de índices de injuria renal (excreción urinaria del factor transformador del crecimiento  $\beta_1$ , albúmina y de colágeno tipo IV) en 80 pacientes con DM2 y microalbuminuria al mismo tiempo que estaban en tratamiento con IECAs. Los resultados de este estudio demostraron que el cese del CT disminuía la injuria renal (166). Yudkin et al, calcularon el beneficio teórico de diferentes abordajes para reducir los factores de riesgo CV, basados en los datos de mortalidad que se obtuvieron del estudio MRFIT. Este autor estableció que cese del CT en pacientes varones con DM prolongaría la expectativa de vida aproximadamente en 3 años (181). Subsecuentes análisis de la cohorte de pacientes del Nurse'Health Study revelaron que 10 años después del cese del CT, el riesgo de EC y de mortalidad se



normalizaba cuando se comparaba con mujeres con DM no-fumadoras(155). Chaturvedi et al. en un gran estudio prospectivo analizó los efectos del cese del CT sobre el riesgo CV en pacientes con DM. El riesgo de mortalidad en pacientes con DM ex-fumadores fue comparado con el riesgo en sujetos que nunca habían fumado. La mortalidad de cualquier causa fue cerca de un 50% más elevada en pacientes en los que el tiempo de abandono del CT estaba entre 1-9 años y 25% más elevada en pacientes que habían abandonado el CT más tiempo. Los resultados de este estudio muestran que el cese del CT reduce el riesgo de mortalidad en pacientes con DM. “ Sin embargo, este riesgo permanece muy elevado los primeros años después del cese del CT y es altamente dependiente de la duración del CT” (182).

De todo lo expuesto en esta sección se desprende que los pacientes con DM1 y DM2 son particularmente susceptibles a los efectos deletéreos del CT. Generalmente, la condición diabética *per se*, incluso en sujetos no fumadores es asociada con una exposición prolongada al estrés oxidativo, disfunción endotelial, dislipemia y hay suficientes razones para creer que el CT añadido a esta condición de elevado riesgo, explique el riesgo adicional de enfermedad CV y otras morbilidades que se observa en los pacientes con DM fumadores.

### **3. Mecanismos patogénicos de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.**

Como ya hemos comentado anteriormente, desde hace tiempo se ha postulado una relación causal entre la hiperglucemia crónica y las complicaciones microvasculares, aunque esta relación no fue definitivamente establecida hasta que se publicaron los resultados de los dos estudios principales de la DM, el estudio DCCT en pacientes con DM1 y el UKPDS en pacientes con DM2, en el que esta relación fue definitivamente establecida. La hiperglucemia es capaz de alterar la función de múltiple tipos de células que incluyen las células endoteliales, las células del músculo liso, plaquetas lo que explica la extensión de la alteración en esta enfermedad. La característica que distingue a las células susceptibles del daño por la hiperglucemia es que carecen de un mecanismo de *dowregulation* del transporte de glucosa cuando los niveles de glucosa extracelular son elevados. Las células del músculo liso vascular muestran una relación inversa entre la concentración de glucosa y el transporte de glucosa. En cambio, las células endoteliales que son uno de los objetivos principales del daño inducido por la

hiperglucemia, no muestran cambios significativos en el transporte de glucosa cuando la concentración de glucosa se eleva, por lo que la hiperglucemia intracelular parece que sea el determinante principal del daño tisular en la DM (183). La hiperglucemia intracelular causa daño a nivel tisular a través de dos mecanismos (a) El primero, incluye cambios agudos y repetidos en el metabolismo celular que son reversibles cuando la normoglucemia se restablece. (b) El segundo involucra cambios acumulativos en macro-moléculas de vida larga, que persisten a pesar de la normalización de la glucosa. Estos mecanismos están influenciados por determinantes genéticos de susceptibilidad o resistencia al daño por la hiperglucemia.

Existen numerosas hipótesis que intentan explicar el mecanismo patogénico de enlace entre la hiperglucemia crónica y el desarrollo de complicaciones. Sin embargo, describiremos de manera preferente las cuatro hipótesis mayores que han generado la mayor cantidad de evidencias científicas así como algunos estudios basados en inhibidores específicos de estos mecanismos:

- Incremento de la actividad de la aldolasa reductasa (vía de los polioles);
- Incremento de la formación de los productos finales de glicosilación avanzada (AGE<sub>s</sub>);
- Incremento de la formación de radicales libres [estrés oxidativo (EO)];
- La activación de las isóformas de la proteína cinasa C (PKC) y estimulación de la fibrogénesis a través de la liberación de citocinas y la secreción de factores de crecimiento.

La lista de las hipótesis es grande y expresa nuestro escaso conocimiento actual en la comprensión de la patogénesis de las complicaciones crónicas. Es importante subrayar que las distintas hipótesis se superponen e interrelacionan unas con otras, por ejemplo, la formación de AGE<sub>s</sub> y la actividad alterada de la vía de los polioles induce EO, que por otro lado, este EO incrementa la formación de AGE<sub>s</sub>, que a su vez activa la PKC, etc.....

### **3.1 Vía de los polioles**

La aldolasa reductasa es la primera enzima en la vía de los polioles. Ésta es una oxido-reductasa monomérica citosólica que cataliza la reducción dependiente de la nicotamida adenina dinucleótido fosfatasa (NADPH) de una variedad de

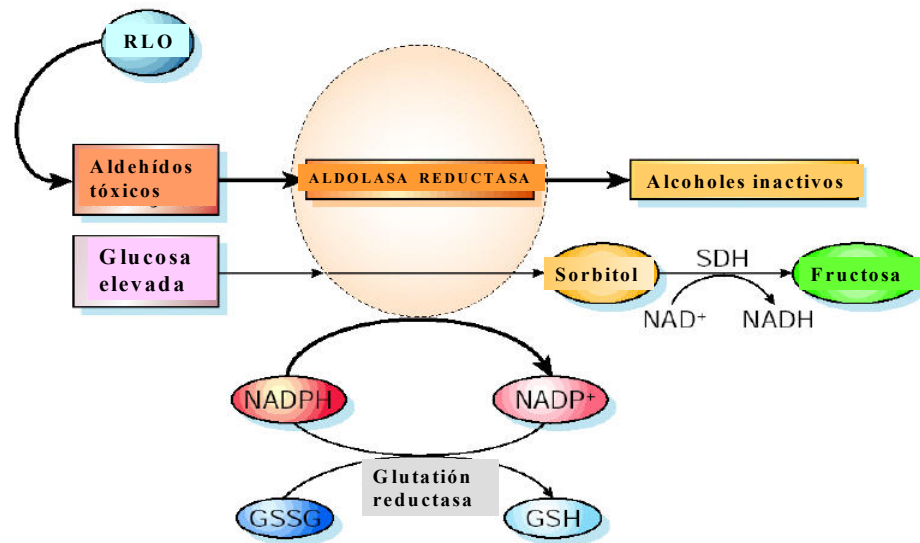
compuestos carbónicos, incluyendo la glucosa. La aldolasa reductasa tiene una baja afinidad para la glucosa (elevado  $K_m$ ) en concentraciones de glucosa normal como sucede en los pacientes no diabéticos. El metabolismo de la glucosa a través de esta vía representa un pequeño porcentaje del uso total de la glucosa, pero en un ambiente hiperglucémico, el incremento de la glucosa intracelular resulta en un aumento de la conversión enzimática de la glucosa a sorbitol, con una disminución concomitante del NADPH. En la vía de los polioles el sorbitol es oxidado a fructosa por la enzima sorbitol deshidrogenasa con reducción de la  $NAD^+$  (como cofactor) a NADH. El paso de glucosa a través de esta vía durante la hiperglucemia varía desde un 33% de la utilización de la glucosa en el cristalino de conejos hasta un 11% en los eritrocitos humanos, lo que explica que la contribución de esta vía a las complicaciones diabéticas varíe entre especies, y sea tejido-dependiente. Figura 2

Numerosos mecanismos se han propuestos para explicar el efecto deletéreo del incremento del metabolismo de la glucosa a través de la vía de los polioles en situación de hiperglucemia. Estos incluyen:

- El estrés osmótico producido por el sorbitol: El sorbitol no difunde fácilmente a través de las membranas, por lo que inicialmente se sugirió que producía un daño osmótico en las células microvasculares. Sin embargo, varios estudios han confirmado que la concentración de sorbitol intracelular en las células vasculares o nerviosas de los pacientes con DM es demasiado pequeña (en el rango nanomolar) como para causar el daño osmótico propuesto, comparado con las concentraciones micromolares o incluso milimolares de otros metabolitos de la glucosa (184;185).
- Disminución de la actividad de la ATPasa de  $Na^+$  y  $K^+$  producido por la activación de la PKC: La activación de la PKC por la hiperglucemia aumenta la actividad de la fosfolipasa  $A_2$ , la cual a su vez incrementa la producción de dos inhibidores de la ATPasa de  $Na^+$  y  $K^+$  como son el ácido araquidónico y la prostaglandina  $E_2$  (186).
- La oxidación de sorbitol por la  $NAD^+$ : Esta oxidación incrementa el rango a nivel citosólico del  $NADH:NAD^+$ , inhibe la actividad de la enzima glicerilaldehído-3-fosfatasa deshidrogenasa e incrementa las concentraciones de glicerilaldehído-3-fosfato, la cual a su vez incrementa la formación de metilglioxal que es un precursor de los AGE<sub>s</sub> y diacilglicerol (DAG), que finalmente activa la PKC. (187;188)

- La reducción de glucosa a sorbitol: Esta reducción produce una disminución del NADPH. La NADPH es necesaria para la regeneración del glutatión reducido (GSH) que es un anti-oxidante alterando el balance redox celular, por lo que la disminución del NADPH provocaría una inducción o incremento del EO. (189)
- El aumento del transporte de la glucosa a través de la vía de los polioles es seguido por: disminución de los niveles de mioinositol, alteración del recambio del fosfo-inositol, disminución de las concentraciones de calcio y una actividad reducida de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, lo cual se ha postulado que contribuya al desarrollo de las complicaciones vasculares que se observan en los sujetos con DM. (190)

La mayor crítica de esta hipótesis es que estas alteraciones se producen solo en los tejidos donde la actividad de la aldolasa reductasa es elevada como a nivel nervioso, lo que explica la eficacia de la inhibición de esta vía metabólica para prevenir la neuropatía diabética que se ha observado en animales (191) y en humanos (192). En 1999 fue publicado un estudio en humanos, multidosis y controlado con placebo, utilizando un potente inhibidor de la aldolasa reductasa (Zenarestat) en el que se demostró un efecto positivo de la inhibición de esta vía en la neuropatía diabética (193). Por el contrario, en el territorio vascular, la actividad de la aldolasa reductasa es baja e insuficiente para disminuir los niveles de glutatión reducido e incrementar los niveles de glutatión oxidado, así como para inhibir la oxidación del glicerilaldehído-3-fosfato, lo cual es consistente con los resultados de los estudios en animales en que los inhibidores de la aldolasa reductasa no son capaces de prevenir la retinopatía o el engrosamiento de la membrana basal en los capilares de la retina, riñón y músculo (191). Algunos estudios clínicos con resultados negativos han cuestionado la relevancia de este mecanismo en humanos, la ausencia de eficacia de estos estudios se ha atribuido a los efectos adversos que limitan la dosis del fármaco y la incapacidad de alcanzar una concentración eficaz del fármaco en los tejidos.



**Figura 2, Vía de los polioles:** La aldolasa reductasa reduce aldehídos originados por los radicales libres de oxígeno (RLO) a alcoholes inactivos y la glucosa a sorbitol usando la NADPH como cofactor. En las células en donde la actividad de la aldolasa reductasa es incrementada, los niveles del glutatión reducido (GSH) están disminuidos, aumentando el EO; La sorbitol deshidrogenasa (SDH) oxida el sorbitol a fructosa, utilizando la  $NAD^+$  como cofactor (194).

### **3.2 Productos finales de la glicosilación avanzada**

Esta teoría surgió al intentar explicar las complicaciones de la DM como una forma de envejecimiento precoz. La glicosilación avanzada se produce durante el envejecimiento normal, pero en la DM este proceso está acelerado. Los productos de la glicosilación no enzimática de las proteínas varían en su estructura química pero como grupo se denominan productos finales de la glicosilación avanzada (AGE<sub>s</sub>). La glucosa intracelular es la principal alteración que inicia la formación de los AGE<sub>s</sub>, tanto intracelular como extracelular, por que el grado de formación de los AGE<sub>s</sub> desde la glucosa es menor al de la formación de los AGE<sub>s</sub> desde los precursores dicarbonílicos derivados de la glucosa y producidos intracelularmente (195). Los AGE<sub>s</sub> pueden originarse desde la auto-oxidación intracelular de glucosa a glioxal (196); de la descomposición de los productos Amadori a 3-deoxyglucosona y por la fragmentación de glicerilaldehído-3-fosfatasa y dihidroxyacetona fosfatasa a metilglioxal (197). Estos reactivos dicarbonílicos intracelulares (glioxal, metilglioxal y 3-deoxyglucosona), reaccionan con los grupos amino de las proteínas intra y extracelulares para

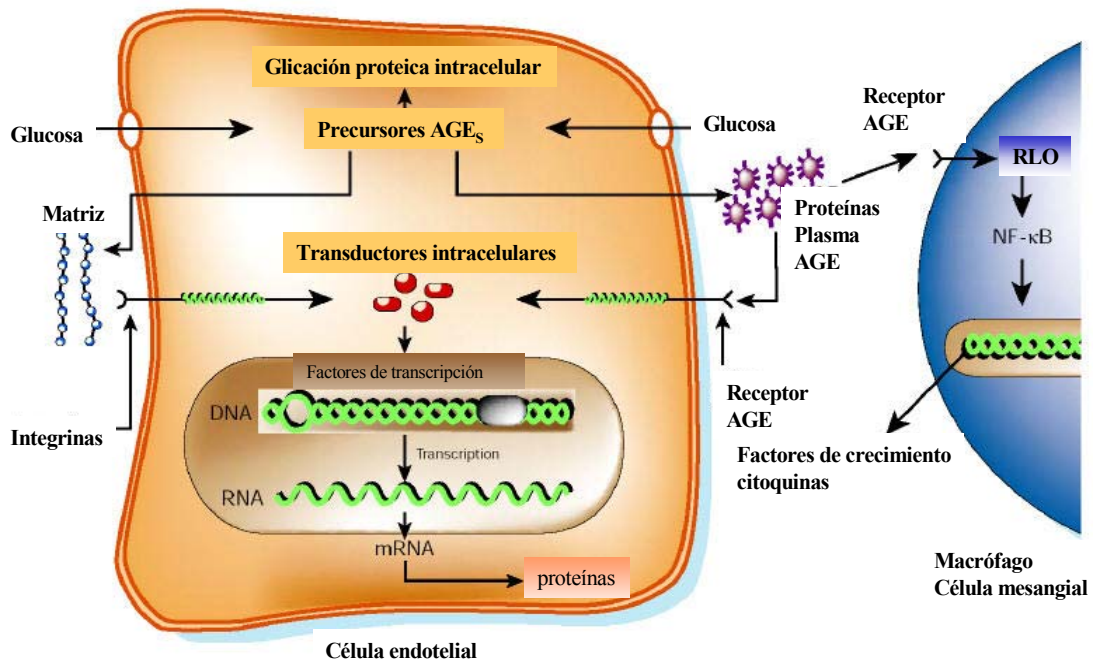
formar los AGE<sub>s</sub>. El glioxal y el metilglioxal son eliminados a través del sistema de la glioxalasa (197).

La formación de estos compuestos lesiona a la célula a través de varios mecanismos:

- Los AGE<sub>s</sub> alteran la función de un amplio rango de proteínas, que incluyen las modificaciones de proteínas estructurales como el colágeno y proteínas intracelulares (198).
- Los componentes de la matriz extracelular, modificados por los precursores de los AGE<sub>s</sub> interactúan anormalmente con los otros componentes de la matriz y con los receptores celulares de las proteínas de la matriz (integrinas). La acumulación de los AGE<sub>s</sub> en las proteínas de vida larga de la matriz aumenta los enlaces cruzados de estos componentes (199), provocando resistencia a su degradación e incrementado la rigidez de los vasos (200;201). Esta acumulación de las proteínas de matriz extracelular esta aumentada al menos en parte, por la inducción de factores de crecimiento y citocinas como el factor transformador del crecimiento  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).
- Los AGEs alteran la función celular al enlazarse a receptores. Cinco proteínas que enlazan AGEs han sido identificadas: a) el receptor de los AGEs (RAGE) que es un receptor transmembrana que forma parte de la super familia de inmunoglobulinas localizados en las células endoteliales, mesangiales y macrófagos (202). El enlace de las proteínas modificadas por los AGEs a los RAGE inician una cascada de eventos de señalización celular como la activación de las protein cinasas activadas por mitógenos (MAP) o de la PKC, generando radicales libres de oxígeno (RLO), que inician disfunción celular, así como activan el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B que provoca cambios patológicos en la expresión de genes (203;204). La expresión de la RAGE está incrementada en la DM y en condiciones de inflamación incluyendo la aterosclerosis, y se ha demostrado que los monocitos en las placas ateroscleróticas tiñen intensamente para RAGE (205). b) la proteína 60 (p60) que presenta un 95% de homología al OST-48, que es un componente del complejo oligosacaril transferasa en las membranas microsomales (206). c) la proteína 90 (p90) que tiene una secuencia homóloga con la 80K-H

humana que es un sustrato de la PKC (206). d) Galectina-3 que es una proteína que enlaza carbohidratos y también enlaza AGEs. (207) e) El receptor “basurero” (scavenger) de macrófagos tipo I y II que enlazan AGEs y participa en la endocitosis de estos compuestos (208). Sin embargo, solo se ha demostrado que los RAGE inician señales de traducción al enlazarse con los AGEs.

La importancia de los AGEs como mediadores del efecto deletéreo de la glucosa en la DM se ha determinado utilizando un inhibidor de esta vía metabólica. La aminoguanidina, es un inhibidor de los AGEs y es un derivado nucleofílico hidrazílico que reacciona con los metabolitos intermedios producidos en las etapas iniciales de la glicación de la glucosa (209). Las consecuencias de la inhibición de esta vía metabólica con la aminoguanidina en las complicaciones de la DM han sido investigadas en la retina, riñón, nervio y arteria. En condiciones experimentales, el desarrollo de cada una de las anomalías patológicas evaluadas fueron inhibidas en un 85 a 90%. Esto incluye el desarrollo de capilares acelulares, microaneurismas retinianos, incremento de la EUA, expansión mesangial, disminución de la velocidad de conducción sensorial y motora del nervio, de la amplitud del potencial de acción, disminución de la elasticidad arterial y del incremento de la filtración de fluidos arteriales (209-212). Sin embargo, los estudios clínicos en humanos no han demostrado resultados beneficiosos, tal vez por que este compuesto solo bloquea una y probablemente menor vía de formación de los AGEs dentro de las células (213). Actualmente, nuevos compuestos como el *Phenacylthiazolium bromide* (PTB) el ALT 711, que actúan rompiendo los enlaces cruzados de los AGEs es posible que muestren ser más efectivos en prevenir la injuria tisular producida por los AGEs. Se ha observado que la administración diaria de PTB a ratas diabéticas con estreptozotocina reduce los enlaces cruzados del colágeno en la cola de estos animales, así como la acumulación de los AGEs a nivel vascular (214). Figura 3



**Figura 3:** Mecanismos a través del cual los AGEs lesionan las células vasculares. Las modificaciones covalentes de las proteínas intracelulares por los precursores AGE dicarbonílicos alteran algunas funciones celulares. La modificación de las proteínas de la matriz extracelular causa interacciones anormales con otras proteínas de la matriz y con las integrinas. La modificación de las proteínas del plasma por los precursores AGEs crean enlaces que se acoplan con los receptores AGEs, induciendo cambios en la expresión del gen en las células endoteliales, mesangiales y macrófagos (194).

### **3.3 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo (EO) es el desequilibrio entre la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) altamente reactivos y el mecanismo de limpieza o de bloqueo natural de estas sustancias. Debido a la habilidad de los RLO de directamente oxidar y dañar DNA, proteínas, lípidos, se han asociado a los RLO con la patogénesis de algunas enfermedades humanas como la aterosclerosis, cáncer, Alzheimer o diabetes, entre otras (215). A continuación, se revisa brevemente el mecanismo de producción de los RLO en el organismo y los sistemas de defensa antioxidante que protegen contra el daño oxidativo de las macromoléculas.



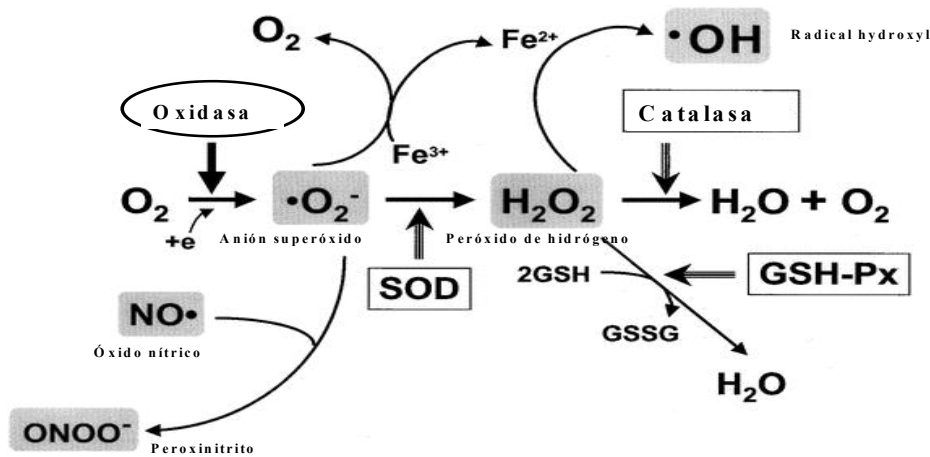
### 3.3.1 Bioquímica y origen de los radicales libres de oxígeno

¿Qué es un radical libre? Un átomo contiene un núcleo y los electrones se mueven alrededor del núcleo, usualmente apareados. Un radical libre es un átomo o molécula que contiene uno o más electrones no apareados. Estos electrones no apareados alteran la reactividad del átomo o molécula, haciéndolos más reactivos. El radical hidrógeno ( $H^\bullet$ ; contiene un protón y un electrón, por lo tanto no apareado) es el radical libre más simple. La reacción en cadena de los radicales libres se inicia por la sustracción de un  $H^\bullet$  desde otras moléculas (216).

En los organismos aeróbicos, el oxígeno ( $O_2$ ) es reducido a agua ( $H_2O$ ) al final de la cadena respiratoria mitocondrial. La molécula de  $O_2$  permanece ligada al complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial (ferrocitocromo c: oxígeno oxidoreductasa) hasta que este es reducido a  $H_2O$  por la transferencia de 4 electrones y 2 protones. Sin embargo, durante el progreso por las distintas fases en la cadena mitocondrial (complejos I, II i/o III) hay pérdidas de electrones sueltos principalmente desde las proteínas no heme hierro-sulfuro, produciendo reducción parcial del  $O_2$  a anión superóxido  $O_2^{\bullet-}$  que es un RLO. Este superóxido puede reducirse posteriormente por la adición de un segundo electrón y convertirse a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que no es un radical. La adición de un tercer electrón a la  $H_2O_2$  genera la formación del radical hidroxil ( $HO^\bullet$ ) que es el más reactivo y agresivo de los RLO.

El  $HO^\bullet$  puede también ser producido por dos importantes reacciones biológicas. La reacción de Fenton:  $H_2O_2 \longrightarrow H^\bullet + HO^\bullet$ , en la que  $H_2O_2$  se descompone por captar un electrón de un ión metal reducido y la reacción de Haber-Weiss:  $Fe^2 + H_2O_2 \longrightarrow Fe^3 + HO^\bullet + HO^-$ , en la que el  $HO^\bullet$  es generado por la interacción de  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ . El hierro (Fe) así como el cobre ( $Cu^+$ ) son los iones de metal de transición más comunes, por lo que la naturaleza del daño producido por estas reacciones dependerá de la disponibilidad y localización de estos iones. Otro radical libre fisiológico es el óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ), que es un importante agente vasodilatador, neuro-transmisor. Es sintetizado desde el aminoácido L-arginina y cuando reacciona con el oxígeno molecular se produce el  $NO_2^\bullet$  que es un RLO iniciando su efecto tóxico. Si el  $NO^\bullet$  reacciona con el  $O_2^{\bullet-}$  produce el peróxinitrito ( $ONOO^\bullet$ ) que ha sido implicado en la vasoconstricción de las células del músculo liso vascular y en la aterosclerosis. En condiciones

metabólicas normales, la pérdida de electrones desde la cadena respiratoria mitocondrial se produce continuamente durante el metabolismo aeróbico. Se estima que cerca de 1-3% del oxígeno que respiramos es convertido en  $O_2^{\bullet-}$ , por lo que cada célula del organismo esta expuesta a cerca de  $10^{10}$  moléculas de  $O_2^{\bullet-}$  cada día, generándose cada año más de 2 kg de  $O_2^{\bullet-}$  en el organismo (217;218).



**Figura 4:** La formación de superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) por mecanismos endógenos, inicia la formación de otros RLO (219).

### 3.3.2 Mecanismo de defensa antioxidante

El metabolismo aeróbico es el proceso principal para la generación de energía, pero está asociado a un proceso paradójico de generación de RLO, que si no son neutralizados con antioxidantes endógenos, puede alterar la integridad celular. El sistema de defensa antioxidante en el organismo es extenso y consiste de múltiples niveles que protegen en diferentes sitios y contra diferentes tipos de RLO. Estos mecanismos son diferentes en los compartimientos intracelular y extracelular y son de naturaleza enzimática y no enzimática. Los mecanismos enzimáticos intracelulares son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, y glutatión peroxidasa. La SOD cataliza la dismutación del superóxido en  $H_2O_2$  y oxígeno, estas enzimas se localizan en la mitocondria y el citosol. La catalasa elimina el peróxido de hidrógeno y se encuentra en los peroxisomas de muchos

tejidos. La glutatión peroxidasa elimina el peróxido de hidrógeno producido por la SOD en el citosol y la mitocondria. La proporción de las formas reducida y oxidada del glutatión es considerada como un índice de los eventos oxidativos celulares (índice GSH:GSSH).

Las proteínas que enlazan al hierro, las proteínas transportadoras de hierro y la albúmina presente en el plasma son ejemplos de antioxidantes extracelulares, porque disminuyen la concentración de hierro libre y por lo tanto reducen su potencial peroxídico. La ceruloplasmina es una glicoproteína que enlaza cobre con propiedades antioxidantes eliminando el superóxido a través de algunos mecanismos como, enlazando  $\text{Cu}^+$  para disminuir su oxidación y catalizando la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  por actuar como una enzima ferroxidasa. La vitamina liposoluble: alfa tocoferol (vitamina E) y la hidrosoluble: ácido ascórbico (vitamina C) protegen contra la peroxidación y actúan como antioxidantes citosólicos y extracelulares, respectivamente (216-218).

La tabla 7 muestra los principales RLO generado en los organismos aeróbicos y su mecanismo natural de defensa.

**Tabla 7:** Radicales libres de oxígeno y su mecanismo natural de defensa

Radicales libres de oxígeno	Mecanismo de defensa antioxidante
Radicales libres	
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Antioxidantes Enzimáticos
$\text{OH}^{\bullet}$	SOD
$\text{ROO}^{\bullet}$	Superóxido de dismutasa $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
$\text{NO}^{\bullet}$	CAT
$\text{NO}_2^{\bullet}$	Catalasa $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$
$\text{ONOO}^-$	GTP
	Glutatión peroxidasa $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$
No - Radicales	$2\text{GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + 2\text{H}_2\text{O}$

		Antioxidantes No-Enzimáticos	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno	Vitamina A	
HOCl	Ácido hipocloroso	Vitamina C	(ácido ascórbico)
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito	Vitamina E	( $\alpha$ -tocoferol)
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno libre	$\beta$ -caroteno	
		Ácido Úrico	
		Flavonoides	
		Sulfidrilos	

*El punto negro en superíndice indica un electrón no apareado; la carga negativa indica un electrón ganado; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; <sup>1</sup> El oxígeno libre es una molécula inestable debido a los dos electrones presentes en su órbita externa que giran en direcciones opuestas (217).*

### 3.3.3 Cuantificación y caracterización del estrés oxidativo

Los RLO son sustancias evanescentes, por lo que lógicamente, su estimación dentro de los sistemas integrados como modelos animales y humanos es compleja. Para valorar la lesión mediada por RLO o la generación de RLO *in vivo* se han desarrollado una gran variedad de índices. Sin embargo, la literatura médica inicial ha sido confusa, probablemente por las propias limitaciones de la metodología ex-vivo o intrínseca del abordaje específico utilizado, debido a que muchos de estos abordajes miden cambios tisulares que son consistentes con un proceso oxidativo pero no siempre específico de los RLO. El incremento de la generación de los RLO, puede reflejar simplemente mecanismos homeostáticos o cambios que no son tóxicos a las células y, la capacidad para detectar elevado EO previo a, o concomitante con, lesión celular es consistente con un papel de estas sustancias en el daño. Pero, esto no establece una relación causa-efecto. Finalmente, la generación de los RLO puede producir modificaciones de muchas macromoléculas como los lípidos, las proteínas o el DNA, pero la cuantificación de la generación de los RLO se ha enfocado solo en una sustancia dentro de esta amplia categoría. Por lo tanto, es evidente que hay una creciente necesidad del desarrollo de biomarcadores del EO (220).

Entre los sustratos del ataque por los RLO, uno de los que más extensamente han sido estudiados son los lípidos por la fácil accesibilidad que tienen muchos investigadores para estimar la peroxidación lipídica. Se especula que la oxidación de las lipoproteínas, específicamente el colesterol-LDL, desempeña un papel patogénico importante en la aterosclerosis. La medición de

productos de la oxidación en tejidos, plasma y orina, ha sido utilizado en estudios clínicos para reflejar la peroxidación lipídica *in vivo*. Los peróxidos lipídicos son compuestos inestables que se degradan rápidamente en una variedad de productos, como los alcanos de cadena corta y los aldehídos. Ejemplos de estos productos intermedios o finales de la peroxidación lipídica que han sido utilizados en estudios clínicos incluyen la medición de aldehídos citotóxicos, de dienes conjugados, sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) e isoprostanos.

### **3.3.3.1 Aldehídos**

Siguiendo la peroxidación de los ácidos grasos poli-insaturados omega  $\omega_3$  y  $\omega_6$  (PUFA<sub>s</sub>), que son hidroperóxidos de ácidos grasos inestables estos son convertidos en aldehídos más estables. Los aldehídos más abundantes formados siguiendo a la peroxidación del  $\omega_6$  son el 4-hidroxinonal (4-HNE) y el hexanal y del  $\omega_3$  son el propanol y el 4-hidroxihexanal. Estos productos son los aldehídos más prevalentes detectados en los tejidos biológicos. Los aldehídos han sido asociados con alteraciones de la viabilidad celular. El 4-HNE ha sido relacionado con la muerte celular, ya que se ha observado que concentraciones milimolares son agudamente citotóxicos en las células de los mamíferos, producen depleción del glutatión, inducen incremento de la peroxidación lipídica, inhiben la síntesis del DNA, RNA y proteínas, e inhiben la respiración y la glicólisis. Estos intermediarios altamente reactivos se enlazan a receptores y moléculas de señalización modificando su función. Teóricamente, estos aldehídos son relativamente estables y por lo tanto son capaces de difundir fuera de la célula y lesionar objetivos distantes de su sitio de origen. Las proteínas modificadas por el HNE, probablemente derivadas del colesterol-LDL, se han observado en el ateroma de conejos con hiperlipidemia, así como también, se han detectado autoanticuerpos contra las proteínas modificadas por el HNE en el plasma tanto de conejos y de humanos con hiperlipidemia. Estos aldehídos pueden ser medidos por métodos altamente específicos y sensibles como la cromatografía de gas y la espectrometría de masa (GC/MS). Una de las principales limitaciones con algunos abordajes para medir los aldehídos es que muchos de los preparados comerciales de solventes orgánicos para la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) contienen aldehídos contaminantes (220-223).

### ***Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico***

Otro de los índices de la peroxidación lipídica ampliamente utilizados es la medición del malondialdehído (MDA) por el análisis de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). La muestra para analizar es calentada con TBARS en un pH bajo, el cromógeno resultante es medido por absorbancia a 532 nm o por fluorescencia a 553 nm. Los análisis de TBARS son muy fidedignos cuando se aplican a sistemas definidos como los liposomas o microsomas, pero su aplicación a líquidos corporales o muestras tisulares disminuye su exactitud. Primero, otros aldehídos diferentes del MDA, pueden formar cromógenos con absorbancia a 532 nm y muchos aldehídos diferentes son generados durante la peroxidación lipídica. Segundo, los análisis de TBARS raramente miden el contenido de MDA libre del sistema lipídico, si no que, mide el MDA generado por descomposición de los peróxidos lipídicos durante el proceso de calentamiento del ácido durante el análisis. Tercero, otras sustancias como los azúcares, aminoácidos y bilirrubina son también reactivos al TBA. La sensibilidad de este análisis puede aumentarse combinando este con HPLC para separar estos compuestos previos al calentamiento del ácido, a pesar de lo cual, las condiciones imperfectas de este último paso continúan. La aplicación de análisis de GC/MS para la determinación del MDA ha demostrado que los análisis más utilizados de TBARS sobreestiman en más de 10 veces los niveles de MDA, debido posiblemente a la reactividad cruzada con otros aldehídos o a las condiciones inadecuadas usadas en la preparación de la muestra. Finalmente, el MDA no refleja realmente la peroxidación lipídica ya que es un bio-producto de la actividad en las plaquetas y muchos de los síndromes clínicos asociados con aumento de la peroxidación lipídica cursan con una persistente activación de las plaquetas *in vivo*. A pesar, del desarrollo de técnicas más refinadas para la medición del MDA, la utilidad clínica de esta medición como índice de la peroxidación lipídica es discutible (220;223-225).

### ***Dienes conjugados***

La peroxidación de los ácidos grasos no saturados se acompaña de la formación de dienes conjugados que absorben luz ultravioleta a 230-235 nm. La medición de la absorbancia es útil en estudios *ex vivo* de lípidos puros, reflejando

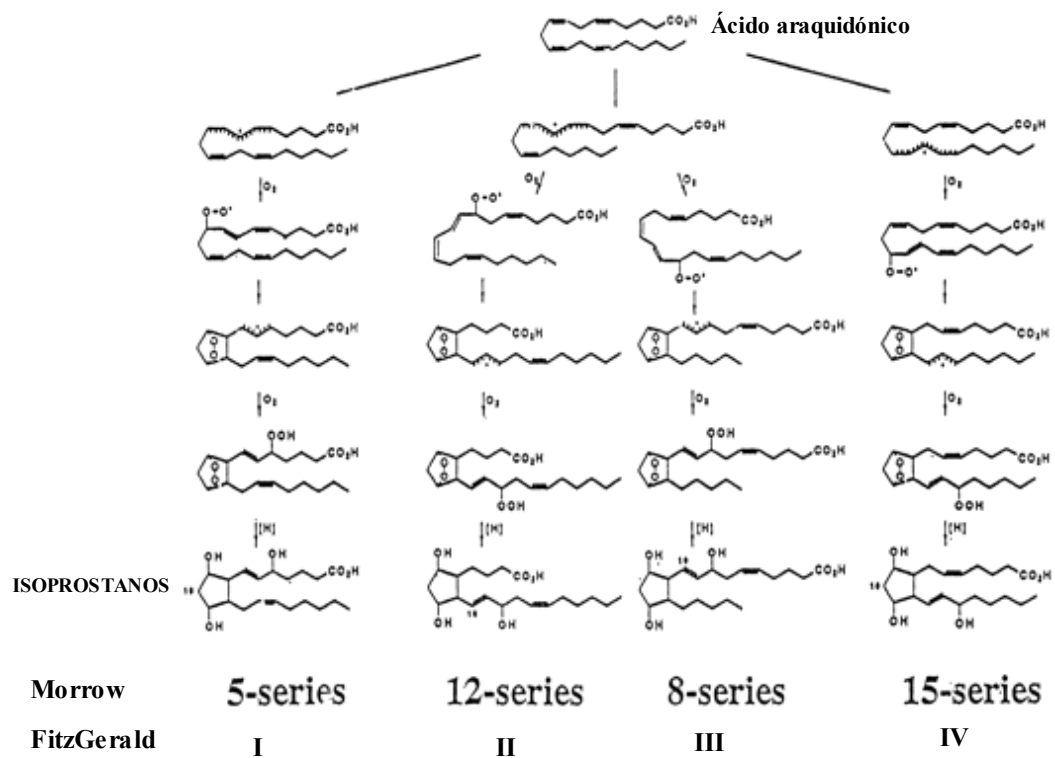
un estadio inicial del proceso de peroxidación. Sin embargo, la aplicación de esta metodología a extractos lipídicos de muestras humanas en líquidos corporales probablemente resulte imprecisa. Por ejemplo, la absorción en este rango no es específica para la presencia de productos de peroxidación lipídica. En un intento para disminuir esta dificultad se ha usado el HPLC para separar los dienes conjugados que absorben luz ultravioleta de una muestra biológica. Una limitación más de esta metodología es que la generación de los dienes continúa produciéndose *ex vivo* tras la obtención de la muestra (226;227).

### **3.3.3.2 Isoprostanos**

Por lo expuesto anteriormente, la disponibilidad de un abordaje fidedigno y no invasivo para valorar el EO en humanos es una prioridad en el campo de la investigación de los RLO, ya que los métodos descritos previamente carecen de especificidad, sensibilidad o son demasiados invasivos para la investigación en humanos. En 1990 Morrow et al, describieron la formación de compuestos similares a la prostaglandina  $F_2$  *en vivo* en humanos producidos por la peroxidación no-enzimática inducida por los RLO del ácido araquidónico, que es un ácido graso poli-insaturado ampliamente distribuido en el organismo. Estos autores denominaron a estos compuestos isoprostanos (IsoP<sub>s</sub>-F<sub>2</sub>). A diferencia de las prostaglandinas (PG<sub>s</sub>) las cuales están formadas por la acción de enzimas ciclooxigenasas, los IsoP<sub>s</sub>-F<sub>2</sub> se generan como un resultado de la peroxidación mediada por RLO del ácido araquidónico independiente de esta enzima (228). El origen de los RLO que contribuyen a la formación de los IsoP<sub>s</sub>-F<sub>2</sub> *in vivo* es múltiple. Esto incluye: la generación y transformación de RLO, como el superóxido y el radical hidroxil, desde el sistema de transporte de electrones mitocondrial y de la familia P450 de enzimas que metabolizan los fármacos, la generación de superóxido por las oxidasas de NADPH, del radical hidroxiperoxy a partir de las lipooxigenasas y la formación catalizada por metales de transición de los RLO, entre otros (229).

El mecanismo por el cual estos componentes se producen está representado en la figura 5, y se basa en los principios químicos propuestos por Pyor, Porter y otros, de la generación de intermediarios biciclo-endoperóxidos producidos por la peroxidación de otros ácidos grasos poli-insaturados. El ácido araquidónico inicial que se muestra al principio de la figura, sufre en un primer momento de la

abstracción<sup>1</sup> de un átomo de hidrógeno bis-alílico<sup>2</sup> para producir un radical araquidonyl, la adición posterior de una molécula de oxígeno a este radical produce un radical peroxil. Dependiendo del sitio de la abstracción y la inserción de la molécula de oxígeno, se forman 4 diferentes isómeros<sup>3</sup> de radical peroxy. Seguidamente estos radicales sufren endociclización<sup>4</sup> y otra molécula de oxígeno se añade para formar compuestos similares a las PGG<sub>2</sub> (regio-isómeros endoperóxidos<sup>5</sup>). Estos intermediarios son entonces reducidos a IsoP<sub>s</sub>-F<sub>2</sub>, formándose cuatro regio-isómeros que se denominan como serie 5, 12, 8 o 15 dependiendo del átomo de carbono al cual la cadena hydroxyl está unida. Cada uno de los 4 regio-isómeros puede teóricamente estar formado de 8 diastereo-isómeros racémicos<sup>1</sup>. De este modo, un total de 64 diferentes compuestos pueden ser originados por este proceso (230;231).



<sup>1</sup> Abstracción: separación de los constituyentes volátiles de una sustancia

<sup>2</sup> Bis: presencia de dos grupos complejos idénticos, pero separados, en una molécula; Alílico: radical monovalente

<sup>3</sup> Isómeros: relativo a isomerismo; Isomerismo: Existencia de un compuesto químico en dos o más formas idénticas en el porcentaje de su composición, pero que diferentes por la posición de los átomos dentro de la molécula y por sus propiedades físicas y químicas

<sup>4</sup> Endociclización: incorporación dentro de un ciclo molecular.

<sup>5</sup> Regio-isómero: uno de los tipos de isomerismos constitucional: el posicional o regio isómero



**Figura 5:** Mecanismo de formación de los  $F_2$ -IsoP<sub>s</sub> (232)

Debido a que los compuestos resultantes son isómeros a la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  formada por la ciclooxigenasa, estos compuestos han sido denominados  $F_2$ -isoprostanos. Su clasificación está basada en el sistema de nomenclatura para IsoP<sub>s</sub> aprobado por el Comité de Nomenclatura Eicosanoide, y ratificada por la “Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)” (233). Un sistema de clasificación adicional ha sido propuesto por FitzGerald et al, en el cual la abreviación iP es utilizada para los isoprostanos, y los regio-isómeros son designados de III a VI basados en su estructura (234). La existencia de dos sistemas de nomenclatura ha hecho que la comprensión de los  $F_2$ -IsoP<sub>s</sub> sea complicada sobre todo para aquellos que como yo, no somos eruditos en este campo. Existen también  $F_2$ -IsoP<sub>s</sub> que contienen estructuras de anillo alternativas (como los que son similares a PGD<sub>2</sub>/E<sub>2</sub> y PGA<sub>2</sub>/I<sub>2</sub>) y que también pueden ser producidos por este mecanismo. Sin embargo, los  $F_2$ -IsoP<sub>s</sub> han sido la clase de IsoP<sub>s</sub> más estudiada, y debido a su estabilidad, proporciona una mayor exactitud en la medición del EO.

Una importante distinción estructural entre los IsoP<sub>s</sub> y las PG<sub>s</sub> derivadas de la ciclooxigenasa y que condiciona diferencias en las actividades biológicas, es que los IsoP<sub>s</sub> contienen cadenas laterales que son predominantemente orientadas *Cis*<sup>2</sup> al anillo de propano, mientras que, las PG<sub>s</sub> tienen solo cadenas laterales con orientación *Trans*<sup>1</sup>. Otra diferencia importante entre los IsoP<sub>s</sub> y las PG<sub>s</sub> es que los IsoP<sub>s</sub> están formados in situ esterificados a los fosfolípidos y son subsecuentemente liberados por una fosfolipasa(s), mientras que, las PG<sub>s</sub> se generan únicamente a partir del ácido araquidónico libre. Las fosfolipasa(s) responsable de la hidrólisis de los IsoP<sub>s</sub> desde los fosfolípidos es/son aún desconocidas (235-237).

Métodos para cuantificar los  $F_2$ -IsoP<sub>s</sub>

<sup>1</sup> Diastereoisómeros: son isómeros con más de un centro quiral, hay dos potenciales diastereoisómeros por cada centro quiral. Quiralidad: propiedad de no-identidad de un objeto con su imagen en un espejo

<sup>2</sup> Cis: forma de isomerismo en la que grupos funcionales similares están unidos al mismo lado del plano que incluye dos átomos de carbono fijos adyacentes

En la última década, se han desarrollado algunos métodos para la medición de los F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub>. Morrow et al, han utilizado la cromatografía de gas y la espectrometría de masas con ionización química de ión negativo (GC/MS) con el cual midieron los F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub>, 15F<sub>2t</sub>-isoP ( 8-iso-PGF<sub>2α</sub>) y otros F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub> que co-eluieron<sup>2</sup> en la CG con este componente (238). Otros investigadores, han cuantificado diferentes isómeros de F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub> (239). Algunos preparados comerciales de estándares internos están disponibles para cuantificar los F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub>. Estos incluyen [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] 15-F<sub>2t</sub>-IsoP y [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-PGF<sub>2α</sub>. Las ventajas de la espectrometría de masa sobre los otros métodos incluyen su elevada especificidad y sensibilidad, con la obtención de resultados cuantitativos en el rango mínimo de pico gramo. En contraposición, su principal desventaja, es que es una técnica muy laboriosa que precisa equipamientos sofisticados y caros, por lo que generalmente este método solo se realiza en grandes laboratorios de investigación, no encontrándose al alcance de todos los investigadores (238).

Algunas alternativas a la espectrometría de masa han sido desarrolladas por diferentes investigadores, incluyendo a FitzGerald et al (239;240). De manera similar, al método para medir 15-F<sub>2t</sub>-IsoP, estos métodos requieren la extracción de una fase sólida utilizando una columna C18, purificación a través de cromatografía en capa fina y derivatización<sup>1</sup> química. Posteriormente, los IsoP<sub>s</sub> son medidos utilizando técnicas de dilución isotópica usando la GC/MS con ionización química de ión negativo. Pero estos análisis miden otros isómeros de F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub>, distintos del 15-F<sub>2</sub>-IsoP, incluyendo el iPF<sub>2α</sub>-IV ( que es el 8-F<sub>2</sub>-IsoP) o iPF<sub>2α</sub>-VI (que es el 5-F<sub>2</sub>-IsoP), existen también estándares disponibles comercialmente para estos compuestos. En general, los diferentes métodos son comparables. Se han desarrollado métodos alternativos a la MS para cuantificar los F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub> utilizando técnicas inmunológicas (241). Esta metodología utiliza anticuerpos contra 15-F<sub>2t</sub>-IsoP disponiéndose en la actualidad de por lo menos 3 series de análisis que están comercializados. Las principales desventajas de este método son que hasta el momento, hay escasa información acerca de su precisión y exactitud y además hay pocos datos comparando los niveles de IsoP<sub>s</sub> cuantificados por immunoanálisis y por MS. De manera similar que para los métodos que cuantifican PG<sub>s</sub>, los immunoanálisis de los IsoP<sub>s</sub> es posible que

---

<sup>1</sup> Trans: forma de isomería en la cual los átomos fijados a dos átomos de carbono unidos mediante un doble enlace están situados en lados opuestos de la molécula

<sup>2</sup> Eluido: sustancia separada de una columna absorbente en cromatografía; Elusión: extracción con un solvente apropiado de un material con respecto a otro insoluble en ese solvente

carezcan de especificidad. Además la especificidad y la sensibilidad de los diferentes preparados comerciales varían entre los distintos fabricantes. Aunque si bien los métodos de MS para la medición de los IsoP<sub>s</sub> son considerados el “*gold standard*”, los inmunoanálisis han difundido la investigación en esta área por su bajo costo y fácil manejo. Recientemente, algunos investigadores han generado anticuerpos policlonales y han desarrollado análisis para la medición del 15-F<sub>2t</sub>-IsoP<sub>s</sub>. Cuando se comparan con el abordaje mediante MS, hay una buena correlación entre estos métodos y la MS, causado al menos en parte, por un proceso más amplio de purificación de los líquidos biológicos que estos investigadores realizan antes del inmunoanálisis (242;243).

#### Cuantificación de los IsoP<sub>s</sub> en los fluidos biológicos

Es importante indicar que los IsoP<sub>s</sub> pueden medirse en los fluidos biológicos como sangre y orina (238). Actualmente, los IsoP<sub>s</sub> se han detectados en todos los tejidos humanos y fluidos evaluados, y esto es particularmente importante, ya que permite la valoración de los efectos de enfermedades como la aterosclerosis sobre la situación oxidante endógena (241). Además definir los niveles de IsoP<sub>s</sub> *in vivo* es importante porque permitiría la valoración de la extensión en la cual las intervenciones terapéuticas influyen sobre los niveles de EO.

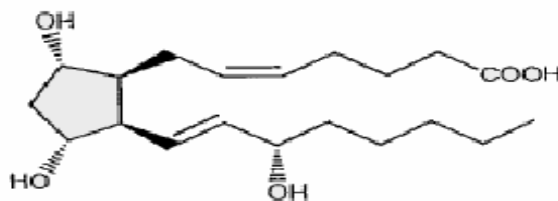
Para estudios en humanos, la medición de los IsoP<sub>s</sub> en los fluidos corporales como orina y plasma es significativamente más conveniente y menos invasivo que la medición de estos componentes en tejidos orgánicos. Basados en los datos disponibles, la medición de los F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub> tanto en plasma como en orina es un índice preciso y exacto del EO (229;232;241). Además, para la valoración integrada de la producción de los IsoP<sub>s</sub> *in vivo* es preferible las muestras recogidas durante 24 horas que muestras aisladas de orina, ya que se ha descrito una variación diurna individual de la excreción de los IsoP<sub>s</sub> en humanos, aunque esta variación no se ha encontrado cuando las poblaciones son evaluadas como grupo (244). La valoración más exacta de la producción *in vivo* de las PG<sub>s</sub> es la medición de los metabolitos excretados en orina en vez de la medición de la PG<sub>s</sub> original. Esto se origina, en el hecho de que las PG<sub>s</sub> originales derivan en gran parte del riñón. Morrow et al, han demostrado que el mayor metabolito urinario

---

<sup>1</sup> Derivatización química: proceso en el que se añade otra sustancia a la molécula para hacerla termo-estable

del 15-F<sub>2t</sub>-IsoP es el 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F<sub>2t</sub>-IsoP y han desarrollado un análisis mediante GC/MS para medirlo con precisión. Sin embargo, actualmente no hay evidencia de que la cuantificación de este metabolito ofrezca una ventaja adicional a la cuantificación de los IsoP<sub>s</sub> originales (245;246). Otro punto importante con relación a la cuantificación de los IsoP<sub>s</sub> en los fluidos biológicos es que el nivel en un tejido particular probablemente represente un estado de equilibrio que es dependiente de la producción (grado del EO), de su metabolismo y excreción (241). Morrow et al, han evaluado la extensión por la cual la disfunción hepática y renal contribuye al incremento de los niveles circulantes de IsoP<sub>s</sub>, observando que incluso en situaciones de severa disfunción orgánica, se produce el metabolismo rápido de los IsoP<sub>s</sub> originales. Por lo tanto, estos datos evidencian que las concentraciones de F<sub>2</sub>-isoP circulantes son principalmente dependientes de la producción mejor que de su metabolismo y excreción, lo que sugiere que los IsoP<sub>s</sub> son verdaderamente indicadores del EO *in vivo* (232;238).

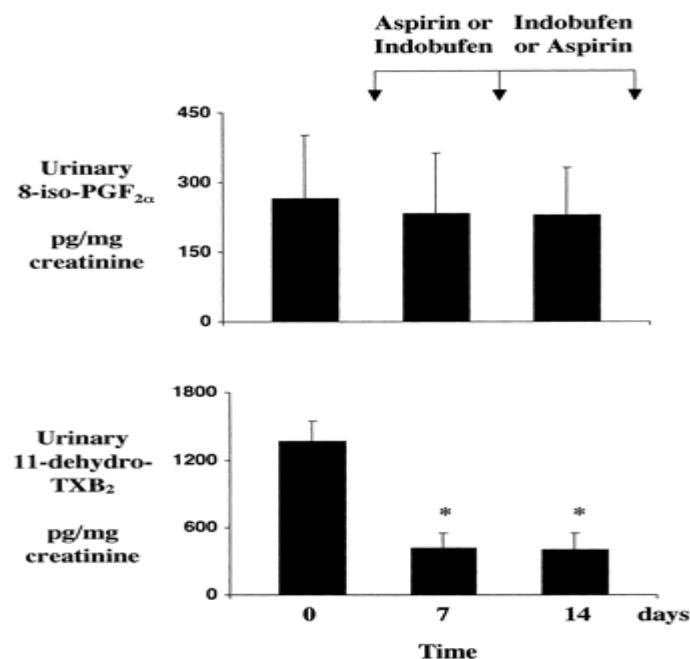
Debido a que el 8-iso-PGF<sub>2α</sub> representa el componente más abundante de los F<sub>2</sub>IsoP totales medido en plasma y orina, se han desarrollado análisis específicos para su determinación por lo que es el más extensamente estudiado. Se ha observado que este compuesto tiene importante efectos biológicos, es un potente vasoconstrictor (247) e induce la síntesis de DNA en las células del músculo liso vascular, probablemente a través de su interacción con receptores de TXA<sub>2</sub> (248), así como que activa los receptores de PGF<sub>2α</sub> y estimula la respuesta proliferativa en los fibroblastos (249). Figura 6



**Figura 6:** Estructura del IsoP, 8-epi-PGF<sub>2α</sub> también denominado 15-F<sub>2t</sub>-IsoP e iPF<sub>2</sub>

La formación de los IsoP<sub>s</sub> en la capa de fosfolípidos puede modificar la función celular y su transformación subsiguiente es posible que libere compuestos como el 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, que puedan modificar aspectos de la función de las

plaquetas como las reacciones de adhesividad. La formación de IsoP<sub>s</sub> en los monócitos puede modificar aspectos de su función como la expresión de los factores tisulares. Su formación en las partículas de LDL oxidadas puede hacer que aumente su captación por los macrófagos, y por lo tanto que genere un estímulo para la formación de las células espumosas. Los IsoP<sub>s</sub> pueden también modificar la función de las células del músculo liso vascular así como el acumulo de éstas células en las placas arterioscleróticas (250). La concentración de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en el rango de 1nmol/L - 1μmol/L induce un incremento dosis dependiente en el cambio de la forma de las plaquetas, de la liberación de calcio desde las reservas intracelulares y de fosfato de inositol (251;252). Además, se ha demostrado que el 8-iso-PGF<sub>2α</sub> causa una agregación plaquetaria irreversible en presencia de concentraciones de colágeno, ADP, ácido araquidónico y análogos de PGH<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> y que cuando actúan por separado no son capaces de provocar agregación plaquetaria (252). Estos efectos se han visto que pueden ser bloqueados por antagonistas de los receptores de PGH<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> (253). La capacidad del 8-iso-PGF<sub>2α</sub> para amplificar la respuesta de agregación a pesar de su pequeña concentración es de importancia en patologías como la DM en la que coincide una persistente activación de las plaquetas y un incremento en la formación de RLO. Los estudios realizados de la generación de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> excluyen una contribución significativa de su formación *in vivo* por un mecanismo dependiente de la ciclooxigenasa. Esto es sustentado por la observación de que la aspirina y otros inhibidores no específicos de la ciclooxigenasa, no tienen efectos sobre la excreción urinaria de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en sujetos con DM (254). Figura 7



**Figura 7:** Excreción urinaria de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (en la parte superior) y de 11-dehidro-TXB<sub>2</sub> (en la parte inferior) antes y después de la inhibición de la ciclooxigenasa con aspirina (500 mg/día) e idobufen (200 mg/ 2 veces día). Las barras sólidas representan la media ± 1 DS de los valores del grupo total de pacientes con DM. Como puede verse la inhibición de la ciclooxigenasa no indujo cambios detectables en la excreción urinaria de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (254).

*F<sub>2</sub>-IsoPs como índice del estrés oxidativo in vivo*

El estudio “Biomarkers of Oxidative Stress Study” (BOSS) financiado por el National Institutes of Health, ha demostrado que la administración de carbón tetracloruro en ratas, un modelo animal bien aceptado de EO, que los IsoP son el mejor índice de injuria oxidativa. En este estudio realizado por investigadores líderes en EO, se evaluó la utilidad de cuantificar un número de biomarcadores de EO. Estos autores concluyeron que los IsoP<sub>s</sub> ofrecen el mejor abordaje para la cuantificación exacta de la injuria oxidativa *in vivo*, pero el mayor poder de este estudio, es que por primera vez se compararon cara a cara y de una manera controlada los diferentes biomarcadores (255;256). La medición de los F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub> ha permitido por primera vez, sugerir el papel de los RLO en la patogénesis de numerosas enfermedades, Tabla 8. En esta tesis nos centraremos principalmente en la información disponible de la asociación de los F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub> en la DM ( ver más adelante)

**Tabla 8:** Enfermedades en las cuales la medición de los niveles de F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub> han implicado un papel a los RLO en la patogénesis de la enfermedad (232).

Diabetes mellitus	Lesión renal por rabdomiolisis
Consumo de tabaco	Colestasis aguda
Enfermedad de Alzheimer	Síndrome del distrés respiratorio del adulto
Enfermedad de Huntington	Hepatotóxicidad por halotano
Hipercolesterolemia y aterosclerosis	Intoxicación por acetaminofén
Hiperhomocistinemia	Lesión isquemia/reperfusión
Síndrome Hepato-renal	Intoxicación por cromo
Esclerodermia	Intoxicación por diquat (herbicida)
Insuficiencia renal	Lesión renal secundaria a Cimplastino

Deficiencia de Selenio	Lesión del órgano transplantado durante la preservación en frío
Deficiencia de vitamina E	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
Retinopatía en prematuros	Enfermedad pulmonar intersticial
Hepatopatía enólica	Intoxicación por órganos fosforados
Asma alérgica	Hepatotoxicidad inducida por CCl <sub>4</sub>

---

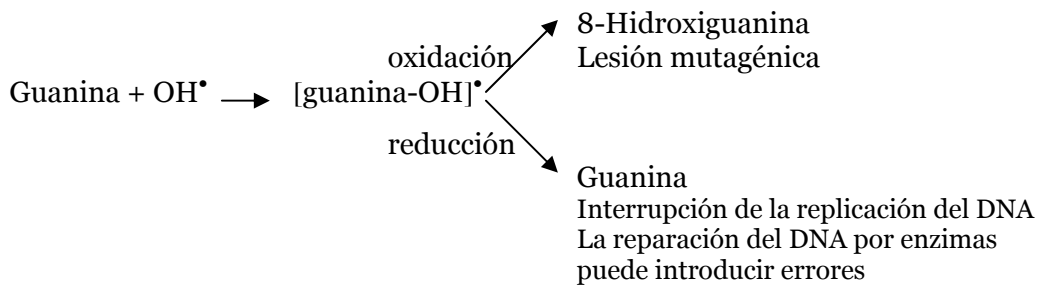
### **3.3.3 Oxidación de las proteínas**

Otras de las macromoléculas que pueden sufrir el ataque de los RLO son las proteínas, induciendo cambios estructurales o pérdida de la actividad enzimática. Las proteínas modificadas como las proteínas carboxyl y los amino ácidos modificados (carboximetil y el carboxietil lisina) pueden también generarse por el ataque de los RLO sobre las proteínas. El incremento de estas proteínas ha sido descrito en el cristalino y en el humor vítreo de sujetos con DM. El Glioxal y la arabinosa son los más abundantes productos de la autooxidación de la glucosa. El glioxal puede formar el *N-ε-(carboximetil) lisina* que participa en la generación de los enlaces cruzados de pentosidina fluorescente en las proteínas. El *N-ε-(carboximetil)lisina* se acumula en la pared arterial, así como en el suero y especialmente en sujetos con DM en donde su producción puede ser atenuada por la SOD, catalasa, vitamina E y desferrosamina. El ascorbato y los azúcares dicarbonílicos como el metilglioxal y la 3-deoxiglucosona que se observan *in vivo*, participan en las reacciones autooxidativas. La evidencia actual, se dirige hacia un papel significativo de la autooxidación de los azúcares, tanto libre o ligados a las proteínas, en la patogénesis de las complicaciones de la DM (257;258).

### **Oxidación del DNA**

La injuria oxidativa al DNA ocurre muy frecuentemente bajo condiciones metabólicas normales. Se estima que el DNA en cada célula en nuestro organismo es expuesto a 10<sup>4</sup> lesiones oxidativas cada día, lo cual produce la formación de más de 20 diferentes lesiones oxidativas del DNA. Muchas de estas lesiones se conocen que son mutagénicas, además, hay un número de enzimas reparadoras

del DNA como las exonucleasas, las endonucleasas y glicosilasas específicas que pueden eliminar estas lesiones. Sin embargo, los sistemas de reparación no son perfectos. Aunque estos sistemas pueden eliminar cerca del 99% de estas lesiones, queda un 1%, que permite que estas lesiones se acumulen con el tiempo. Por lo tanto, el daño oxidativo del DNA y las mutaciones acumuladas con la edad, puede contribuir a la carcinogénesis y a otras enfermedades degenerativas. El radical hidroxilo ataca al DNA y el producto generado de este ataque ha sido caracterizado y es el: 8-hidroxy-2'-deoxy-guanosina (8-OHdG) que es fácilmente detectado en la orina (259). Figura 8



**Figura 8:** Ataque del radical hidroxilo a la guanina en el DNA

### 3.3.3.4 Capacidad antioxidante

Un antioxidante es cualquier sustancia que, aunque esté presente en bajas concentraciones comparada con los niveles de un sustrato oxidable, sea capaz de demorar o inhibir de forma significativa la oxidación de ese sustrato. Los antioxidantes pueden actuar a varios niveles dentro de la secuencia oxidativa.

1. Disminuyendo las concentraciones de O<sub>2</sub> (al combinarse con otra molécula de O<sub>2</sub> o desplazándolo)
2. Previniendo la iniciación de la peroxidación mediante la eliminación de sustancias capaces de realizar la abstracción de átomos de hidrógeno.
3. Eliminando el O<sub>2</sub> libre, que puede reaccionar directamente con la membrana de los lípidos para generar peróxidos.
4. Enlazando los iones de metal en formas que no generen RLO (como ferryl, o Fe<sup>2+</sup>/F<sup>3+</sup>).
5. Removiendo peróxidos para convertirlos a productos no radicales, como los alcoholes.



6. Rompiendo la secuencia de las reacciones. Los antioxidantes que rompen estas secuencias son con frecuencia fenoles, aminas aromáticas y el  $\alpha$ -tocoferol.

Otro método de medir el EO en el organismo es a través de la valoración de la capacidad antioxidante del plasma. El método inicial fue denominado como “ *Análisis de los parámetros antioxidantes de atrapamiento radical total*” (TRAP). Con este método un sistema que genera RLO es calibrado contra un análogo de vitamina E soluble en agua (Trolox C). La producción de los RLO producirá una reducción de la emisión fluorescente, pero la adición de Trolox C producirá un retraso (lag) en la reducción fluorescente como un resultado de la eliminación de los RLO. El tiempo de retraso de esta reacción se compara con el tiempo de retraso producido por una muestra de plasma humano que puede cuantificarse por curvas estándares. Este método ha sido modificado y se lo denomina análisis del poder antioxidante de reducción férrica, que está disponible comercialmente. Con este método a diferencia de la medición de antioxidantes individuales ( por ej. Vitamina E, ácido ascórbico, ácido úrico, etc.), tiene en cuenta los antioxidantes conocidos y desconocidos presentes en el plasma así como su sinergismo (223;260).

### **3.3.4 *Papel del estrés oxidativo en las complicaciones crónicas de la DM***

En la DM, se han sugerido varios mecanismos que pueden contribuir a la formación de los RLO. Se piensa que la oxidación de la glucosa es el principal origen de los RLO. En la forma enediol<sup>1</sup> de la glucosa, esta se oxida a través de una reacción dependiente de metal de transición a un anión radical enediol que es posteriormente transformado a cetoaldehídos reactivos y a radicales  $O_2^{\bullet-}$ . El  $O_2^{\bullet-}$  sufre posteriormente dismutación<sup>2</sup> a  $H_2O_2$ , que si no es degradada por las enzimas antioxidantes catalasa y GTP, en presencia de metales de transición iniciará la generación de radicales  $OH^{\bullet}$  altamente reactivos (261;262). El  $O_2^{\bullet-}$  puede también reaccionar con el óxido nítrico generando peroxinitrito. También se ha establecido que la hiperglucemia promueve la peroxidación lipídica de las lipoproteínas LDL mediada por el  $O_2^{\bullet-}$ , generando RLO. Otro origen importante

---

<sup>1</sup> Enediol: forma especial de enolización; Enolización: conversión de una forma ceto a una forma enol

<sup>2</sup> Dismutación: reacción que incluye una sola sustancia

de RLO en la DM es la interacción de glucosa con las proteínas iniciando la formación de productos Amadori que a su vez generan AGE<sub>s</sub>, y como previamente he explicado, estos AGE<sub>s</sub> a través de su enlace con sus receptores (RAGE<sub>s</sub>) inactivan enzimas, que alteran la función y estructura de las proteínas, lo que promueve la formación de RLO y el efecto antiproliferativo del óxido nítrico (203;204). Además el EO se ha asociado con una disminución de los niveles de glutatión y depleción de los niveles de NADPH que es el principal cofactor de la conversión de glucosa a sorbitol en la vía de los polioles, lo que provoca un desequilibrio entre el NADH/NAD<sup>+</sup>, favoreciendo la generación de RLO y como fue expresado antes, hay numerosa evidencia que asocia a la activación de la vía de sorbitol por la glucosa como un componente en la patogénesis de las complicaciones crónicas (189).

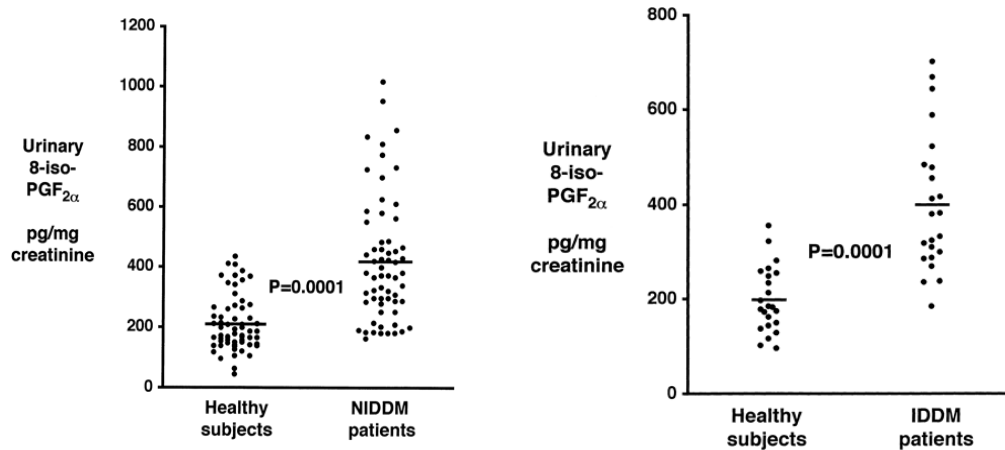
### ***Peroxidación lipídica en la DM***

En estudios experimentales se ha demostrado que, la inducción de la DM con estreptozotocina o alloxan en ratas, incrementa los TBARS. En estos animales se han testado varios componentes como antioxidantes para evitar la formación del OH<sup>•</sup> con resultados variables. Por ejemplo, se ha visto que el aumento de los TBARS asociado con la DM se previene con el tratamiento con nicotinamida, melatonina, probucol, aminoguanidina, captopril, enalapril, si este tratamiento es administrado antes o inmediatamente después del agente diabético. Incluso cuando la DM está ya establecida puede ser revertida por el tratamiento combinado con Vitamina C, E y β-caroteno (263). En estudios humanos, utilizando la determinación del ácido MDA se ha demostrado un incremento de la peroxidación lipídica en leucocitos tanto de pacientes con DM2 (264), como en pacientes con DM1 (265). De igual manera las concentraciones de dienes conjugados, peróxidos lipídicos y una disminución de los TRAP han sido descritos elevados en pacientes con DM1 (266).

### ***Generación de isoprostanos en la DM***

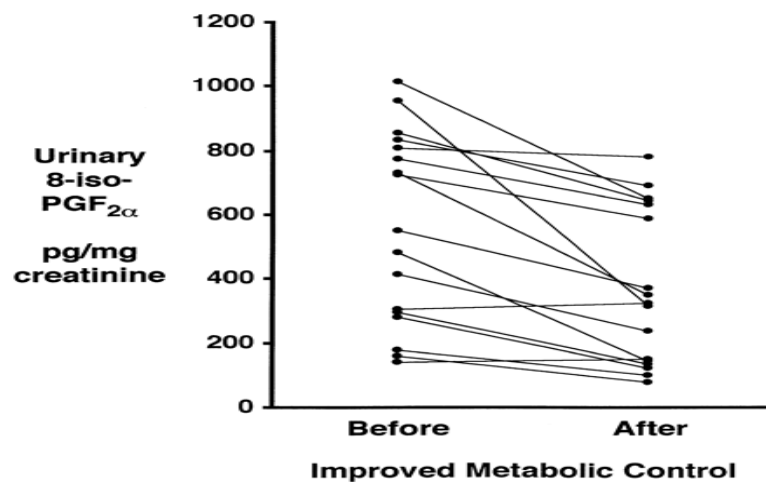
La generación de F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub> es inducida *in vitro* en las células del músculo liso vascular por niveles de glucemia elevados, por este motivo varios investigadores exploraron la posibilidad de aumento del EO en los pacientes con DM (267). En la actualidad existe pocos estudios y han sido realizados en los

últimos 5 años, en los que se ha evaluado la formación de IsoP<sub>s</sub> en la DM. Utilizando un radioinmunoensayo específico, Davi et al, observaron que la excreción urinaria de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> tanto en pacientes adultos con DM1 y DM2, era el doble de la que se observó en sujetos controles sanos de similar edad (Figura 9).



**Figura 9:** Excreción urinaria de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en paciente con DM2 (figura de la izquierda) y 23 pacientes con DM1 (figura de la derecha) comparado con sujetos controles sanos. Los puntos representan mediciones individuales y las barras horizontales representan los valores medios para cada grupo (254).

Esta observación similar en los pacientes con DM1 y DM2 implica a la hiperglucemia como la principal alteración metabólica, debido a que esta es la característica fundamental en ambas poblaciones de pacientes. Estos autores también observaron una correlación significativa entre los niveles de glucosa en el plasma y la concentración urinaria de F2-IsoP<sub>s</sub>, sugiriendo que la peroxidación lipídica está relacionada con el control glucémico. La observación de que el tratamiento intensivo con agentes hipoglucemiantes disminuye los niveles de glucosa y la excreción urinaria de IsoP<sub>s</sub>, apoya la idea de que la hiperglucemia es responsable de la mayor parte de la formación de los IsoP<sub>s</sub> (254). Figura 10



**Figura 10:** Cambios significativos ( $P < 0.0001$ ) en la formación de  $F_2$ IsoP asociado con mejoría del control glucémico (254).

Otra importante observación de este estudio, fue el hallazgo de una correlación entre la excreción urinaria del 8-iso-PGF<sub>2α</sub> y la activación plaquetaria y, sobre la base de estudios previos, en los que se sugería que el 8-iso-PGF<sub>2α</sub> amplificaba la agregación plaquetaria inducida por agonistas, estos resultados sugieren un incremento de la peroxidación lipídica en pacientes con DM en la que la formación de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> inicia la activación plaquetaria (254). Otros investigadores como Gopaul et al, encontraron en 39 pacientes con DM2 un incremento tres veces mayor de IsoP<sub>s</sub> eterificados comparado con sujetos controles, pero en este estudio no se observó una relación de los IsoP<sub>s</sub> ni con el nivel de glucemia ni con el de lípidos (268). En otro estudio este mismo autor, describió un aumento agudo de los niveles de IsoP<sub>s</sub> en el plasma de 27 pacientes con DM2 tras una sobrecarga oral de glucosa, aportando evidencia directa de la lesión oxidativa mediada por RLO (269). Catella-Lawson et al, describió una tendencia a niveles aumentados de excreción urinaria de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en un grupo de 18 pacientes con DM, con elevación estadísticamente significativa en pacientes con cetoacidosis diabética (270). En otro estudio, los niveles de IsoP<sub>s</sub> eterificados en los lípidos plasmático fueron cuantificados en 61 pacientes ( 15 con DM) a los que se les realizó un estudio angiográfico. La afectación arteriosclerótica coronaria en los pacientes con DM fue similar a la de los 46 sujetos sin DM. En los pacientes con DM las concentraciones de IsoP<sub>s</sub> en el plasma fueron significativamente elevadas ( $33.4 \pm 4.8$  pg/mL) comparado con las concentraciones medidas en los sujetos sin DM ( $22.9 \pm 1.9$  pg/mL) ( $p < 0.02$ ) (271). Sin embargo Vessby et al, utilizando la determinación de IsoPs no pudieron demostrar que la mejoría del control glucémico esté asociado a una disminución del EO en pacientes con DM1 (272).

Davi et al, mostró que la administración durante dos semanas de una dosis de vitamina E (100 a 600 mg/día) reducía la excreción de las concentraciones de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en sujetos con DM2 de una forma dosis-dependiente, con la mayor eficacia demostrada con una dosis de 600 mg/día de vitamina E en la que todas las determinaciones alcanzaron niveles similares a la de los sujetos sanos, por lo que los IsoP<sub>s</sub> es posible que tengan implicaciones prácticas para la utilización de

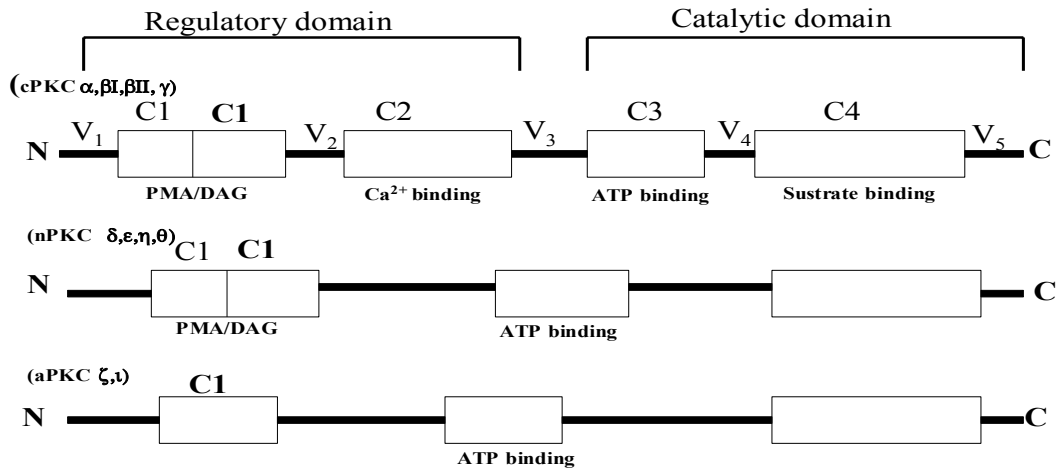
suplementos de vitamina E en la prevención cardiovascular en sujetos con DM (254).

En resumen, los IsoP<sub>s</sub> son una nueva clase de productos biológicamente activos derivados del metabolismo del ácido araquidónico de relevancia especial en la DM. Su formación refleja primariamente un proceso no enzimático de la peroxidación lipídica *in vivo* y provee un índice no invasivo, fiable de la peroxidación lipídica en la DM. Elevada excreción urinaria de IsoP<sub>s</sub> ha sido repetidamente asociada con DM.

### **3.4 Activación de la proteína Kinasa C**

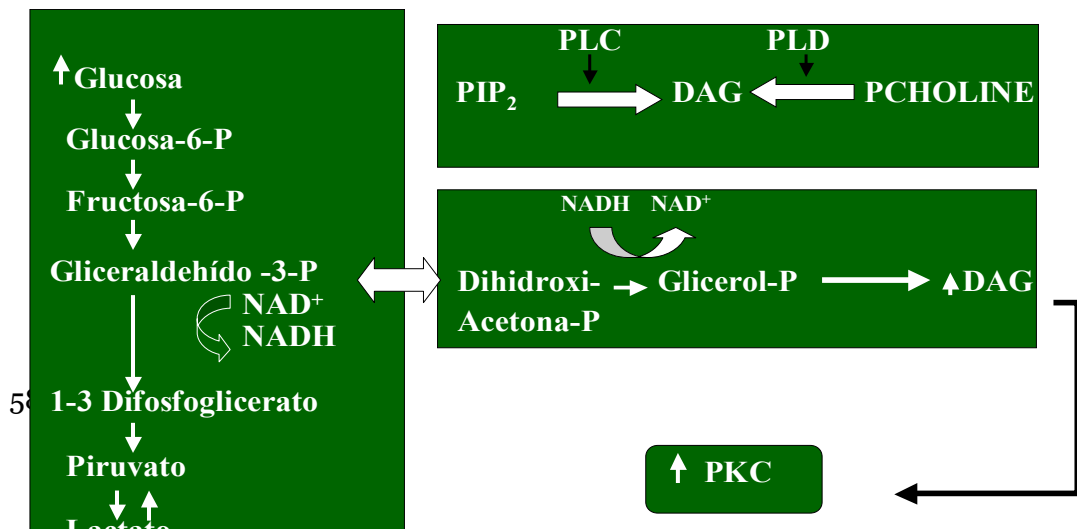
La PKC es una cinasa serina/treonina que participa en los eventos de transducción de señal en respuesta a estímulos específicos hormonales, neuronales y factores de crecimiento. Esta cinasa actúa catalizando la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP a varios sustratos de proteínas. La PKC sufre una serie de pasos complejos de fosforilización antes de ser activada, durante la cual es desplazada desde el citosol a la membrana celular (273;274). Se han identificado aproximadamente 12 isoformas las cuales difieren en estructura y sustratos requeridos. Estas isoformas han sido clasificadas en tres grupos. Las PKC convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II, y  $\gamma$ ) que son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y son activadas tanto por la fosfatodilserina (PS) y el segundo mensajero DAG; Las PKC noveles ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ) son  $\text{Ca}^{2+}$  independientes, y son reguladas por el DAG y la PS y las PKC atípicas ( $\zeta$  y  $\iota/\lambda$ ) que son independientes del  $\text{Ca}^{2+}$  y no requieren DAG para su activación, aunque si bien, la PS regula su actividad. Las isoformas de PKC son producidas por genes diferentes, con la excepción de las isoformas PKC  $\beta$ I,  $\beta$ II, que son variante de la división del mismo gen. La PKC es un polipéptido que está compuesto por una región regulatoria N-terminal y una región catalítica C-terminal. La estructura de las PKC convencionales presentan 4 estructuras conservadas (C1-C4) y 5 regiones variables (V1-V5). Las regiones N-terminal C1 y C2 son necesarias para la interacción con el DAG, los esterios de forbol, PS y el  $\text{Ca}^{2+}$ . Las diferencias en la estructura de las varias isoformas de la PKC están asociadas con la región conservada. Las PKC convencionales tienen las 4 regiones conservadas, mientras que las PKC noveles tienen una región parecida a la C2 que no se enlaza al  $\text{Ca}^{2+}$  y la PKC atípica tiene una región parecida a la C2 pero que contiene una sola prolongación de zinc rica en cisteína que le confiere su

capacidad para enlazarse al DAG. Las isoformas de la PKC están ampliamente distribuidas en el organismo y muestran diferencias en la localización tisular. Por lo que respecta a la DM, la isoforma PKC $\beta$  está presente en las células de los islotes pancreáticos, monócitos, cerebro y muchos tejidos vasculares como la retina, riñón y corazón (273;275). Figura 11



**Figura 11:** La estructura descrita de las isoformas de la PKC (275)

La activación continua de la PKC puede actuar como una vía común final que media la injuria tisular inducida por la hiperglucemia y se asocia con anomalías bioquímicas y metabólicas. En las células, la activación de la PKC se produce a través de las vías metabólicas que generan diacilglicérol (DAG). Este DAG es generado por múltiples vías que incluyen, la hidrólisis inducida por agonistas del fosfatidilinositol (FI) por la fosfolípasa C (FC) o por la síntesis de novo desde los intermediarios glicolíticos fosfato de dihidroxiacetona y del gliceraldehído-3-fosfatasa (gliceraldehído-3-P). Además, tanto el incremento del índice citosólico NADH:NAD<sup>+</sup> asociado con la oxidación de sorbitol a fructosa y la inhibición del glicerilaldehído-3-deshidrogenasa por los RLO puede desviar la vía de gliceraldehído-3-P de la ruta glicolítica hacia fosfato de dihidroxiacetona y DAG. Finalmente, recientes evidencias sugieren que el aumento de la actividad de la enzima PKC pueden también producirse a partir de la interacción de los AGEs y su receptor de superficie celular (276;277). Figura 12

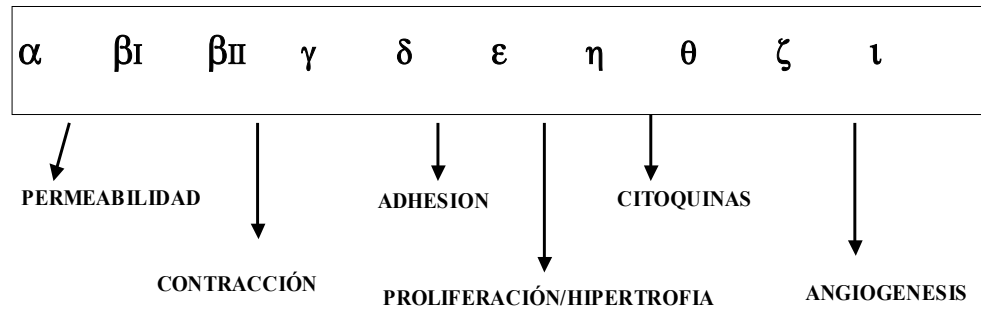


**Figura 12:** Síntesis del diacilglicerol y activación de la PKC; Glucosa-6-P: glucosa-6-fosfatasa; fructosa-6-P: fructosa 6 fosfatasa; Gliceraldehído-3-P: gliceraldehído-3-fosfatasa; PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol; PLC: fosfolipasa C; PLD: fosfolipasa D; Pcholine: fosfatidilcolina (278)

El incremento inducido por la hiperglucemia en la actividad de isoformas específicas de la PKC en la membrana se ha descrito en la retina, aorta, corazón, monocitos y en el glomérulo, tanto en estudios en animales como en humanos con DM. Los mecanismos propuestos de la activación preferente de las diferentes isoformas dentro de un tejido incluyen la diferencia en la sensibilidad de las isoformas al DAG. Por ej. PKC $\alpha$  es menos sensible al DAG que la PKC $\beta$  a concentraciones bajas de Ca<sup>2+</sup>. Otra posibilidad es que el medio ambiente diabético produzca un incremento de los niveles de DAG en sitios subcelulares específicos en la que diferentes isoformas de la PKC están localizadas. El rango de síntesis de proteínas y la degradación de las isoformas de la PKC podría también diferir y ser reflejada como diferencias en la activación (273;276).

La importancia de esta vía metabólica ha sido puesta de manifiesto con el desarrollo de un potente inhibidor de esta vía el LY333531, el cual provoca efectos positivos sobre la evolución de la nefropatía y la retinopatía diabética (279). En un estudio realizado en ratones transgénicos con sobre-expresión de la isoforma PKC $\beta$ II en el miocardio, se observó que estos ratones presentaban una hipertrofia ventricular izquierda, aumento de la necrosis miocárdica y fibrosis y todas estas alteraciones fueron atenuadas por un inhibidor específico del PKC $\beta$ II (280). El aumento de esta isoforma PKC $\beta$ II ha sido recientemente referida en pacientes con insuficiencia cardíaca, proporcionando evidencia de un papel patogénico de esta enzima en la enfermedad cardíaca (281). Recientes estudios han descrito en el riñón que varios tratamientos renoprotectores como los IECAs y la aminoguanidina reducen la actividad de la PKC (282). Estos hallazgos implican un papel central a la activación de la PKC para favorecer el daño vascular, particularmente en la DM y aporta una razón para explorar el papel de

inhibidores específicos de esta enzima en el tratamiento de las complicaciones vasculares de la DM. Figura 13



**Figura 13:** Respuestas celulares a las diferentes isoformas de la PKC (275).

#### 4. Mediadores del daño inducido por la hiperglucemia

Existe numerosas evidencias que indican que la hiperglucemia y sus anormalidades metabólicas y bioquímicas asociadas son capaces de modificar la función de las células vasculares. Estas células incluyen a las endoteliales, mesangiales, las células del músculo liso vascular, pericitos, plaquetas, linfocitos, macrófagos, monócitos, cambios en el modelo de producción de una serie de citocinas las cuales, en cambio, influyen en la función de las células productoras y de las células que las rodean por actuar de una manera autocrina y paracrina, estos mediadores incluyen factores de crecimiento, sustancias vasoactivas, factores de coagulación y moléculas de adhesión.

Algunos estudios experimentales en modelos animales y sistemas de cultivo celular han intentado valorar el papel de varios factores autocrinos y paracrinos en la enfermedad vascular diabética. Para establecer este papel patogénico es necesario demostrar que: a) la síntesis local o la acción de ciertas citocinas están incrementadas en la enfermedad vascular diabética; b) que la citocina sea capaz de inducir cambios estructurales y funcionales en los tejidos dianas, imitando las alteraciones observadas en la DM; c) El bloqueo de la expresión de la citocina o el receptor puede prevenir o atenuar las complicaciones de la DM. Actualmente, las evidencias experimentales indican que varios factores autocrinos y paracrinos están involucrados en la patogénesis de las complicaciones vasculares de la DM (278;283).

Entre los agentes vasoactivos, se ha demostrado que el óxido nítrico varía con la duración de la exposición de las células endoteliales a la hiperglucemia. Las concentraciones de nitritos-nitratos y las isoformas endoteliales de la sintasa de



óxido nítrico están aumentadas después de un corto tiempo de incubación y reducidas en la exposición crónica a la hiperglucemia (284). También se demostró que la endotelina 1 estaba aumentada en las células endoteliales de la retina y en los pericitos (285). Igualmente se demostró que la producción de eicosanoides está influenciada por la hiperglucemia ya que, después de una exposición prolongada de las células mesangiales a la hiperglucemia se observó una disminución de la concentración de prostaglandinas prostanoideas vasodilatadoras PGE<sub>2</sub> y una concentración no cambiada de los eicosanoides vasoconstrictores TXA<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> (286), mientras que una producción aumentada de estas PG<sub>s</sub> vasoconstrictoras fue descrita en las células mesangiales incubadas en condiciones de hiperglucemia durante un período corto de tiempo (287). En las células endoteliales cultivadas en un medio hiperglucémico se ha descrito un incremento de la expresión del gen del activador tisular del pasminógeno y de su inhibidor PAI-1, alteraciones asociadas con una capacidad fibrinolítica reducida (288). También se ha observado, que las células endoteliales exhiben un modelo anormal de expresión de las moléculas de adhesión cuando eran expuestas a un medio hiperglucémico con sobrerregulación de la E-selectina, de las moléculas de adhesión intercelular y de las moléculas de adhesión vascular-1 (VCAM-1) (289).

En los últimos tiempos el papel de las citocinas y de los factores de crecimiento en mediar el daño micro y macrovascular ha sido objeto de numerosa investigación, e involucra no solo al factor transformador del crecimiento  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ) y al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), sino también a citocinas proliferativas como el factor de crecimiento endotelial (EGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. Describiremos brevemente estos factores de crecimiento y sus alteraciones que median el desarrollo o progresión de las complicaciones de la DM, pero desarrollaremos de forma más extensa el TGF $\beta_1$ , ya que su papel en la fibrogénesis es uno de los objetivos de investigación de esta tesis.

#### **4.1 Factor de crecimiento del endotelio vascular**

El VEGF es uno de los más potentes inductores de la permeabilidad vascular y un poderoso mitógeno de las células endoteliales vasculares. Los resultados de la investigación de este factor de crecimiento sugieren que el VEGF desempeña un papel relevante en la patogénesis de la neovascularización y del aumento de la

permeabilidad vascular que caracteriza a la microangiopatía diabética (290). Y esta citocina se considera que está implicada en la patogenia de la retinopatía diabética, aunque su papel en otros sitios vasculares en la DM aún no ha sido definida. Se ha descrito que varios estímulos incrementan la expresión vascular del VEGF como la hipoxia, hiperglucemia, AGE<sub>s</sub>, Angiotensina II, y TGFβ<sub>1</sub>. El mecanismo de señalización celular responsable de la sobre-regulación inducida por la hiperglucemia del VEGF involucra a la activación de la PKC (287). Recientemente se ha demostrado una expresión aumentada de los receptores de VEGF en la retina diabética. Una relación entre la angiotensina II y el VEGF se ha sugerido por estudios *in vitro*, en los que el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> con losartán elimina la sobre-regulación del mRNA del VEGF en las células musculares lisas cultivadas (291).

#### **4.2 Factor de crecimiento epidermal**

Se ha descrito un aumento en la expresión del EGF en la capa endotelial de los vasos mesentéricos. El mRNA del EGF fue también expresado en los mastocitos que infiltraban la adventicia de las arterias mesentéricas que se hipertrofiaban en la diabetes experimental. Los mastocitos son un origen importante de citocinas y quimioatrayente ya que son activos y se secretan precozmente en la diabetes experimental. El bosentan que es un bloqueador del receptor de la endotelina reduce la hipertrofia vascular asociada con la DM en asociación con una reducción en la expresión del gen del EGF en las células endoteliales y en los mastocitos (292)

#### **4.3 Factor de crecimiento derivado de las plaquetas**

Se ha observado que el PDGF induce tanto proliferación celular como síntesis de la matriz extracelular en las células del músculo liso vascular y ha sido implicado en el desarrollo de la aterosclerosis. *In vitro*, se ha descrito una producción aumentada del PDGF en respuesta a la hiperglucemia y a la angiotensina II. Se ha demostrado que en las células del músculo liso vascular, la expresión del receptor del PDGF-β se estimula por la hiperglucemia a través de la

activación de la PKC, sugiriéndose un posible papel del PDGF en el desarrollo de la vasculopatía de la DM (293).

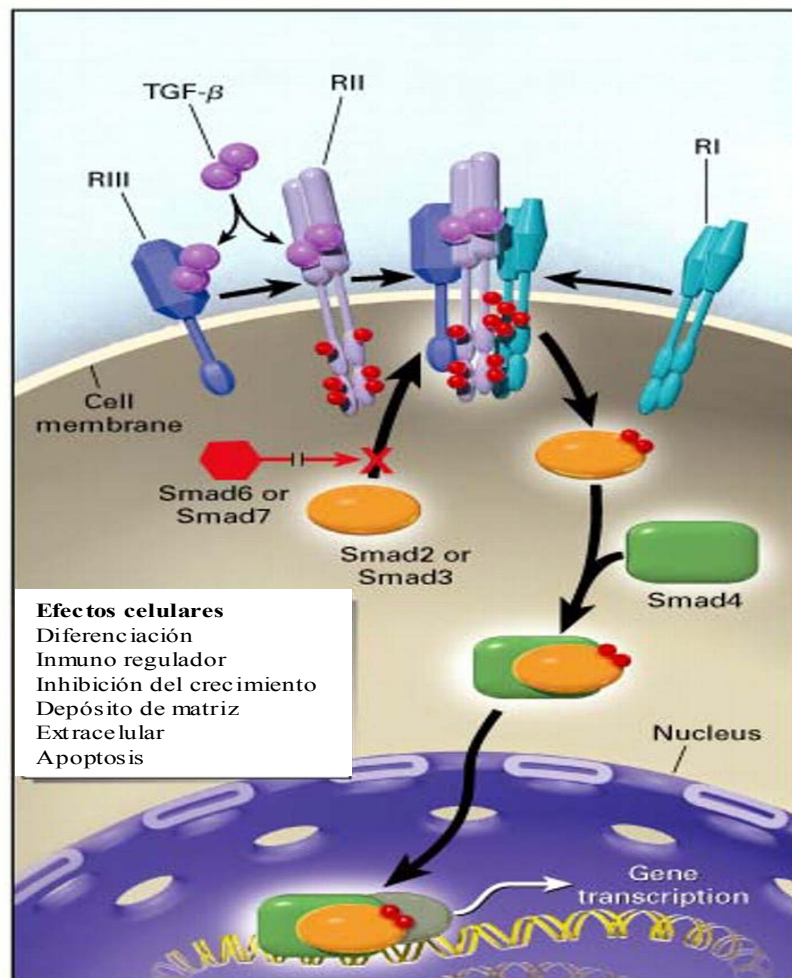
#### **4.4 Factor transformador del crecimiento $\beta_1$**

En los tejidos humanos, la homeostasis normal requiere una interacción equilibrada entre las células y la red de proteínas secretadas, conocida como matriz extracelular. Estas interacciones implican a numerosas citocinas que actúan a través de receptores de superficie celular específicos. Cuando este balance se altera, aparece la enfermedad. Esto es claramente evidente en la interacción mediada por el TGF $\beta_1$ .

El TGF $\beta_1$  es un miembro de una familia numerosa de factores de crecimiento, que incluyen las proteínas morfogénicas del hueso, las inhibinas y las activinas. Estos factores de crecimiento tienen la forma de un racimo de residuos de cisteína que forman una estructura nodular común de cisteína y que se mantiene ligada a través de enlaces disulfidos intramoleculares (294). En los humanos, esta familia incluye tres isoformas del TGF $\beta$ : TGF $\beta_1$ , TGF $\beta_2$  y TGF $\beta_3$ . Cada isoforma es codificada por un gen distinto y expresada en tejidos específicos. El mRNA del TGF $\beta_1$  se expresa en las células endoteliales, hematopoyéticas y las células del tejido conectivo; el mRNA del TGF $\beta_2$  en las células neuronales y epiteliales y el mRNA del TGF $\beta_3$  en las células mesenquimatosas. Durante el desarrollo, el TGF $\beta_1$  y TGF $\beta_3$  se expresan precozmente en estructuras que sufren morfogénesis y el TGF $\beta_2$  lo hace más tarde en epitelio diferenciado y maduro. Estas isoformas difieren en su habilidad para enlazarse a los receptores de TGF $\beta$  y se ha observado en ratones que su delección origina fenotipos diferentes. Cada isoforma es sintetizada como parte de una gran molécula precursora que contiene un pro-péptido además del TGF $\beta$ . El TGF $\beta$  permanece unido al pro-péptido por enlaces no-covalentes del cual se separa antes de que el precursor sea secretado por las células. Después de que este es secretado, mucho del TGF $\beta$  es almacenado en la matriz extracelular como un complejo de TGF $\beta$ , el pro-péptido y una proteína llamada proteína que enlaza el TGF $\beta$  latente. La unión del TGF $\beta$  a las proteínas de enlace por puentes disulfidos impide que el TGF $\beta$  se una a sus receptores. Hay 4 proteínas de enlace del TGF $\beta$  latente, que son codificadas por genes distintos y se expresan en una forma tisular específica. *In vivo*, el TGF $\beta$  es

liberado de este complejo por la glicoproteína multifuncional de la matriz, trombospodin-1, que es posible que actué cambiando la conformación de la proteína que enlaza el TGF $\beta$  latente. Debido a que el TGF $\beta$  y sus receptores están presentes en muchas células, parece que su activación sea un paso regulatorio determinante en la acción del TGF $\beta$ . Una excepción de este proceso ocurre en las plaquetas, en las que el TGF $\beta$  es almacenado en los gránulos intracelulares y liberados durante la activación plaquetaria (295;296).

El TGF $\beta$  regula los procesos celulares por acoplarse a tres receptores de superficie celular de alta afinidad conocidos como tipo I, II y III. Los receptores tipo III son los más abundantes. Estos receptores tipo III, funcionan enlazándose al TGF $\beta$  y transfiriéndolo a sus receptores de señalización, el receptor tipo I y II. Los receptores tipo I y II contienen proteínas cinasas serina/treonina en sus dominios intracelulares que inician la señalización intracelular fosforilando algunos factores de transcripción conocidos como Smad<sup>1</sup>. Actualmente, se han identificado 10 proteínas Smads (Smads 1 a la 10). La Smad 2 y 3 son fosforiladas por el receptor del TGF $\beta$  tipo I activado. El Smad 4 es un miembro común de todos los receptores activados por Smads (297). Un mecanismo general de la señalización del TGF $\beta$  se representa en la figura 14 (295).



<sup>1</sup> Smads: 1

phila

**Figura 14:** Mecanismo de transducción de señal mediada por el factor transformador del crecimiento  $\beta_1$  (TGF $\beta$ ). En el espacio intracelular el TGF $\beta$  se enlaza tanto al receptor del TGF $\beta$  tipo III (RIII), el cual presenta el TGF $\beta$  al receptor tipo II (RII), o directamente al RII en la membrana celular. Este enlace inicia el enlace del receptor tipo I (RI) al complejo y la fosforilización del RI (expresado en este figura como las esferas roja)s. Esta fosforilización activa la proteína cinasa del RI que a su vez fosforolisa los factores de transcripción Smad 2 o Smad 3. Estos factores de transcripción fosforilados se enlazan al Smad 4 que es el Smad común, y el complejo resultante es desplazado del citoplasma al núcleo. En el núcleo el complejo Smads interactúa de una manera específica celular con otros factores de transcripción para regular la transcripción de los genes del TGF $\beta$  y mediar los efectos del TGF $\beta$  a nivel celular (295).

Casi todas las células del organismo incluyendo las células endoteliales, epiteliales, hematopoyéticas, neuronales y células del tejido conectivo producen TGF $\beta$  y tienen receptores para este factor de crecimiento. Los TGF $\beta$  desempeñan funciones importantes en procesos que van desde la diferenciación y desarrollo a la regulación del crecimiento celular y de la biología de la matriz extracelular, que apoyan un papel para los miembros de esta familia en un amplio rango de procesos patofisiológicos. Una de las áreas donde este factor tiene particular importancia, es en la patogénesis de la vasculopatía diabética.

Entre las funciones que se han descrito del TGF $\beta$  destacamos que es un poderoso y esencial regulador inmune en el sistema vascular, capaz de modular la respuesta inflamatoria en los leucocitos y las células endoteliales vasculares. Esto fue ilustrado por el fenotipo del ratón que carece del gen para la isoforma TGF $\beta_1$ . Este ratón moría intra útero en el período perinatal como resultado de un proceso inflamatorio, diseminado y no controlado. Un efecto que puede ser revertido por la administración sistémica de TGF $\beta$  activo (298). Contrariamente, la acción no regulada del TGF $\beta$  (como en presencia de una cantidad aumentada del ligando activo del TGF $\beta_1$ ) se asoció con la acumulación patológica de un exceso de matriz extracelular (299) y este hecho ha sido propuesto que desempeñe un papel importante en la patogénesis de alteraciones como la enfermedad vascular hipertensiva y la ND (300;301). El TGF $\beta$  es un regulador del ciclo celular de muchos tipos de células incluyendo las células del músculo liso vascular, las células endoteliales y por esto, a este factor de crecimiento se le ha atribuido un

papel en los procesos proliferativos vasculares como la angiogénesis. Alteraciones en la capacidad a responder al TGF $\beta$  (como en presencia de mutaciones somáticas en el receptor del TGF $\beta$ ) se han implicado en la alteración de la regulación de los fenómenos de hiperplasia/hipertrofia de las células del músculo liso vascular, que es la característica principal de la formación neointimal o re-estenosis después de la injuria vascular (302). De este modo, tanto la expresión del ligando alterado así como las alteraciones en las vías de señalización utilizadas por estas citocinas, probablemente puedan contribuir a las enfermedades vasculares humanas. Su importancia radica en que la modulación de la expresión o/y la acción de esta citocina se ha propuesto como una potencial diana de intervención terapéutica.

Una de las características del TGF $\beta$  es la naturaleza pleiotrófica de sus acciones, que son enmarcadas en el contexto celular específico en el cual actúa este factor de crecimiento. El TGF $\beta$ , puede funcionar como un factor de supervivencia o como un efector pro-apoptótico dependiendo del tipo celular (células endoteliales, células del músculo liso vascular) y la presencia o ausencia de otros factores de crecimiento como el EGF, PDGF (303). Es decir, del mismo modo que el ratón que carece del gen de la isoforma del TGF $\beta_1$  muere de un proceso no controlado de inflamación (sugiriendo un papel anti-inflamatorio del TGF $\beta$ ), también se han descrito situaciones en la que este factor de crecimiento presenta efectos pro-inflamatorios (304).

#### **4.4.1 El factor transformador del crecimiento $\beta_1$ y la diabetes mellitus: Acción Fibrogénica**

Una de las acciones más relevantes del TGF $\beta_1$  es su acción fibrogénica producida por su participación en la sobreproducción de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular, ocasionando un acumulo excesivo y patológico de tejido cicatrizal y fibrosis. Este papel patogénico del TGF $\beta$  ha sido establecido al demostrar que:

1. La concentración de TGF $\beta$  aumenta en el tejido lesionado, antes de que incremente la producción de la matriz extracelular.
2. El TGF $\beta$  es un potente estimulador de la producción y depósito de la matriz extracelular.
3. En los órganos fibróticos, las concentraciones del TGF $\beta$  y del mRNA del TGF $\beta$  están elevadas.

4. La administración de TGF $\beta$  exógeno induce fibrosis, independiente del daño tisular.
5. Inhibidores del receptor que enlaza TGF $\beta$  reducen o eliminan la fibrosis y que la sobre-expresión específica tisular del TGF $\beta_1$  en ratones transgénicos desencadena fibrosis en esos órganos (305;306).

Puesto que la fibrosis es la característica principal de la ND, la mayoría de las investigaciones realizadas del TGF $\beta$  en la DM tanto en modelos animales como en humanos, se han relacionado con esta complicación. Muchas de las características de la situación diabética estimulan la actividad del TGF $\beta$  principalmente de su isoforma  $\beta_1$ . La hiperglucemia (307;308), el aumento de la glicación no enzimática de las proteínas (309), la síntesis de novo del DAG y la subsiguiente activación de la PKC (310), el incremento de la producción de glucosamina intracelular (311) y aumento en la producción renal de sustancias vasoactivas como la angiotensina II (312), endotelinas (313), y tromboxano (314), se han demostrado que aumentan la expresión del TGF $\beta_1$  tanto en los cultivos celulares como los sistemas *in vivo*. Estudios en cultivos celulares han indicado que en el riñón, el TGF $\beta_1$  promueve la hipertrofia de las células tubulares, mesangiales y regula la producción glomerular de prácticamente todas las moléculas conocidas de la matriz extracelular, incluyendo el colágeno, la fibronectina, la tenascina y los proteoglicanos (315-317). Además, el TGF $\beta_1$  aumenta la producción de las integrinas, que son los receptores de superficie celular para las proteínas de la matriz, promoviendo la acumulación de la matriz (318). El TGF $\beta_1$  también bloquea la degradación de la nueva de matriz extracelular al incrementar la síntesis de los inhibidores de las proteasas, como el inhibidor del activador del plasminógeno y por disminuir la síntesis de las proteínas que degradan la matriz, como la estromelisina, y la colagenasa (319).

En muchos tipos de células renales, la hiperglucemia sobrerregula la expresión y bioactividad del TGF $\beta_1$ , que media los efectos hipertróficos y profibróticos de la hiperglucemia. Se ha demostrado que las células mesangiales, endoteliales glomerulares, tubulares proximal, fibroblastos intersticiales, incubados en un medio ambiente hiperglucémico exhiben un aumento de la expresión del TGF $\beta_1$  y en algunos casos del receptor II del TGF $\beta$  que directamente se enlaza al ligando del TGF $\beta$  (320;321). El TGF $\beta_1$  puede actuar de una manera autocrina o paracrina produciendo cambios significativos del comportamiento celular (307). Finalmente, se ha visto que el antagonismo del TGF $\beta_1$  por

anticuerpos monoclonales neutralizantes específicos (322) o por oligonucléotidos (323) disminuye de forma significativa o incluso puede eliminar el aumento inducido por la hiperglucemia en la expresión de la matriz extracelular, sugiriendo que el TGF $\beta_1$  media el efecto profibrótico de la hiperglucemia en las células renales.

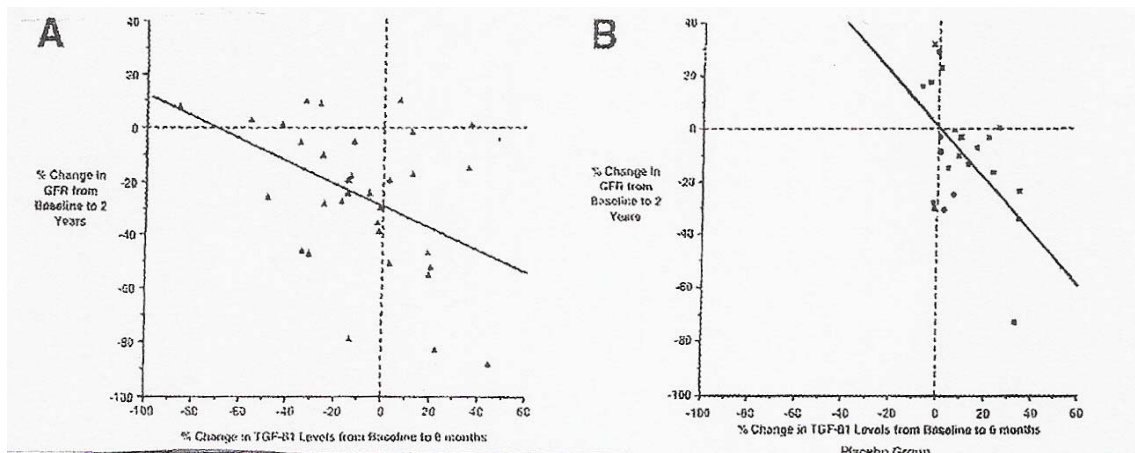
Asimismo, en estudios experimentales en modelos animales, se ha demostrado que el TGF $\beta_1$  desempeña un papel en la patogénesis de la ND. En riñones de animales con DM insulino-dependiente, varios investigadores han demostrado que las concentraciones del TGF $\beta_1$  están aumentadas tanto en las fases precoces como tardías de la enfermedad (324-326). También se ha descrito un aumento progresivo del mRNA del TGF $\beta_1$  en glomérulos aislados de ratas con diabetes inducida mediante la administración de estreptozotocina (STZ) (325), asociada además, con un incremento de la expresión de las moléculas de la matriz extracelular (327). El tratamiento con insulina para reducir la hiperglucemia en este tipo de rata diabética disminuye el incremento de la expresión del TGF $\beta_1$  y los componentes de la matriz en el glomérulo (325). Se ha demostrado también que el sistema intrarrenal del TGF $\beta$  está activado en modelos animales de DM2. Los ratones *db/db* caracterizados por hiperglucemia, obesidad y resistencia a la insulina, desarrollan un aumento de TGF $\beta_1$  y del receptor tipo II del TGF $\beta$  a nivel glomerular, tubular e intersticial (328). Además, el tratamiento de ratones con DM inducida por STZ con anticuerpos monoclonales neutralizantes contra las 3 isoformas del TGF $\beta$  previene la hipertrofia glomerular, disminuye el aumento del tamaño renal cerca del 50% y atenúa de manera significativa el aumento del TGF $\beta_1$ , colágeno  $\alpha_1$ (IV) y fibronectina, sin afectar el control glucémico, lo que sugiere una relación causa-efecto entre el sistema del TGF $\beta$  renal y el desarrollo de cambios estructurales en la ND (329).

Los estudios en humanos, realizados en pacientes con DM con varios grados de ND también han implicado al sistema del TGF $\beta$  en el desarrollo de la ND. Se ha detectado que las 3 isoformas del TGF $\beta$  están aumentadas a nivel glomerular, tubular e intersticial de la ND establecida (330;331). Posteriormente, el mRNA del TGF $\beta_1$  a nivel glomerular medido mediante PCR, se demostró que estaban aumentado en muestras de biopsia renal de pacientes afectados de ND (332). Estos resultados sustentan que el aumento renal del TGF $\beta$  se correlaciona con el grado de expansión mesangial de la matriz, fibrosis intersticial e insuficiencia renal. Otro estudio demostró que los pacientes con DM tienen una



producción renal aumentada del TGF $\beta$  y que este incremento urinario de las concentraciones del TGF $\beta_1$ , no solamente era debido a una mayor permeabilidad glomerular a las proteínas, por que tanto los pacientes con y sin microalbuminuria presentaban un aumento similar de la excreción urinaria de TGF $\beta_1$  (333).

En el análisis post hoc del estudio en pacientes con ND del Collaborative Study Group se valoró la efectividad del tratamiento con captopril para disminuir los niveles de TGF $\beta_1$  en un pequeño grupo de pacientes que participaron en este estudio. Después de 6 meses, la concentración de TGF $\beta_1$  disminuyó de manera significativa (21%) en el grupo que recibió tratamiento con captopril, mientras que se observó un discreto aumento (11%) de las concentraciones de TGF $\beta_1$  en el grupo de pacientes que formaron parte del grupo placebo. Se observó en los pacientes del grupo en tratamiento con captopril, la presencia de una disminución en las concentraciones de TGF $\beta_1$ , una función renal mejor conservada en el análisis a los 2 años de tratamiento y fue más pronunciada esta asociación en los pacientes en los que el rango de filtración glomerular era menor de 75 mL/min (334). Estos resultados sugieren que el TGF $\beta_1$  ejerce un papel importante en la progresión de la ND y que el tratamiento con IECAs protege el riñón por disminuir la producción del TGF $\beta_1$ . figura 15



**Figura 15:** Correlación entre el cambio precoz ( 6 meses después de la randomización en los niveles séricos de TGF $\beta_1$  y los cambios a largo plazo (2 años después de la randomización) en el filtrado glomerular entre los 34 pacientes del grupo de captopril (A,  $r = -0,045$ ,  $P = 0,008$ ) y los 24 pacientes en el grupo control (B,  $r = -0,05$ ,  $P = 0,005$ ) (334)

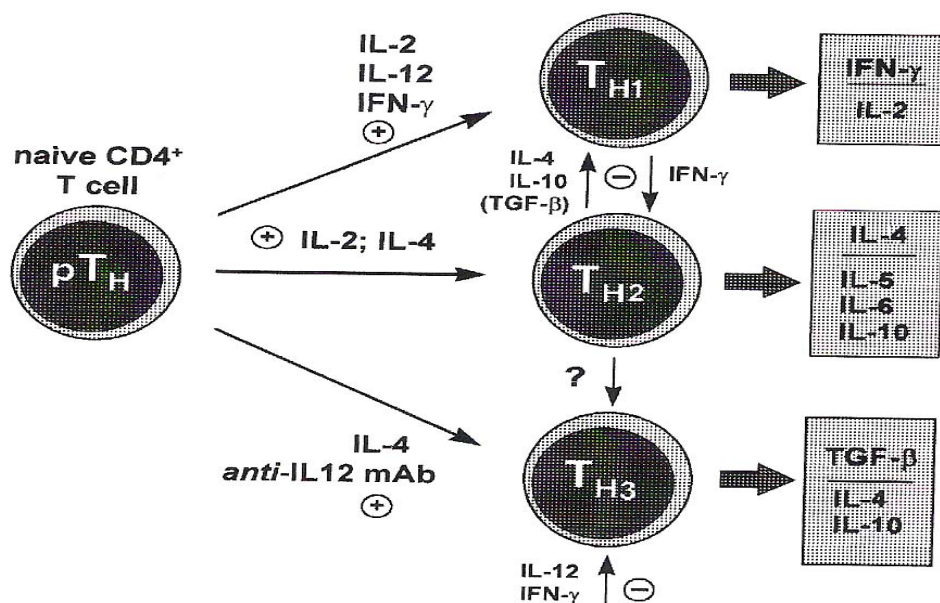
En el 2002 se publicó un subestudio del EURODIAB Prospective Complications Study en el que se evaluó la correlación de las concentraciones de TGF $\beta_1$ , la albúmina Amadori, y las complicaciones microvasculares de la DM1. Un aumento de las concentraciones del TGF $\beta_1$  se asoció con un aumento de la prevalencia de retinopatía diabética y con la severidad de la albuminuria. Ambos parámetros influyeron en el análisis multivariante para los cambios en los niveles de PA, control glucémico y concentraciones de albúmina Amadori (335). Estos datos sugieren que estas alteraciones de la condición diabética, ejercen una gran influencia en las concentraciones de TGF $\beta_1$  y deben ser controladas intensamente para reducir el riesgo para desarrollar microalbuminuria.

#### **4.4.2 El factor transformador del crecimiento $\beta_1$ : Acción inmunológica**

Por otra parte, debido a su acción en la regulación de la proliferación celular y moduladora del sistema inmune, varios estudios han explorado el papel del TGF $\beta_1$  en la patogénesis de la DM1 (336-338). El TGF $\beta_1$  es una citocina que pertenece a las células tipo helper 3 (Th3) cuya función es conocida que inhiba el crecimiento celular y la inflamación, Figura 16 (339). La evidencia de un papel anti-inflamatorio del TGF $\beta_1$ , se ha obtenido a través del ratón deficiente de TGF $\beta_1$  que desarrolló una enfermedad inflamatoria multiorgánica que fue letal a las 3-5 semanas de edad (298). Además, se ha descrito que el TGF $\beta_1$  inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias desde los macrófagos, células B, y células T, afecta la presentación del antígeno al disminuir la expresión del complejo de histocompatibilidad mayor clase II, tanto en los macrófagos como en las células B (340), bloquea la proliferación de las células B, inhibe la síntesis de mRNA de las inmunoglobulinas IgG e IgM y disminuye la expresión en las membranas de las inmunoglobulinas, comprometiendo la sensibilidad de la célula B a los antígenos y a la presentación de los antígenos (341;342). El TGF $\beta_1$  actúa de forma diferente en las células T, dependiendo de su estado de diferenciación y se ha descrito que, el TGF $\beta_1$  puede tener efectos inhibitorios (343) o promover el crecimiento (344). El TGF $\beta_1$  solo o en sinergismo con la interleucina 2, bloquea la apoptosis y promueve la expansión de células Th2 antígeno específicas generadas *in vitro* desde las células CD4<sup>+</sup> de ratones transgénicos (345). Considerando, estos efectos en conjunto el TGF $\beta_1$  podría

prevenir la respuesta autoagresiva tipo Th1. En modelos de tolerancia oral, se ha observado que las células que producen el  $TGF\beta_1$  son capaces de activar la supresión inmune (346) así como que esta citocina tiene una relación recíproca con el interferón  $\gamma$  en la regulación de la inflamación de la mucosa y las células T autorreactivas *in situ* (346). Recientemente, la importancia del papel del  $TGF\beta_1$  en la regulación autoinmune se ha evidenciado *in vivo* por la administración de anticuerpos que bloquean el  $TGF\beta_1$  (347;348). Todos estos datos indican que el  $TGF\beta_1$  es un potente regulador de las células T autoagresivas en condiciones patológicas y no patológicas.

La expresión del  $TGF\beta_1$  en el contexto de antígenos islotes se encontró que protegía de desarrollar DM en los ratones susceptibles, además se ha descrito que el  $TGF\beta_1$  en el contexto de la presentación de antígenos cambia las preferencias de las células presentadoras de antígenos, desviando la respuesta de las células T hacia un fenotipo Th2, que podría prevenir la DM1 (349). En un estudio clínico que evalúa los niveles de  $TGF\beta_1$  en pacientes con DM1 y DM2 con diferentes tiempos de evolución de la enfermedad, observaron en pacientes con DM2 que sus niveles estaban aumentados desde el diagnóstico y que permanecían elevados durante toda la enfermedad, sugiriendo que estos niveles reflejan la hiperglucemia y no un papel en la patogénesis de la enfermedad. Contrariamente, en pacientes con DM1 de < 2 años de evolución de la enfermedad estos autores observaron que las concentraciones de  $TGF\beta_1$  eran similares al de los sujetos controles pero que comenzaban a disminuir a partir de los dos años de evolución, lo que sugiere que estos niveles disminuidos inicialmente puedan contribuir a la alteración inmune de esta enfermedad al no producir una inmunosupresión y más importante permitir la propagación y el mantenimiento de la enfermedad (350).



**Figura 16:** *Regulación de la respuesta inmune por el TGF $\beta$ . La producción característica del TGF $\beta$  por un subgrupo específico de células T<sub>H</sub>, es en la actualidad un importante factor reconocido en la tolerancia oral. Al mismo tiempo, que éste subgrupo produce citocinas características de células efectoras de la clase T<sub>H2</sub>, la secreción de TGF $\beta$  es importante para su capacidad de suprimir la respuesta inflamatoria. Aunque si bien, el mecanismo exacto para que estas células secreten TGF $\beta$ , aún no está definido, su progreso es claramente antagonizado por factores que promuevan la diferenciación hacia una respuesta T<sub>H1</sub> (339).*

## **Justificación**

La DM es un modelo de enfermedad vascular crónica en la que, las alteraciones de la homeostasis de la glucosa desencadenan una disfunción multiorgánica, que se manifiesta clínicamente como complicaciones específicas microvasculares y macrovasculares. A pesar de que en la última década se han obtenido evidencias epidemiológicas que implican directamente a la hiperglucemia crónica como el desencadenante primordial de estas complicaciones, quedan aún por establecer los mecanismos causales de esta asociación. Estos incluyen no solamente la naturaleza biológica del daño inducido por la hiperglucemia, sino también como este daño se acumula en los diferentes tejidos y que procesos existen para repararlos. El principal objetivo en la DM es poder intervenir antes del desarrollo de las complicaciones crónicas, por lo que la identificación de estos mecanismos patogénicos nos permitiría esta posibilidad de intervención precoz. Por lo tanto, es de gran interés el diseño de estudios que intenten discernir este proceso. Actualmente, existen varias hipótesis del mecanismo patogénico que relaciona la hiperglucemia y las complicaciones, que se han descrito con profundidad en la introducción de esta tesis. La existencia de más de una hipótesis nos sugiere que estas alteraciones probablemente reflejen una consecuencia diferente de un mecanismo patogénico común, o tal vez, simplemente, que expresen una distinta sensibilidad de los tejidos a diferentes mecanismos.

La motivación de esta tesis fue avanzar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos relacionados con el desarrollo de las complicaciones crónicas de la DM. La asociación bien establecida entre la aterosclerosis y la peroxidación lipídica renovaba el interés del estrés oxidativo (EO) generado por la hiperglucemia, como un potencial mecanismo de las complicaciones crónicas de la DM. Sin embargo, las evidencias clínicas y experimentales disponibles, que apoyaban una asociación entre el EO y la hiperglucemia eran indirectas y mostraban unos resultados contradictorios y, en algunos momentos, confusos. Esto, probablemente, era el resultado de que la investigación humana del EO estaba limitada por la ausencia de índices fidedignos de este proceso que sean bioquímicamente estables y susceptibles de ser cuantificados de manera exacta y no invasiva. También, los estudios clínicos que asociaban el EO con las complicaciones crónicas de la DM estaban realizados en muestras pequeñas y altamente seleccionadas de individuos con estadios avanzados de la enfermedad. Asimismo, el papel del control glucémico en la modificación de la peroxidación lipídica presentaba resultados contradictorios. La confirmación del EO como un

mecanismo a través del cual la hiperglucemia ejerce su efecto deletéreo, requiere información del grado del EO en etapas previas al desarrollo de las complicaciones de la DM, como en la pre-diabetes o al inicio clínico de la enfermedad, así como la demostración, de que la corrección de la hiperglucemia es capaz de disminuir la actividad de esta vía metabólica. En 1990 la descripción de los F2- isoprostanos supuso un progreso considerable en la valoración y cuantificación del EO *in vivo*, entre los que el 8-iso-PGF<sub>2α</sub> es considerado actualmente como el marcador más fidedigno del EO *in vivo*.

Por otro lado, la participación en un estudio multicéntrico acerca de la prevalencia de nefropatía diabética (ND) en pacientes con DM1, nos proporcionó una evidencia directa de un elevado consumo de tabaco y de la asociación entre el consumo de tabaco y la prevalencia de ND en este grupo poblacional. Estudios previos habían establecido un enlace entre el consumo de tabaco y el EO, ya que el humo del tabaco tiene numerosos oxidantes capaces de producir peroxidación lipídica. Consistente con esta noción, Morrow et al, demostraron en un grupo de sujetos no diabéticos fumadores que las concentraciones plasmáticas y urinarias de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> estaban aumentadas en fumadores comparados con sujetos no fumadores, apareados para edad y sexo. Además, en la patogénesis de la ND, uno de los mecanismos más extensamente investigados es el factor beta de transformación del crecimiento (TGFβ<sub>1</sub>) debido a su acción fibrogénica, capaz de estimular a las células mesangiales glomerulares y las células epiteliales. Entre los factores descritos que pueden incrementar la expresión del TGF-β<sub>1</sub>, se incluyen la hiperglucemia, la angiotensina II, la hipoxia, y los productos finales de la glicosilación avanzada, entre otros. Nuestro grupo observó que el TGF-β<sub>1</sub> en plasma estaba especialmente elevado en los pacientes con DM1 fumadores, comparados con sujetos diabéticos no fumadores y con sujetos no diabéticos fumadores o no y, actualmente, también hay información acerca de un papel de los RLO generados por la hiperglucemia en incrementar la expresión del TGFβ<sub>1</sub>, a través de un mecanismo dependiente de la PKC.

## **Hipótesis**

Con toda la evidencia expuesta anteriormente, nos planteamos la HIPÓTESIS de este trabajo: La hiperglucemia y el consumo de tabaco ejercen su efecto deletéreo a través del estrés oxidativo y del factor transformador del crecimiento  $\beta_1$ .



## **Objetivos**

El abordaje de nuestra hipótesis la planeamos mediante estudios poblacionales y de intervención terapéutica, con los siguientes objetivos:

## **Control glucémico**

### **Objetivo**

Investigar en pacientes con DM1 el efecto de la hiperglucemia y del control glucémico sobre el estrés oxidativo y la fibrogénesis.

## **Consumo de Tabaco**

### **Objetivo**

Investigar en pacientes con DM1 el efecto del consumo de tabaco y de su cesación sobre el estrés oxidativo y la fibrogénesis.

## ***Control glucémico***

### **Objetivo**

Investigar en pacientes con DM1:  
el efecto de la hiperglucemia y del control glucémico sobre  
el estrés oxidativo y la fibrogénesis

## 1. Justificación del objetivo

En los últimos años, se han realizado numerosas investigaciones acerca del papel del EO como una posible vía patogénica de la hiperglucemia para inducir las complicaciones crónicas de la DM. Se han descrito diversas alteraciones bioquímicas que relacionan la hiperglucemia con el incremento en la producción de los RLO. De igual manera, hay datos que sugieren que el mecanismo de defensa antioxidante está alterado en los sujetos con DM, sugiriendo un defecto en la eliminación de los RLO. Hoy en día, el indicador más fidedigno de la peroxidación lipídica *in vivo* son los IsoP<sub>s</sub>-F<sub>2</sub> y el mayor interés se ha dirigido hacia el 8-epi-PGF<sub>2</sub>α, al haberse observado que presenta actividades biológicas, y que sus concentraciones se encuentran aumentadas en diferentes condiciones asociadas con un incremento del EO, como el envejecimiento, la hipercolesterolemia y el CT, entre otras.

En pacientes con DM1, las evidencias experimentales previas han confirmado la asociación entre la hiperglucemia y el EO, demostrando que el plasma de pacientes con DM1 contiene concentraciones aumentadas de TBARS, de dienes conjugados y de hidroperóxidos lipídicos, que son marcadores clásicos de la peroxidación lipídica. Los IsoP<sub>s</sub>-F<sub>2</sub> también han sido evaluados en población con DM1 y, de acuerdo con el concepto de peroxidación lipídica aumentada en la DM1, se ha descrito tanto un aumento en la producción como en la excreción urinaria de 8-iso-PGF<sub>2</sub>α. Otros estudios, sin embargo, utilizando la misma metodología, no han confirmado la elevación de los niveles de IsoP<sub>s</sub>-F<sub>2</sub> en pacientes con DM1. Estas discrepancias en los resultados probablemente estén relacionadas con la selección de los pacientes, que no tiene en cuenta otros factores que podrían influenciar en la peroxidación lipídica, como la edad avanzada, las consecuencias metabólicas de la hiperglucemia crónica, la presencia de complicaciones crónicas y el CT.

En los últimos tiempos, el TGFβ<sub>1</sub> ha generado mucho interés en la comunidad científica debido a su importancia en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. El TGFβ<sub>1</sub> es el ejemplo de una clase de factores de crecimiento cuyas acciones se han implicado en numerosos procesos patofisiológicos que incluyen enfermedades como la aterosclerosis, la hipertensión, la DM, entre otras. Una de las características principales de este factor de crecimiento es la naturaleza variada de sus acciones, una característica que se considera, se origina

en que sus efectos son dependientes de contexto celular en el que actúa. Recientemente, se han descubierto los eventos moleculares por los cuales este factor puede iniciar sus efectos celulares, proporcionando una estructura para la comprensión del mecanismo molecular de la acción pleiotrópica o “específica del contexto” de esta clase de factores de crecimiento. Esto es particularmente relevante en la patofisiología de la DM porque la combinación de múltiples tipos de células (endoteliales, del músculo liso, leucocitos, glomerulares, mesangiales) que pueden afectarse por el ambiente bioquímico y humoral de esta enfermedad, proporciona numerosos y distintos contextos biológicos en los que el TGF $\beta_1$  puede actuar.

Por su acción profibrótica, mucha de la investigación del TGF $\beta_1$  se ha realizado principalmente en modelos humanos y animales de ND, sugiriéndose que los efectos hipertróficos y proescleróticos de la hiperglucemia sobre las células glomerulares y mesangiales, están mediados por la producción autocrina y activación del TGF $\beta_1$ . Se han identificado varios factores que estimulan la expresión del TGF $\beta_1$ , como la angiotensina II, la hipoxia, la hiperglucemia, los AGEs, el EO, entre otros. Todos ellos se han implicado en la patogénesis de las complicaciones crónicas de la DM. De la misma manera que con el EO, los estudios clínicos que han evaluado el efecto de la hiperglucemia sobre la secreción de esta citocina han mostrado resultados contradictorios, probablemente, debido a que muchos de estos estudios se han realizado en sujetos con complicaciones crónicas y por lo tanto con una exposición prolongada a un ambiente metabólico adverso.

Confirmar clínicamente la implicación de un determinado mecanismo en la patogenia de las complicaciones crónicas de la DM no es fácil. En general, en los diferentes estudios se compararon grupos con o sin complicaciones o con diferente grado de control metabólico, pero todos con evoluciones más o menos prolongadas de la enfermedad. Se plantea la duda de si la activación de una vía patogénica puede ser causa o efecto de una complicación. El establecimiento del EO y la fibrogénesis como mecanismos patogénicos de conexión entre la hiperglucemia y las complicaciones, requiere información acerca de la actividad de estas vías metabólicas en etapas previas al desarrollo de las complicaciones, como en la pre-diabetes o al inicio clínico de la enfermedad, para de esta manera esclarecer si el EO o la fibrogénesis por sí mismos desempeñan un papel en el desarrollo de la DM1, como se ha sugerido en estudios experimentales. La

evaluación del EO y de la fibrogénesis tras la mejoría del control glucémico, nos permitirá valorar la asociación de estas vías metabólicas con la hiperglucemia. El inicio clínico de la DM1 es un modelo claro, en cuanto al tiempo de evolución de la enfermedad, que se conoce perfectamente. Por otro lado, es probablemente la situación clínica en DM donde se produce una mayor variación glucémica en un menor espacio de tiempo. Por todos estos argumentos comentados, se eligió al inicio clínico de la DM1 para analizar el efecto de la hiperglucemia en la activación del EO y la fibrogénesis.

*Publicaciones obtenidas de este objetivo (📖):*

***F<sub>2</sub> isoprostane is already increased at the onset of type 1 diabetes mellitus: Effect of glycaemic control***

FLORES L, RODELA S, ABIAN J, CLÀRIA J, ESMATJES E.  
*Metabolism 2004 ;53:1118-1120.*

***Transforming growth factor $\beta_1$  at onset of type 1 diabetes mellitus. A pilot study***

Flores L, Náf S, Hernáez R, Conget I, Gomis R, Esmatjes E  
*Diabetic Medicine 2004; 21:818-822.*

*Comunicaciones obtenidas de este objetivo(🗣️)*

- *The effect of improved metabolic control on transforming growth factor  $\beta_1$  at onset of type 1 diabetes mellitus*

FLORES L, MUR C, LARIO S, CAMPISTOL JM, ESMATJES E.  
*38<sup>th</sup> Annual Meeting of the EASD  
Budapests, Hungary, 1-5 Set. de 2002  
Comunicación publicada en Diabetología 2002;45, Suppl 1:A 1214, 391*

- *El factor beta de transformación del crecimiento ( TGFβ<sub>1</sub>) y control glucémico: Efecto de la insulinización en el debut de la diabetes mellitus tipo 1*

FLORES L, CAMPISTOL JM, NÁF S, ESMATJES E.  
*XIV Congreso de la Sociedad Española de Diabetes*  
*Cádiz 22-25 de Marzo de 2002*  
*Comunicación publicada en Avances en Diabetología 2002;45, Suppl 1:A*  
*1214, 391*

## **2. Metodología general**

Como instrumentos en el desarrollo de este objetivo se han utilizado la determinación tras un ayuno de por lo menos 10 horas de: glucemia, HbA<sub>1c</sub>, perfil lipídico y niveles plasmáticos de TGFβ<sub>1</sub>. Estos análisis se realizaron en 4 ocasiones, al inicio del estudio (previo al tratamiento con insulina), a los 7 días de iniciar el tratamiento (una vez corregida la cetosis y la hiperglucemia), a la semana 4 y a la semana 16 (al estabilizarse el control glucémico). Las muestras obtenidas fueron inmediatamente procesadas en el laboratorio central. De la misma manera, en cada una de las determinaciones se realizó una recogida de orina de 24 horas en un frasco con Tris-HCl (pH=6.5), que se conservó a -70°C hasta su procesamiento, para la determinación de la excreción urinaria de TGFβ<sub>1</sub> y de 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. La determinación de 8-iso-PGF<sub>2</sub> sólo se realizó en dos ocasiones, al inicio del estudio y en la semana 16.

### Medición de la glucemia en ayunas

Se determinó a partir de una muestra basal de suero, según el método de la glucosa-oxidasa.

### Medición de la HbA<sub>1c</sub>

A partir de la muestra basal de suero se determinó la HbA<sub>1c</sub> mediante la cromatografía líquida de alta resolución

### Medición de lípidos

A partir de la muestra basal de suero, se determinaron los niveles de colesterol, triglicéridos, y colesterol-HDL, mediante técnicas estándares enzimáticas de espectrofotometría. El colesterol LDL fue determinado utilizando la ecuación de Friedewald.

Medición de la excreción urinaria de isoprostanos

Una alícuota de 2 ml de orina conservada a  $-70^{\circ}\text{C}$  fue centrifugada para eliminar las partículas sólidas y neutralizadas con 480  $\mu\text{l}$  de estándar interno (EI) de 8-iso-prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}\text{-d}_4$  (Cayman Chemical, 2.8  $\text{pg}/\mu\text{l}$  en etanol). Esta muestra se dejó a temperatura ambiente 15 minutos y se centrifugó suavemente, luego se añadió 0.5 mL de 15% de hidróxido de potasio (KOH) y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, la muestra fue ajustada a un  $\text{pH}=3$  con 3M de ácido hidroclorehídrico (HCl) y se centrifugó durante 5 minutos a 600 xg. El sobrenadante fue extraído en un cartucho de 100 mg LMS polymer (Varian, Harbor City, CA) pre-acondicionado con etanol y buffer Sorensen (0.06 M  $\text{pH}$  7.4). La muestra fue cargada en el cartucho y lavada con buffer Sorensen y una mezcla de etanol/agua 5:95 y el eluido de isoprostano con 1 mL de etanol. El extracto fue evaporado a sequedad, resuspendido con 0.5 mL de Eicosanoid Affinity Column Buffer (1/5) y posteriormente cargado en una columna de afinidad 8-isoprostano previamente acondicionada con buffer afin siguiendo las instrucciones del proveedor (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). La columna se lavo con 2 ml de Eicosanoid affinity column buffer (1/5) y 2 ml de agua ultrapura, posteriormente fue eluida con solución de elusión (etanol/agua 95:5). El eluido fue evaporado a sequedad y re-suspendido en 100  $\mu\text{l}$  de acetato de amonio al 0.5%,  $\text{pH}=6.5$  (AMAC).

Los extractos (40  $\mu\text{l}$ ) fueron analizados por cromatografía líquida/espectrometría de masa (HPLC/MS-MS) bajo condiciones de gradiente usando una columna simétrica C18 50 x 1 mm (partículas de 3.5  $\mu\text{m}$ , Waters, Barcelona, Spain) y un Finnigan TSQ700 triple quadrupole MS suministrado con un electrospray (Thermoquest, Barcelona, Spain). El solvente A, fue 0.02% AMAC y el solvente B fue 0.02% AMAC/metanol/acetoneitrile 75:100:50. El gradiente se inicio a 30% B y se incremento a 65% B en 1 segundo, posteriormente a 90% B en 6 minutos. La velocidad del flujo fue de 50  $\mu\text{L}/\text{minuto}$ . La cuantificación del isoprostano fue realizada utilizando el método de barrido iónico y detección de los iones negativos. Los correspondientes iones (M-H) del 8-iso-prostaglanin  $\text{F}_{2\alpha}$  (352.7) y su EI (356.7) fueron seleccionados por fragmentación (energía de colisión 28 eV, presión de colisión 2.1 mTorr). Los productos iónicos  $m/z$  192.5 (8-iso-prostaglanin  $\text{F}_{2\alpha}$ ) y el 196.5 (EI) se usaron para cuantificación. Se utilizaron muestras de orina de voluntarios sanos para preparar las muestras estándar para las curvas de calibración (0 a 500  $\text{pg}/\text{mL}$ ) y las muestras de calidad



de control ( 50 a 250 pg/ml). El coeficiente de variación intra e interensayo a un nivel de 100 pg/mL fueron de 7% y 16%, respectivamente.

### **Protocolo de extracción de orina para isoprostanos**

#### 1. Extracción en fase sólida

##### **( 2 ml orina)**

- Añadir el estándar interno, 480  $\mu$ l ( 2.8 pg/ $\mu$ l)
- Dejar a temp. ambiente 15 min y centrifugar suavemente
- Añadir 0.5 ml KOH (15%) y agitar
- Dejar a temp. ambiente 30 min y centrifugar suavemente
- Ajustar a PH 3 con HCL 3 M
- Centrifugar

##### **Extracción en fase sólida**

##### **Cartuchos LMS polymer Varian ( 100 mg)**

- Acondicionar cartucho: 1 ml EtOH absoluto  
2 ml Sorensen buffer
- Cargar muestra
- Lavar: 1 ml Sorensen buffer  
2 ml EtOH/H<sub>2</sub>O 5/95
- Dejar secar cartucho con aire 1.5 min
- Añadir 1 ml EtOH absoluto
- Dejar equilibrar 5 min
- Eluir
- Evaporar extracto a sequedad
- Redisolver en 0.5 ml Eicosanoid Affinity Column Buffer (1/5)

#### 2. Purificación con inmunoabsorbente (utilización de columnas de afinidad)

##### **Purificación con inmunoabsorbente**

- Centrifugar el extracto anterior durante 2 min a 14000 rpm
- La columna ya viene acondicionada con el buffer correspondiente
- Cargar muestra

- Lavar: 2 ml Eicosanoid Affinity Column Buffer (1/5) + 2 ml H<sub>2</sub>O ultrapure
- Añadir 2 ml de solución de elusión (EtOH:H<sub>2</sub>O 95:5).
- Evaporar el extracto a sequedad(\*)
- Redisolver inmediatamente en el buffer o solvente apropiado (\*\*)

(\*) Es muy importante que no queden trazas de solvente orgánico ya que podría afectar al inmunoensayo, en el caso que se realice.

(\*\*) En nuestro caso redisolvemos en 100 µl de ACAM 0.5% pH 6.5, ya que nuestro objetivo es la determinación por HPLC/MS-MS.

### **Condiciones: HPLC/MS-MS**

#### **HPLC**

Columna: Waters Symmetry C18 50 x 1 mm, 3.5 µm.

Filtro + precolumna C18 [C280 2.0 mmd.i x 1 cm (Upchurch)] +  
columna. Conexiones peek roja

Flujo: 50 µl/min

Eluyente: A) ACAM 0.02% pH6.5

B) ACAM 0.02% pH 6.5/MeOH/ACN 75:100:50

Gradiente:

**30**\_\_\_0.01'\_\_\_**65**\_\_\_6'\_\_\_**90**\_\_\_4'\_\_\_**90**\_\_\_1'\_\_\_**30**\_\_\_9'\_\_\_**30**

Volumen de inyección: 40 µl

Nota: a los 4 min de la inyección el asa vuelve a la posición de carga: para ello se hace uso de la válvula B del autoinyector.

#### **MS-MS**

Tune: 7 msms, iones negativos

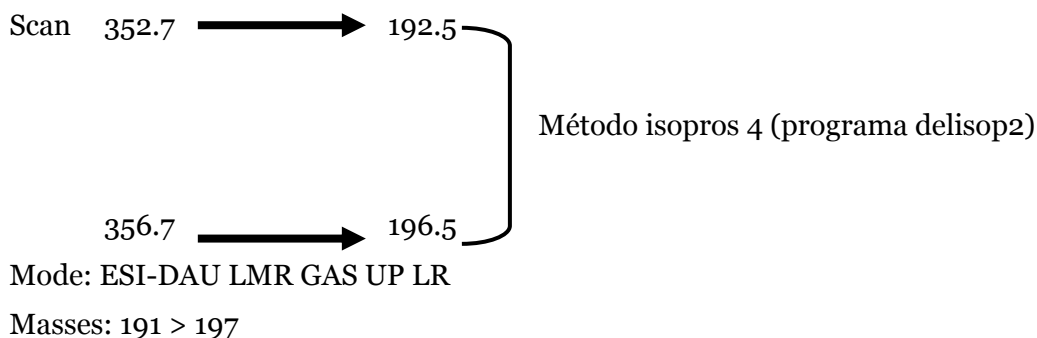
ESI needle voltage: 4.0 KV

Emult: 1800 V

Coff: 28 V

Pcollision (Ar):2.1 mT

Sheath gas: 70 psi



#### Medición de las concentraciones plasmáticas de TGFβ<sub>1</sub>

La medición de este parámetro se realizó en sangre venosa recogida en tubos que contenían EDTA, con un sistema al vacío para evitar la aspiración durante la extracción sanguínea, que podría provocar lisis de las plaquetas, que son la principal fuente de TGFβ<sub>1</sub>. Los tubos se mantenían inmediatamente después de su extracción a 4° centígrados, hasta su centrifugación (< ½ hora de su extracción). La centrifugación se realizaba a 1000 g durante 30 minutos, posteriormente se obtenía el plasma y se guardaba a -70°C hasta el análisis. Se realizó la determinación del TGFβ<sub>1</sub> total. Para activar el TGFβ<sub>1</sub> latente a TGFβ<sub>1</sub> inmunoreactivo y por lo tanto susceptible de ser detectado mediante inmunoanálisis, realizamos un proceso de acidificación (por cada 0,1 ml de muestra se añadía 0,1 ml de ácido acético 2,5 N/10 M urea. pH 7,2) y neutralización (añadiendo 0,1 ml de 2.7 N NaOH/1M HEPES. pH 7,6). El TGFβ<sub>1</sub> fue determinado mediante un análisis de fase sólida, inmunosorbente, ligado a enzima, tipo sándwich, específico para TGFβ<sub>1</sub> [ELISA; Quantikine; R & D System, Mineapolis, MN, USA]. Se construyó, una curva estándar de TGFβ<sub>1</sub> utilizando 2.000, 1.000, 500, 250, 62.5, y 31.25 de proteína de TGFβ<sub>1</sub> recombinante. Los niveles mínimos detectados de TGFβ<sub>1</sub> fueron 7 pg/ml. El coeficiente de variación intra e interensayo fueron de 6.5 y 10.3 %, respectivamente.

#### Medición de la excreción urinaria de TGFβ<sub>1</sub>

De la orina recogida durante 24 horas, cuantificada la diuresis, se guardaron 3 ml en tubos de propileno a -70°C. El TGFβ<sub>1</sub> urinario fue medido por el método descrito por Ellis et al(referencia). En resumen: 2 ml de la orina descongelada fue colocada en un instrumento Centricon YM-O (Amicon) pretratado con Tween-20 y centrifugado en un rotor de ángulo fijo a 3000 g

durante 90 minutos. El volumen obtenido con el concentrado de TGF $\beta_1$  fue diluido a 200  $\mu$ l con solvente RD5, suministrado en el equipo (Quantikine; R & D System, Mineapolis, MN, USA) y posteriormente activado con 1.0 NHCl. El factor de concentración obtenido por este método fue de 7 y el rango de recuperación entre el 85 al 98%. Posteriormente, las muestras de orina fueron neutralizadas con 1.2 N NaOH/0.5M HEPES y el TGF $\beta_1$  determinado mediante un análisis inmunsorbente ligado a enzima. El coeficiente de variación intra e interensayo determinado en nuestro laboratorio fueron de 9,8 y 16%, respectivamente.

#### Análisis estadístico

La excreción urinaria de TGF $\beta_1$  y de 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  se expresan como cociente de los niveles de creatinina en orina (pg/mg de creatinina). Todos los datos son expresados como media  $\pm$  DS. Los datos fueron analizados mediante pruebas no paramétricas para evitar la consideración de la distribución de las variables medidas. Para la comparación entre el grupo de pacientes con DM1 y el grupo control, se utiliza la prueba U de Mann-Whitney. Dentro del grupo de pacientes con DM1, la diferencia entre los valores basales (semana 0) y tras el inicio del tratamiento con insulina (semana 16) en la excreción urinaria de 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  se analizó mediante la prueba de los rangos signados (Wilcoxon) para datos pareados. La prueba de Friedman fue utilizada para analizar los resultados en los diferentes tiempos evaluados, de la concentración de TGF $\beta_1$  en plasma y su excreción de TGF $\beta_1$  en orina. La relación entre las variables fue analizada utilizando la prueba de correlación de rangos o de Spearman. Un valor P < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

### **3. Desarrollo del objetivo**

#### Modelo clínico

El inicio clínico de la DM1 nos provee un modelo de investigación ideal para poder definir el efecto de la hiperglucemia *per se* sobre el EO y la fibrogénesis, al eliminar el efecto de la exposición prolongada a la hiperglucemia y al poder obtener un buen control metabólico en un tiempo reducido, tras el inicio del tratamiento con insulina. Igualmente, este modelo clínico nos permite obtener información sobre la actividad de ambas vías metabólicas en una etapa precoz de la enfermedad.

### Sujetos y Métodos

Los criterios de inclusión en este estudio fueron: pacientes con inicio clínico de DM1 (en concordancia con los criterios diagnósticos de la Asociación Americana de Diabetes(12)), normotensos (PA casual < 130/80 mmHg) y no fumadores. Se excluyeron a los pacientes que al diagnóstico de la enfermedad presentaban una glucemia > 300 mg/dl, cetoacidosis (que nos obligaba a iniciar el tratamiento con insulina), embarazo, enfermedad intercurrente, consumo de suplementos multivitamínicos o aspirina o con tabaquismo activo. Los pacientes tras el diagnóstico clínico de la DM1 ingresaron en la sala de hospitalización de la Unidad de Diabetes durante un mínimo de 7 días.

Los pacientes que cumplían los criterios de inclusión y previo al inicio del tratamiento con insulina, realizaban una recogida de orina durante 24 horas. Una vez finalizada la recogida de orina, se realizó la extracción en ayunas de sangre, para la determinación de los parámetros metabólicos mencionados anteriormente en la sección de metodología. Tras la obtención de ambas muestras basales, se iniciaba el tratamiento con insulina en un régimen de dosis múltiples. Paralelamente, los pacientes se incluyeron en un programa de educación diabetológica durante 5 días para individuos con diagnóstico reciente de DM1. Una semana después del inicio del tratamiento con insulina y tras la estabilización clínica (considerada como la corrección de la hiperglucemia y la cetosis) se valoraba en ayunas la función  $\beta$  residual (mediante la administración de 1 mg de glucagón ev.), se determinaban los anticuerpos relacionados con la DM1 [anti GAD (anticuerpos contra el ácido glutámico descarboxilasa), IA2 (anticuerpos contra la proteína tirosin fosfatasa) y se repetían los parámetros metabólicos y urinarios evaluados en la determinación basal.

El protocolo de actuación al inicio clínico de la DM1 contemplaba una visita clínica cada 4 semanas durante los primeros cuatro meses tras el diagnóstico. En cada visita se ajustaba las dosis de insulina para alcanzar niveles pre-prandiales de glucosa entre 70-126 mg/dl y postprandiales < 180 mg/dl basados en 4-6 determinaciones de glucosa capilar y para evitar eventos hipoglucémicos. Durante todo el estudio los pacientes recibieron una dieta ajustada a su edad e índice de masa corporal. En la primera visita tras el alta hospitalaria ( a la semana 4) y en la semana 16 ( porque se consideró que se había alcanzado la estabilidad clínica) los pacientes acudían con una orina recogida durante 24 horas y en ayunas para la determinación de todos los parámetros

metabólicos y urinarios del estudio. En la semana 16 se repetía además la valoración de la función  $\beta$  residual.

Como grupo control se utilizaron sujetos de edad e índice de masa corporal similares, los cuales proporcionaron en una sola ocasión orina recogida durante 24 horas y una muestra en ayunas de sangre. Los valores de los distintos parámetros analizados en la semana 16 en los sujetos con DM1 se compararon con los obtenidos en el grupo control.

## 4. Resultados

### F<sub>2</sub> Isoprostane Is Already Increased at the Onset of Type 1 Diabetes Mellitus: Effect of Glycemic Control

Lilliam Flores, S. Rodela, J. Abian, Joan Clària, and E. Esmatjes

Much evidence has suggested that oxidative stress (OS) may play a role in the pathogenesis of diabetic complications. However, the relationship between hyperglycemia and OS is inconsistent in diabetic clinical studies. The aim of this study was to evaluate the effect of normalization of blood glucose levels on urinary 8-epi-prostaglandin F<sub>2α</sub> (8-epi-PGF<sub>2α</sub>) excretion at the onset of type 1 diabetes. We studied 14 type 1 diabetic patients (50% males; mean age, 24.3 ± 4.9 years) and 14 control subjects matched by age and body mass index. A 24-hour urine collection was performed to determine 8-epi-PGF<sub>2α</sub> as an integrated index of OS production at baseline, before starting insulin therapy, and 16 weeks later. Insulin treatment induced a significant reduction in glycosylated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) (from 11.5% to 5.4%  $P = .0001$ ), triglycerides (from 1.0 to 0.8 mmol/L,  $P = .002$ ), and an increase in high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol levels (from 1.1 to 1.5 nmol/L,  $P = .01$ ) at week 16. This improvement in metabolic control was associated with a statistically significant reduction in 8-epi-PGF<sub>2α</sub> values (from 92.0 ± 41.5 to 66.9 ± 28.9 pg/mg urinary creatinine excretion,  $P = .015$ ), although compared with the control group, 8-epi-PGF<sub>2α</sub> values remained higher in diabetic patients (66.9 ± 28.9 v 39.1 ± 13.8 pg/mg creatinine,  $P = .004$ ). Enhanced OS is present in early clinical phases of type 1 diabetes, and the amelioration in metabolic control is associated with improvement in this pathogenic pathway.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**L**IPID PEROXIDATION (LP) is the main marker of oxidative stress (OS), a pathogenic pathway strongly related to the development of diabetic complications. Under diabetic conditions, OS may be due to many factors, such as increased reactive oxygen species (ROS) production via glucose autooxidation, nonenzymatic protein glycation, oxidative DNA damage, decreased antioxidant status, and consequently, ineffective scavenging of ROS.<sup>1-3</sup> Experimental data have clearly demonstrated that hyperglycemia mediates the deleterious effects of OS. However, the relationship between glycemic control and OS is inconsistent in diabetic clinical studies.<sup>4-5</sup> This discrepancy is probably related to the lack of specificity and sensitivity in the methods available to assess OS *in vivo* or to the fact that these studies do not generally take into account the confounding effects of other factors, which have been shown to significantly increase OS. F<sub>2</sub> isoprostane, of which urinary excretion of 8-epi-prostaglandin F<sub>2α</sub> (8-epi-PGF<sub>2α</sub>) is an integrated index of its production, is currently considered the most reliable marker of LP *in vivo*.<sup>6</sup> Moreover, an ideal clinical model should allow evaluation of the effect of relevant changes in glycemic status without the possible artefactual effects of the metabolic consequences of chronic hyperglycemia or the presence of diabetic complications. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of normalization of blood glucose levels on urinary 8-epi-PGF<sub>2α</sub> excretion at the onset of type 1 diabetes.

#### MATERIALS AND METHODS

We studied 14 type 1 diabetic patients recruited from an adult Diabetes Unit at the onset of the disease (50% males; mean age, 24.3 ±

4.9 years) and 14 healthy volunteers (42% males; mean age, 27.4 ± 3.5). The 2 groups were matched with respect to age and body mass index. All patients were nonsmokers and were normotensive (<130/80 mm Hg). Diagnosis of type 1 diabetes was achieved according to the National Diabetes Data Group criteria.<sup>7</sup> Patients were excluded if, at admission, they presented glycemia > 300 mg/dL or ketoacidosis (indicating the immediate need for insulin therapy), pregnancy, intercurrent disease, consumption of multivitamin supplements or aspirin, or were active smokers. The clinical and biochemical characteristics of the diabetic patients and control subjects are summarized in Table 1.

Informed consent was obtained from each participant, and the Ethical Committee of the Hospital Clinic approved the experimental protocol.

#### Study Design

After the diagnosis of type 1 diabetes, the patients were hospitalized. In all the subjects of both groups, 24-hour urine collection was performed to determine urinary creatinine, albumin, and 8-epi-PGF<sub>2α</sub> excretion. Thereafter, a blood sample was obtained after overnight fasting to determine glycemia, creatinine, glycosylated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), total cholesterol, triglycerides, and high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol and low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol.

The diabetic patients then initiated insulin therapy with multiple-dose insulin regimens, and in these patients all the determinations were repeated 16 weeks after hospital discharge. One week after starting insulin therapy and having achieved clinical stabilization, the glucagon test was performed to evaluate residual  $\beta$ -cell function (fasting C-peptide levels before and 6 minutes after an intravenous injection of 1 mg glucagon) and antibodies related to type 1 diabetes mellitus (glutamic acid decarboxylase [GAD] and tyrosine phosphatase-like protein [IA<sub>2</sub>]) were also determined.

Patients were visited every 4 weeks after discharge to adjust insulin therapy to obtain fasting glycemia between 3.8 to 6.6 mmol/L and postprandial glycemia < 8.8 mmol/L to avoid hypoglycemic events and to adapt diet regimens to the needs of each patient. Comparisons between diabetic patients and control subjects were made at week 16 when metabolic control had improved.

#### Measurements of 8-Epi-PGF<sub>2α</sub>

Urine was collected over a 24-hour period with 3 mL being stored in polypropylene tubes at -70°C. Urine samples (2 mL) were centrifuged and spiked with 1.34 ng of the internal standard 8-epi-prostaglandin F<sub>2α</sub>-d4 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). The sample was left to equilibrate, and 0.5 mL 5% potassium hydroxide was added. After 30

From the Diabetes Unit and DNA Unit, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona; and the Structural and Biological Mass Spectrometry Unit, IDIBAPS, HBB-CSIC, Barcelona, Spain.

Submitted September 22, 2003; accepted April 14, 2004.

Address reprint requests to E. Esmatjes, MD, Diabetes Unit, Hospital Clinic, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

0026-0495/04/5309-0017\$30.00/0

doi:10.1016/j.metabol.2004.04.005

Table 1. Clinical Characteristics of the Study Subjects

	Type 1 Diabetes Mellitus		Control	P*
	Baseline	Week 16		
No.	14	14	14	
Age (yr)	24.3 ± 4.9	-	27.4 ± 3.5	
Sex (M/F)	7/7	-	6/8	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.6 ± 3.4	-	22.1 ± 3.5	
Hyperglycemia/ketosis	4/8	-	-	
Fasting glucose (mmol/L)	11.3 ± 3.9	6.9 ± 1.8	4.8 ± 0.5	.001
HbA <sub>1c</sub> (%)	11.5 ± 2.1	5.4 ± 0.6	4.1 ± 0.3	.001
Cholesterol (mmol/L)	4.8 ± 1.1	4.7 ± 1.0	4.7 ± 0.9	
Triglycerides (mmol/L)	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.3	.002

Abbreviations: BMI, body mass index; HbA<sub>1c</sub>, glycosylated hemoglobin.

\*Diabetic patients: basal v week 16.

minutes of equilibration, the sample was adjusted to pH 3 with 3 mol/L hydrochloric acid and centrifuged (5 minutes at 600 × g). Prostaglandins in the supernatants were absorbed in a 100-mg LMS polymer cartridge (Varian, Harbor City, CA). After washing, the isoprostane was eluted with 1 mL ethanol.

This extract was further purified using an 8-isoprostane-affinity column as indicated by the supplier (Cayman Chemical). The resulting extract was evaporated and redissolved in 100 µL 0.5% ammonium acetate pH, 6.5 (AMAC). Extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using a 50 × 1 mm Symmetry column (3.5-µm particles, Waters, Barcelona, Spain) and a Finnigan TSQ700 triple quadrupole MS provided with an electrospray source (Thermoquest, Barcelona, Spain). A 0.02% AMAC/methanol/acetonitrile solvent gradient was used for isoprostane separation. The flow rate was 50 µL/min. The (M-H) ions from the 8-isoprostane F<sub>2α</sub> (352.7) and its internal standard (356.7) was selected for fragmentation (collision energy 28 eV, collision pressure 2.1 mTorr). The corresponding product ions at m/z 192.5 and 196.5, respectively, were used for quantification. A urine pool from a healthy volunteer was used to prepare the standard samples for the calibration curves and the quality control samples. The intra- and interassay coefficients of variation of the assay at the 100 pg/mL level were 7% and 16%, respectively.

#### Autoantibody Measurements

GAD antibody (GADAb) measurements were determined by radiobinding assays and were considered positive when above 2 U/mL. The assay for GADAb in the second GADAb proficiency test achieved 100% sensitivity and 100% specificity. IA<sub>2</sub>Ab titers were measured in a radiobinding assay and considered positive when above 0.8 U/mL. The interassay and intra-assay coefficient of variation of IA<sub>2</sub>Ab determination were 7% and 5%, respectively.

#### Laboratory Studies

Total serum cholesterol, HDL-cholesterol, and triglyceride levels were assessed with standard enzymatic spectrophotometric techniques, and LDL-cholesterol was determined using the Friedewald equation. Fasting blood glucose was measured with the glucose oxidase method and HbA<sub>1c</sub> was measured by high-performance liquid chromatography. C-peptide was determined using a radioimmunoassay (limit of detection 0.033 mmol/L; intra-assay coefficient of variation 2.6%; interassay coefficient of variation 4.4%) and a commercially available kit (Bick Santeg, Dietzenbach, Germany).

#### Statistical Analysis

8-Epi-PGF<sub>2α</sub> was expressed as the ratio of urinary creatinine levels (pg/mg creatinine). Data are shown as the mean ± SD. The Mann-

Whitney U test was used to compare the 2 groups, and in the diabetic group, the difference between baseline and after insulin therapy values was analyzed with the Wilcoxon signed rank test. Correlations were analyzed by the Spearman rank correlation test. A P value < .05 was considered statistically significant.

## RESULTS

Fourteen patients who fulfilled inclusion criteria were evaluated. At admission all patients presented hyperglycemia and 10 ketonuria. All patients showed autoantibodies related to type 1 diabetes, 83% of which were anti-GAD<sup>+</sup> and 66% were IA<sub>2</sub><sup>+</sup>. No differences were noted in any clinical variable evaluated between type 1 diabetic patients and control subjects. In relation to control subjects, urinary 8-epi-PGF<sub>2α</sub> excretion was significantly higher in type 1 diabetics (66.9 ± 28.9 v 39.1 ± 13.8 pg/mg creatinine, P = .004). Insulin therapy produced a clear improvement in metabolic control as reflected by a marked reduction in HbA<sub>1c</sub> (from 11.5% (week 0) to 5.4% (week 16), P = .0001) as well as in the lipid profile with a significant decrease in triglycerides (1.0 ± 0.3 at week 0 and 0.8 ± 0.3 mmol/L at week 16, P < .002) and an increase in HDL-cholesterol (1.1 ± 0.2 at week 0 and 1.5 ± 0.3 mmol/L at week 16, P < .01) and a tendency to decrease LDL-cholesterol (3.0 ± 1.2 at week 0 and 2.4 ± 0.7 mmol/L at week 16, P = .06). This amelioration in metabolic control was associated with a statistically significant reduction in 8-epi-PGF<sub>2α</sub> (from 92.0 ± 41.5 to 66.9 ± 28.9 pg/mg urinary creatinine excretion, P = .015) (Fig 1). No correlation was found between 8-epi-PGF<sub>2α</sub> and HbA<sub>1c</sub>, total cholesterol, triglycerides, HDL-, and LDL-cholesterol.

## DISCUSSION

At present, numerous data support the concept that LP, a marker of OS, is enhanced in diabetes mellitus.<sup>1-5</sup> However, some studies have shown controversial results, probably related to shortcomings in the methods used, because most studies use indirect measurements of LP including susceptibility of LDL to in vitro oxidation or malondialdehyde determination, techniques which are not very specific or accurate.<sup>8</sup> F<sub>2</sub>-isoprostanes are produced in vivo by cyclooxygenase-independent free radi-

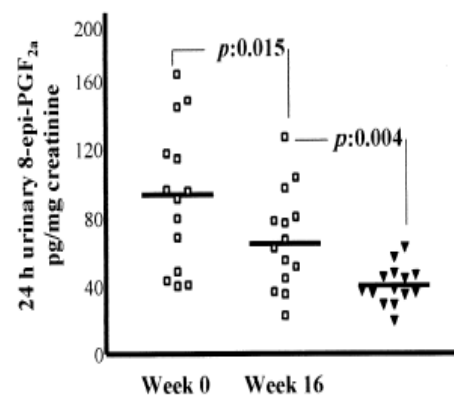


Fig 1. Urinary 8-epi-PGF<sub>2α</sub> excretion at onset of clinical type 1 diabetes (□) and in healthy subjects (▼). Symbols represent individual measurements; horizontal bars represent mean value for each group.



cal peroxidation of arachidonic acid and are released from membrane phospholipids in response to cellular activation, presumably through a phospholipase-mediated mechanism. They circulate in plasma as free forms or as esters in phospholipids, with the free form being excreted in urine.<sup>9</sup> We measured 24-hour urinary excretion of 8-epi-PGF<sub>2α</sub> not only because it is an integrated index of F<sub>2</sub>-isoprostane production, but also to avoid potential problems derived from artefactual generation of isoprostanes by autooxidation of arachidonic acid, which may be produced in plasma samples, and to reduce the impact of the previously described day-to-day variation of these parameters.<sup>10,11</sup> We used mass spectrometry because of its high specificity and sensitivity.<sup>6</sup> In relation to nondiabetic subjects, in this study we found 40% higher levels of 8-epi-PGF<sub>2α</sub> in diabetic patients. Our results are in concordance with those recently described by Davi et al<sup>12</sup> who found increased levels of urinary 8-epi-PGF<sub>2α</sub> in newly diagnosed (3 to 6 weeks) patients with type 1 diabetes mellitus compared with the age- and sex-matched nondiabetic control group.

With indirect measurements of LP, the effect of glycemic control has provided inconsistent results in the literature. Some groups have reported normalization of these levels with glycemic control,<sup>4,5</sup> while in other studies, normal levels were not achieved despite glycemic control.<sup>14,15</sup> The clinical model studied herein, at the onset of type 1 diabetes before and after initiation of insulin therapy, allowed us to analyze the effect of correction of hyperglycemia, without other known factors, which increase LP, such as ageing, metabolic consequences of chronic hyperglycemia, and the presence of diabetic complications. With this model we were able to obtain a very important

reduction in blood glucose levels, demonstrated by a difference of -6 points in HbA<sub>1c</sub>. This improvement in glycemic control was associated with a significant decrease in urinary 8-epi-PGF<sub>2α</sub> excretion. Our study cannot rule out the contribution of other metabolic parameters, which also improved with insulin therapy, such as lipid metabolism alterations [especially LDL-cholesterol levels, that has been reported as a determinant of enhanced 8-epi-PGF<sub>2α</sub> levels,<sup>16</sup> as well as the free fatty acid related to increased ROS generation<sup>17</sup>], ketosis correction,<sup>18</sup> and the effect of insulin per se.<sup>19</sup> We did not find any relationship between 8-epi-PGF<sub>2α</sub> levels and markers of metabolic control. One can hypothesize that although HbA<sub>1c</sub> is a good indicator of metabolic control, it reflects only part of the glycemic fluctuations observed in these patients and thus does not replicate the oxidative status. Another finding in this study was that 8-epi-PGF<sub>2α</sub> levels remained increased in diabetic patients despite achieving stable glycemic control in comparison with control subjects, which could be an early reflection of ongoing improvement in the disease state. Consistent with this argument are the findings of 2 recent studies, which reported that patients with type 1 diabetes mellitus normalize 8-epi-PGF<sub>2α</sub> levels in long-standing disease (> 1 year) mainly in patients with good glycemic control.<sup>12,13</sup>

In conclusion, in this study we observed that, at the clinical onset of type 1 diabetes mellitus, LP is already increased, and that improvement in glycemic control was associated with a decreased OS early in type 1 diabetes mellitus. Therefore, this is an important argument to recommend the optimization of metabolic control immediately after the diagnosis of type 1 diabetes mellitus to reduce the possible risk of future complications.

#### REFERENCES

- West I: Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17:171-180, 2000
- Baynes J, Thorpe S: Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48:1-9, 1999
- Dandona P, Thusus K, Cook S, et al: Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347:444-445, 1996
- Ceriello A, Giugliano D, Quattraro A, et al: Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diabet Med* 8:540-542, 1991
- Wicnusz-Wysocka B, Wysocki H, Byks H, et al: Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 27:193-197, 1995
- Mezzetti A, Cipollone F, Cucurullo F: Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: Isoprostanes and new markers on an old paradigm. *Cardiovasc Res* 47:475-488, 2000
- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20:1183-1197, 1997
- Halliwell B, Grootveld M: The measurement of free radical reactions in human. *FEBS Lett* 213:9-14, 1987
- Pratico D: F<sub>2</sub> isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 147:1-10, 1999
- Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, et al: Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:438-442, 2002
- Helmerson J, Basu S: F<sub>2</sub>-isoprostane and prostaglandin F<sub>2α</sub> metabolic excretion rate and day to day variation in healthy humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65:99-102, 2001
- Davi G, Chiarelli F, Santilli F, et al: Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus. Role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation* 107:3199-3203, 2003
- Hoeldtke R, Bryner K, McNeill D, et al: Oxidative stress and insulin requirements in patients with recent-onset type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1624-1628, 2003
- Sharma A, Kharb S, Chugh S, et al: Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E supplementation in diabetic patients. *Metabolism* 49:160-162, 2000
- Collier A, Rumley A, Rumley A, et al: Free radical activity and homeostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes* 41:909-913, 1992
- Caterina R, Cipollone F, Filardo F, et al: Low-density lipoprotein level reduction by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A inhibitor simvastatin is accompanied by a related reduction of F<sub>2</sub>-isoprostane formation in hypercholesterolemic subjects. No further effect of vitamin E. *Circulation* 106:2543-2549, 2002
- Tripathy D, Mohanthy P, Dhindsa S, et al: Elevation of free fatty acids induce inflammation and impairs vascular reactivity in health subjects. *Diabetes* 52:2882-2887, 2003
- Jain S, McVie R, Jackson R, et al: Effect of hyperketonemia on plasma lipid peroxidation levels in diabetic patients. *Diabetes Care* 22:1171-1175, 1999
- Dandona P, Aljada A, Mohanty P, et al: Insulin inhibits intracellular factor  $\kappa$ B and stimulates I $\kappa$ B in mononuclear cells in obese subjects: Evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab* 86:3257-3265, 2001



# Transforming growth factor $\beta_1$ at clinical onset of Type 1 diabetes mellitus. A pilot study

L. Flores, S. Näf, R. Hernáez, I. Conget, R. Gomis and E. Esmatjes

Diabetes Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer), University of Barcelona, Barcelona, Spain

Accepted 13 October 2003

## Abstract

**Aims** The aims of the study were to determine whether transforming growth factor  $\beta_1$  TGF- $\beta_1$  levels are raised at diagnosis of Type 1 diabetes mellitus and are related to blood glucose.

**Subjects and methods** Fourteen patients (mean age  $24.3 \pm 4.9$  years) admitted to hospital for onset of Type 1 diabetes were studied. On the first day of hospitalization, before insulin therapy, and at 1, 4 and 16 weeks, fasting blood glucose, HbA<sub>1c</sub>, lipid profile and TGF- $\beta_1$  levels and TGF- $\beta_1$  levels in 24-h urine were determined. The control group included 14 non-diabetic subjects with similar characteristics to those of the diabetic group.

**Results** Plasma and urinary TGF- $\beta_1$  levels were significantly lower in controls ( $4.7$  ( $1.6$ – $6.8$ ) ng/ml  $P < 0.001$ ;  $5.7$  ( $1.5$ – $8.5$ ) ng/mg urinary creatinine,  $P < 0.01$ ) than in patients with Type 1 diabetes mellitus [ $10.5$  ( $1.8$ – $24.9$ ) ng/ml;  $10.1$  ( $4.2$ – $29.8$ ) ng/mg urinary creatinine]. On study completion, HbA<sub>1c</sub> fell from  $11.6 \pm 2.0$  to  $5.4 \pm 0.6\%$  ( $P < 0.001$ ). Improved metabolic control was not associated with changes in plasma ( $9.4$  ( $2.6$ – $19.5$ )/ $5.9$  ( $1.6$ – $21.5$ )/ $7.0$  ( $2.3$ – $30.2$ )/ $10.5$  ( $1.8$ – $24.9$ ) ng/ml at baseline, 1, 4 and 16 weeks, respectively) or urinary ( $12.0$  ( $4.7$ – $29.5$ )/ $10.9$  ( $1.5$ – $20.5$ )/ $8.7$  ( $4.3$ – $16.9$ )/ $10.1$  ( $4.2$ – $29.8$ ) ng/mg urinary creatinine) TGF- $\beta_1$  levels. A statistically significant correlation was observed between plasma TGF- $\beta_1$  and insulin dosage (U/kg/day) ( $r = 0.52$ ,  $P = 0.037$ ).

**Conclusions** The increased TGF- $\beta_1$  production observed herein was not modulated by glycaemic reduction and could be a response to immuno-inflammatory activation present at the onset of Type 1 diabetes.

Diabet. Med. 21, 818–822 (2004)

**Keywords** transforming growth factor  $\beta_1$ , Type 1 diabetes mellitus

## Introduction

Transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) is a multifunctional cytokine, secreted by virtually all cell types, with pleiotropic actions determined by the specific cellular context in which it operates and the presence or absence of other growth factors. It may also play an important role in processes ranging from differentiation and development to the regulation of cell growth and immune response [1,2].

Due to its fibrogenic action, capable of stimulating glomerular mesangial and epithelial cells to secrete increased amounts

of matrix components, most research on TGF- $\beta_1$  in diabetes has been performed in models of human and experimental nephropathy [3–6]. In addition, the role of TGF- $\beta_1$  in modulating immune cell function [7,8] may contribute to the pathogenesis of Type 1 diabetes [9,10]. A number of different factors can increase TGF- $\beta_1$  expression, including hyperglycaemia, angiotensin II, hypoxia, advanced glycosylation end products and oxidative stress [11,12]. Acute and chronic hyperglycaemia can increase TGF- $\beta_1$  production, but clinical studies comparing TGF- $\beta_1$  and HbA<sub>1c</sub> are inconclusive [13,14]. An ideal clinical model should allow evaluation of the effect of relevant changes in the glycaemic status without the possible artefactual effects of chronic hyperglycaemia. Thus, the aims of our study were to assess TGF- $\beta_1$  levels at the clinical onset of Type 1

Correspondence to: Dr E. Esmatjes, Diabetes Unit., Hospital Clínic, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: esmatjes@clinic.ub.es



diabetes and to analyse the effect of glycaemic control on these parameters.

## Subjects and methods

We studied 14 patients with Type 1 diabetes mellitus (DM) recruited from the Diabetes Unit of an adult tertiary care centre at the clinical onset of the disease (seven males; mean age  $24.3 \pm 4.9$  years (range 16–30); body mass index  $22.3 \pm 4.2$ ). The control group included 14 healthy volunteers recruited from staff members from our hospital or their relatives with similar characteristics (six males; mean age  $27.4 \pm 3.5$  (range 20–33); body mass index  $22.6 \pm 3.5$ ) to those of the diabetic group. All the patients in both groups were non-smokers and were normotensive ( $< 130/80$  mmHg). Diagnosis of Type 1 diabetes was achieved according to the National Diabetes Data Group criteria [15]. Patients were excluded if, at diagnosis, they presented with a blood glucose  $> 16.6$  mmol/l or ketoacidosis (indicating the immediate need for insulin therapy); pregnancy, intercurrent disease, having taken angiotensin II converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor antagonists or were active smokers.

Informed consent was obtained from each participant. The experimental protocol was approved by the Ethical Committee of the Hospital Clínic.

## Study design

After diagnosis of Type 1 diabetes, the patients were hospitalized. Before initiating insulin therapy, a 24-h urine collection was performed to determine urinary creatinine, and TGF- $\beta_1$  excretion. Following an overnight fast and before starting insulin therapy, a blood sample was obtained for measurement of plasma TGF- $\beta_1$  levels, glycaemia, creatinine, HbA $_{1c}$ , total cholesterol, LDL cholesterol and triglyceride. Insulin therapy with multiple-dose insulin was then started. Measurements were repeated after 7 days, while the patient remained hospitalized, and then at 4 and 16 weeks after discharge from hospital.

One week after starting insulin and achieving clinical stabilization, a glucagon test was performed to evaluate residual  $\beta$ -cell function (stimulated C-peptide levels: 6 min after an intravenous injection of 1 mg of glucagon), and antibodies related to Type 1 DM (GAD: glutamic acid decarboxylase and IA2: tyrosine phosphatase-like protein) were also determined. All patients were visited every 4 weeks after discharge to adjust therapy to obtain fasting glycaemia between 3.9 and 7.0 mmol/l, post-prandial glycaemia  $< 10$  mmol/l and to avoid hypoglycaemic events. Clinical and biochemical parameters between control subjects and patients were compared at week 16 on stabilization of glycaemic control.

## Measurements

### TGF- $\beta_1$ plasma assay

Venous blood samples were obtained from the patients and collected in plastic tubes containing EDTA and centrifuged at 1000 g for 30 min. The plasma was isolated and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until the assays were performed. To activate latent TGF-

$\beta_1$  into immunoreactive TGF- $\beta_1$  detectable by an immunoassay test, we performed an acidification (to 0.1 ml sample add 0.1 ml 2.5 N acetic acid/10 M urea) and neutralization (adding 0.1 ml 2.7 N NaOH/1 M HEPES) procedure (pH 7.2–7.6). TGF- $\beta_1$  was determined using a solid-phase TGF- $\beta_1$ -specific sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Quantikine; R & D System, Minneapolis, MN, USA). A standard TGF- $\beta_1$  curve was constructed using 2000, 1000, 500, 250, 62.5 and 31.25 pg/ml of recombinant human TGF- $\beta_1$  protein. The minimum detectable level of TGF- $\beta_1$  with the test was 7 pg/ml. The intra-assay and interassay coefficients of variation (CV) were 6.5 and 10.3%, respectively.

### TGF- $\beta_1$ urine assay

Urine was collected over 24 h with 3 ml being stored in polypropylene tubes at  $-70^\circ\text{C}$ . Urinary TGF- $\beta_1$  was measured by the method described by Ellis *et al.* [6]. Briefly, 2 ml of urine were placed in a YM-0 Centricron device (Amicon) pre-treated with Tween-20 and centrifuged in a fixed angle rotor for 90 min at 3000 g. The retained volume containing the TGF- $\beta_1$  concentrate was diluted to 200  $\mu\text{l}$  with RD5 solvent supplied in the kit to determine TGF- $\beta_1$  (Quantikine; R & D System, Minneapolis, MN, USA) and activated with 1.0 N HCl. The overall concentration factor obtained with this method was sevenfold and recovery ranged from 85 to 98%. Subsequently, urine samples were neutralized with 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES and submitted to enzyme-linked immunosorbent assay. The intra-assay and interassay coefficients of variation determined in our laboratory were 9.8 and 16%, respectively.

### Auto-antibody measurement

GADAb were determined by radiobinding assays and were considered positive when above 2 U/ml. The assay for GAD Ab in the 2nd GAD proficiency test achieved 100% sensitivity and 100% specificity. IA2 Ab titres were measured in a radiobinding assay and considered positive when above 0.8 U/ml. The interassay and intra-assay coefficient of variation of IA2 Ab determination were 7 and 5%, respectively.

### Laboratory studies

Serum total cholesterol, HDL cholesterol, and triglyceride were assessed with standard enzymatic spectrophotometric techniques, and LDL cholesterol determined using the Friedewald equation. Fasting blood glucose was measured by a glucose oxidase method and HbA $_{1c}$  by high-performance liquid chromatography. C-peptide was determined using a radioimmunoassay (limit of detection 0.033 mmol/l; intra-assay coefficient of variation 2.6%; interassay coefficient of variation 4.4%) and a commercially available kit (Bick Santeg, Dietzenbach, Germany).

### Statistical analysis

Urinary TGF- $\beta_1$  was expressed as the ratio for urinary creatinine levels (ng/mg creatinine). The data were analysed by non-parametric methods to avoid assumptions about the distribution of the measured variables and are expressed as median and range. The Mann-Whitney *U*-test was used to compare control subjects and patients with DM. The Friedman test was used to analyse the results of plasma and urinary TGF- $\beta_1$  levels at the

Variable	Baseline	Week		
		1	4	16
Fasting glucose (mmol/l)*	11.3 ± 3.9	8.9 ± 1.5	7.1 ± 2.1	6.9 ± 1.8
HbA <sub>1c</sub> (%)*	11.5 ± 2.1	10.4 ± 1.8	6.8 ± 0.7	5.4 ± 0.6
Total cholesterol (mmol/l)	4.8 ± 1.1	4.5 ± 0.7	4.4 ± 0.9	4.7 ± 1.0
Triglycerides (mmol/l)*	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.3
HDL-cholesterol (mmol/l)*	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.3
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.0 ± 1.2	2.9 ± 0.8	2.5 ± 0.9	2.3 ± 0.7
C-peptide basal (ng/ml)	0.8 ± 0.4	—	—	0.9 ± 0.5
C-peptide stimulated (ng/ml)	1.3 ± 0.3	—	—	1.3 ± 1.0

\* $P < 0.05$  week 0 vs. week 16; HbA<sub>1c</sub>: glycosylated haemoglobin.

different times evaluated. Moreover, the association of TGF- $\beta_1$  with other biochemical parameters was assessed by the Spearman rank correlation test.

## Results

At admission, all patients were hyperglycaemic and 10 of them had ketonuria. All showed autoantibodies related to Type 1 diabetes, 83% of which were anti-GAD+ and 66% were IA2+.

In relation to control subjects, Type 1 diabetic patients presented elevated levels of TGF- $\beta_1$  in both plasma (4.7 (1.6–6.8) vs. 10.5 (1.8–24.9) ng/ml,  $P < 0.001$ ) and urine (5.7 (1.5–8.5) vs. 10.1 (4.2–29.8) pg/mg creatinine,  $P < 0.01$ ). During the study, insulin therapy improved glycaemic control, reflected by a fall in HbA<sub>1c</sub> (11.5% at week 0 and 5.4% at week 16,  $P < 0.0001$ ), as well as in lipid profile with a fall in triglycerides (1.0 (0.5–1.7) at week 0 and 0.7 (0.3–1.6) mmol/l at week 16,  $P < 0.002$ ) and an increase in HDL-cholesterol (1.0 (0.6–1.7) at week 0 and 1.3 (1.1–2.1) mmol/l at week 16,  $P < 0.01$ ) (Table 1). Over this period there was no change in either plasma or urinary TGF- $\beta_1$  levels (Fig. 1).

No correlation was found between TGF- $\beta_1$  levels and HbA<sub>1c</sub>, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides. A negative correlation was found between  $\beta$ -cell function and insulin dosage at week 16 of the study ( $r^2 = -0.61$ ,  $P = 0.03$ ). A statistically significant correlation was observed between plasma TGF- $\beta_1$  and insulin dosage (U/kg/day) ( $r = 0.52$ ,  $P = 0.037$ ) (Fig. 2).

## Discussion

There is little information concerning TGF- $\beta_1$  levels in the early clinical phases of Type 1 diabetes. This is the first study in which TGF- $\beta_1$  has been measured at diagnosis before starting insulin. Plasma and urine TGF- $\beta_1$  levels were 40% higher in those with Type 1 DM compared with non-diabetic controls. These data confirm the observation that *in vitro* production of TGF- $\beta_1$  by peripheral blood in those with Type 1 diabetes of 1 year's duration is elevated [10].

In experimental studies, both acute and chronic hyperglycaemia increase TGF- $\beta_1$  production, but clinical studies

Table 1 Follow-up of metabolic parameters in diabetic patients

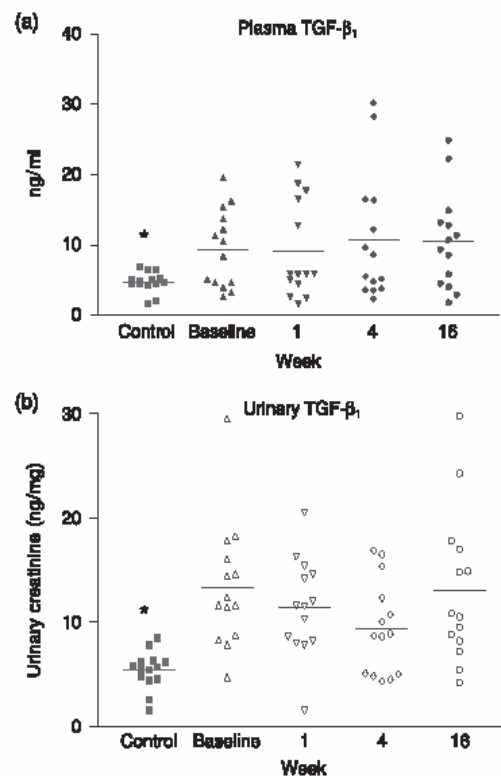


Figure 1 Plasma (a) and urinary (b) levels of TGF- $\beta_1$  in control subjects and Type 1 DM. (a) \*Control vs. Type 1 DM (week 16),  $P = 0.001$  and (b) \*control vs. Type 1 DM (week 16),  $P = 0.013$ .

comparing TGF- $\beta_1$  levels and HbA<sub>1c</sub> values [13,14] are inconsistent. This is probably because they have not considered the confounding effects of other factors, which can increase TGF- $\beta_1$  production. Our clinical model allowed us to analyse the effect of relevant changes in glycaemic status without the possible artefactual effects of chronic hyperglycaemia or the presence of diabetic complications. With this model, we

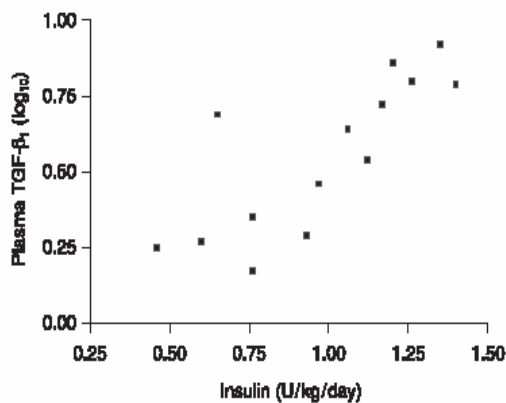


Figure 2 Correlations between plasma TGF- $\beta_1$  and insulin dosage at week 16;  $r = 0.52$ ,  $P = 0.037$ .

obtained a marked reduction in blood glucose, with a decline of 46% in HbA<sub>1c</sub> values, as well as an improvement in the lipid profile. Despite these changes, we did not find any significant variation in either plasma or urinary TGF- $\beta_1$  levels after restoring a normal blood glucose. One possible explanation could be that in this phase of Type 1 diabetes increased TGF- $\beta_1$  levels observed are associated with the activity of the autoimmune process implicated in the pathogenesis of this disease and are not due to a hyperglycaemic stimulating effect.

A potential immunosuppressive role for this cytokine is suggested by its effects inhibiting the secretion of inflammatory cytokines from macrophages, B cells and T cells, and particularly T lymphocytes bearing a Th1 phenotype (a Th2 like function) [7,8]. TGF- $\beta_1$  could therefore play a role in the pathogenesis of Type 1 diabetes antagonizing the cytotoxic effect of pro-inflammatory cytokines which initiate and maintain the autoimmune process, which might mask any glycaemic reduction in TGF- $\beta_1$  levels at diagnosis. Several studies have demonstrated that pro-inflammatory imbalance is maintained a long time after the onset of Type 1 diabetes and that this pro-inflammatory status is reversed during the evolution of the disease, probably when all the  $\beta$ -cells are lysed and ending of the inflammatory process in the pancreas [16,17]. Azar *et al.* [9] observed a late reduction in TGF- $\beta_1$  levels after 2 years of disease evolution in a group of patients with Type 1 DM. In addition, it has been reported that *in vitro* production of TGF- $\beta_1$  secretion by peripheral blood in 22 patients with Type 1 diabetes of less than 12 months is elevated. Moreover, in 24 first-degree relatives with pre-clinical Type 1 diabetes, TGF- $\beta_1$  production was higher than in controls [10].

In the present study, a positive correlation was observed between plasma TGF- $\beta_1$  levels and insulin dosage, suggesting that insulin may induce TGF- $\beta_1$  production. This hypothesis is not supported by the observation that insulin inhibits TGF- $\beta_1$  expression in glomerular and tubulointerstitial cells in streptozotocin-induced diabetes [19]. However, our data agree with studies demonstrating that insulin increases *in vitro*

production of TGF- $\beta_1$  both in human tubular and rat muscle cells, as well as the urinary excretion of TGF- $\beta_1$  in patients with Type 1 DM with different degrees of nephropathy [20,21].

In summary, the increased TGF- $\beta_1$  production observed in this study is not modulated by a reduction in glycaemia and could be a response to an immuno-inflammatory process at the onset of Type 1 diabetes. These findings suggest a possible role of TGF- $\beta_1$  in the pathogenesis of Type 1 DM and may have therapeutic relevance [22]. These results also confirm the pleiotropic nature of the actions of TGF- $\beta_1$  which, in diabetes, could be either pro-fibrotic and, consequently, related to diabetic complications, or an anti-inflammatory effector in the context of the pathogenesis of the disease. However, the relatively small number of subjects examined makes further studies necessary to confirm these findings.

## References

- 1 Blobe G, Schiemann W, Lodis H. Role of transforming growth factor  $\beta$  in human disease. *New Engl J Med* 2000; 342: 1350–1358.
- 2 Topper J. TGF- $\beta$  in the cardiovascular system: molecular mechanism of a context-specific growth. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 132–137.
- 3 Sharma K, Ziyadeh F. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case of transforming growth factor- $\beta$  as a key mediator. *Diabetes* 1995; 44: 1139–1146.
- 4 Flyvbjerg A. Putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease. *Diabetologia* 2000; 43: 1205–1223.
- 5 Chaturvedi N, Schalkwijk C, Abrahamian H, Fuller J, Stehouwer C, The EURODIAB Prospective Complications Study Group. Circulating and urinary transforming growth factor  $\beta_1$ , amadori albumin, and complications of Type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 2320–2327.
- 6 Ellis D, Forrest K, Erbey J, Orchard T. Urinary measurement of transforming growth factor- $\beta$  and Type IV collagen as new markers of renal injury: application in diabetic nephropathy. *Clin Chem* 1998; 44: 950–956.
- 7 Letterio J, Roberts A. Regulation of immune response by TGF- $\beta$ . *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137–161.
- 8 King C, Davies J, Mueller R, Lee M, Kral T, Yeung B *et al.* TGF- $\beta_1$  alters APC preference, polarising islet antigen responses toward a Th2 phenotype. *Immunity* 1998; 8: 601–613.
- 9 Azar S, Salti I, Zantout M, Major S. Alterations in plasma transforming growth factor  $\beta$  in normoalbuminuric Type 1 and Type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4680–4682.
- 10 Kretowski A, Maciej K, Ida K. The analysis of *in vitro* transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ) production by peripheral blood in overt and pre-clinical Type 1 diabetes mellitus. *Immunol Lett* 2000; 71: 85–89.
- 11 Montero A, Munger K, Khan R, Valdivielso J, Morrow J, Guasch A *et al.* F<sub>2</sub>-isoprostanes mediate high glucose-induced TGF- $\beta$  synthesis and glomerular proteinuria in experimental Type 1 diabetes. *Kidney Int* 2000; 58: 1963–72.
- 12 Kagami S, Border W, Miller D, Noble N. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- $\beta$  expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 2431–2437.
- 13 Sato Iwano M, Akai Y, Kurioka Kubo A, Yamaguchi T, Hirata E, Kanauchi M *et al.* Increased excretion of urinary transforming growth factor  $\beta_1$  in patients with diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 1998; 18: 490–494.

- 14 Korpinen E, Teppo A, Hukkanen L, Akerblom H, Gronhagen-Riska C, Vaarala O. Urinary transforming growth factor- $\beta_1$  and  $\alpha_1$ -microglobulin in children and adolescents with Type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2000; **23**: 664–668.
- 15 Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report. *Diabetes Care* 1997; **20**: 1183–1197.
- 16 Pfeiffer A, Middelberg-Bisping K, Drewes C, Schatz H. Elevated plasma levels of transforming growth factor- $\beta_1$  in NIDDM. *Diabetes Care* 1996; **19**: 1113–1117.
- 17 Netea M, Hancu N, Blok W, Grigorescu-Sido P, Popa L, Popa V et al. Interleukin 1 $\beta$ , tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 1 receptor antagonist in newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. Comparison to long-standing diabetes and healthy individuals. *Cytokine* 1997; **9**: 284–287.
- 18 Espersen G, Mathiesen O, Grunnet N, Jensen S, Ditzel J. Cytokine plasma levels and lymphocyte subsets in patients with newly diagnosed insulin-dependent (Type 1) diabetes mellitus before and following initial insulin treatment. *APMIS* 1993; **101**: 703–706.
- 19 Park I, Kiyomoto H, Abboud S, Abboud H. Expression of transforming growth factor- $\beta$  and Type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 1997; **46**: 473–480.
- 20 Morrisey K, Evans R, Wakefield L, Philips A. Translational regulation of renal proximal tubular epithelial cell transforming growth factor- $\beta_1$  generation by insulin. *Am J Pathol* 2001; **159**: 1905–15.
- 21 Hosomi N, Noma T, Ohyama H, Takahashi T, Kohno M. Vascular proliferation and transforming growth factor- $\beta$  expression in pre- and early stage of diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Atherosclerosis* 2002; **162**: 69–76.
- 22 Piccirillo C, Chang Y, Prud'homme G. TGF- $\beta_1$  somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1998; **161**: 3950–3956.

## ***Consumo de tabaco***

### **Objetivo**

Investigar en pacientes con DM1:  
el efecto del consumo de tabaco y de su cesación  
sobre el estrés oxidativo y la fibrogénesis

## 1. Justificación del objetivo

Se ha postulado que el consumo de tabaco incrementa el riesgo de desarrollar DM y, entre los pacientes con DM, existen numerosas evidencias epidemiológicas del efecto perjudicial del CT. El CT se ha asociado con el desarrollo prematuro y con una progresión acelerada de todas las complicaciones de la DM, tanto microvasculares como macrovasculares en todas sus formas. A pesar de la evidente relación epidemiológica entre el CT y la DM, su mecanismo patogénico es aún desconocido. Considerando que el efecto aterogénico del CT se ha ligado a su capacidad oxidativa, muchos estudios se han centrado en el EO como un probable factor del humo de tabaco para explicar la aparición de las complicaciones crónicas de la DM. Los RLO han sido investigados extensamente en población de fumadores no diabéticos, a través de la cuantificación de la depleción de antioxidantes, midiendo la modificación oxidativa de las proteínas, los lípidos y el DNA y estudiando los efectos del suplemento de antioxidantes en estos factores y, estudiando las modificaciones de estos factores tras el cese del CT. La literatura científica al respecto es controvertida, esto es relacionado probablemente por la utilización de métodos de medición del EO poco rigurosos, que han llevado a resultados ambiguos. Tampoco está claro si los oxidantes del humo del tabaco o los RLO, generados de la respuesta inflamatoria desencadenada por la injuria de los constituyentes del humo del tabaco, son los responsables del EO observado en los fumadores o cual es el constituyente del humo del tabaco que activa esta respuesta inflamatoria. Hoy en día, el indicador más fidedigno de la peroxidación lipídica *in vivo* son los F<sub>2</sub>-IsoPs y, entre sus isómeros, el 8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  es el más ampliamente estudiado. Su concentración está aumentada en diferentes condiciones asociadas con el incremento del EO como el envejecimiento, la hipercolesterolemia y el CT. Morrow et al en un estudio publicado en 1995, estableció que las concentraciones de IsoPs estaban aumentadas en fumadores, apoyando la hipótesis de que el CT puede causar modificación oxidativa de importantes moléculas biológicas *in vivo*. Además, también se ha demostrado que el CT activa una serie de citocinas pro-oxidantes, incluyendo un aumento de las concentraciones de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  e interleucinas 1 y 8. Se ha descrito que el extracto de humo de tabaco, induce un aumento de las moléculas de adhesión celular en las células endoteliales, a través de la activación de la PKC, una vía conocida que estimula la sobreexpresión del



TGF $\beta_1$  que, como hemos descrito previamente, es un factor de crecimiento relacionado con el desarrollo de las complicaciones crónicas de la DM, especialmente la ND, al estar implicado en la fibrogénesis.

Por todo lo dicho, hasta el momento no se conoce el efecto que el cese del CT produce sobre la producción de F2-IsoPs y sobre el TGF $\beta_1$  en pacientes con DM1. Este modelo clínico no es fácil de conseguir dado que los pacientes con DM1, generalmente jóvenes, no tienen conciencia del efecto perjudicial del CT y no son susceptibles al abandono del CT. No obstante, nos pareció que era un diseño adecuado para valorar en primer lugar la situación basal respecto a estas dos vías patogénicas y en segundo lugar si el abandono del CT era capaz de llevar el EO y la actividad fibrogénica a unos niveles similares al de la población diabética no fumadora.

*Publicaciones obtenidas de este objetivo (📖):*

**The effect of smoking and its cessation on 8-epi-PGF $2\alpha$  and transforming growth factor-beta 1 in Type 1 diabetes mellitus**

FLORES L, VIDAL M, ABIAN J, CASES A, CAMPISTOL J. MA.  
CLÀRIA J, LARIO S, ESMATJES E.  
*Diabet. Med* 2004;21:285-289

*Comunicaciones obtenidas de este objetivo (🗣️):*

- *The effect of smoking on transforming growth factor  $\beta_1$  levels and lipid peroxidation in diabetes mellitus*

FLORES L, LARIO S, CAMPISTOL JM, CASES A, CLÀRIA J, IÑIGO P, ESMATJES E.  
*35<sup>th</sup> Annual Meeting of the EASD*  
*Brussels, 28 Set.-2 Oct. de 1999*  
*Comunicación publicada en Diabetología 1999;42, Suppl 1:A 1212,320*

- *Cessation smoking decrease transforming growth factor  $\beta_1$  plasma and urinary levels in patients with type 1 diabetes mellitus*

ESMATJES E, NÄF S, VIDAL M, FLORES L.  
*37<sup>th</sup> Annual Meeting of the EASD*  
*Glasgows, 9-13 Sept. de 2001*  
*Comunicación publicada en Diabetología 2001;44, Suppl 1: A 1188,310*

## 2. Metodología general

Este estudio comprende dos partes, un estudio transversal y un estudio prospectivo en el que se estudia el efecto del cese del CT sobre el EO y la fibrogénesis. Los instrumentos que se utilizaron para el desarrollo de este objetivo fueron: 1) determinación en sangre venosa tras ayuno de por lo menos 10 horas de la glucemia, HBA<sub>1c</sub>, perfil lipídico, y TGFβ<sub>1</sub>. 2) determinación de la EUA, creatinina, la excreción del TGFβ<sub>1</sub> y del 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en orina de 24 horas, y 3) una muestra de orina fresca para la determinación de las concentraciones de cotinina que nos permitía además valorar el cumplimiento. A los pacientes que participaron en el estudio del cese del CT y que dejaron de fumar se les evaluó en tres ocasiones más, todos los parámetros metabólicos y urinarios descritos anteriormente, en la semana 1, 4 y 12 tras el cese del CT. La medición de los parámetros metabólicos y de las concentraciones de TGFβ<sub>1</sub> y del 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, se realizó como se ha descrito en el objetivo anterior.

### Cotinina Urinaria

La cotinina es el principal metabolito de la nicotina, procede del metabolismo oxidativo de la nicotina, lo que la convierte en el marcador más específico del humo del tabaco. Su determinación en el plasma presenta una elevada sensibilidad y especificidad, pudiendo ser evaluada igualmente en orina y en saliva, por lo que se considera es el marcador epidemiológico más recomendable. Su vida media es de aproximadamente 15-40 horas, su eliminación se realiza a través de la orina, la máxima concentración aparece alrededor de 2 horas después de la última calada y su aclaramiento es lento, existiendo aún cifras detectables en orina después de 4 días de la exposición. La sensibilidad y especificidad de la determinación de cotinina para distinguir fumadores de no fumadores son altas. En los no fumadores los valores se encuentran por debajo de 10 ng/ml o no son detectables. En los fumadores de bajo consumo de cigarrillos, los niveles se sitúan entre 40-50 ng/ml y en los fumadores graves entre 200-400 ng/ml.

### Programa de deshabitación de consumo de tabaco

El programa de deshabitación del CT fue realizado por nuestro grupo investigador, con ayuda de una enfermera entrenada para aconsejar en el proceso de deshabitación del tabaco. El programa fue elaborado para realizar una intervención sistematizada para obtener el cese de este hábito. A los pacientes

fumadores que participaron en la fase transversal de este estudio se les realizó una encuesta, que nos permitía saber la etapa dentro del proceso de deshabituación en la que encontraba el paciente fumador: 1) consonante, que está de acuerdo con su conducta de fumador y no se plantea de momento el cambio (fase de precontemplación), 2) pensando en dejar de fumar (contemplación) o 3) decidiendo intentarlo (preparación). A los pacientes que se encontraban en la primera fase se les proporcionó información de las consecuencias nocivas del tabaco para la salud, así como de los beneficios de dejar de fumar y de la posibilidad de solicitar ayuda profesional en el caso de que quisiera intentar el abandono de este hábito. A los pacientes que estaban en la fase de contemplación y preparación se les realizó un test de Fagerström, que nos informó de la dependencia a la nicotina y por lo tanto de la necesidad de terapia sustitutiva de la nicotina (TSN). Posteriormente, se les facilitó folletos informativos sobre cómo dejar de fumar, se les pidió que fijaran una fecha para dejar de fumar y se les explicaron los métodos seguros y eficaces para ayudarlos a dejar de fumar (terapia farmacológica). Se ofreció TSN a todos los pacientes con un test de Fagerström > 5. Se recomendó para los días previos al día escogido (día D) cambios en sus hábitos de fumador (fumar menos, que piense cada vez que encienda un cigarrillo si verdaderamente le apetece fumar, no llevar encendedor, etc...), se les informó de los síntomas del síndrome de abstinencia para que, conociéndolos, les fuera más fácil actuar, además se les ofrecieron consejos útiles para que, en caso de que se presentaran estos síntomas fueran más llevaderos. Se programó un seguimiento, que comenzó el día previo al día D con una llamada telefónica de recordatorio y una visita a la semana de dejar de fumar. Posteriormente, el seguimiento fue alternando llamadas telefónicas y visitas clínicas hasta completar el estudio. En cada visita clínica se reforzó la conducta abstinenta, la dieta, se identificaron los problemas surgidos y las situaciones de riesgo que pueden inducir a fumar y finalmente se daban consejos sobre la mejor manera de evitar estas situaciones.

#### Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media  $\pm$  DS. Debido a que el TGF $\beta$ 1 y la EUA no tenían una distribución normal, se realizó una transformación logarítmica de estos parámetros para el análisis de correlación y de regresión. La comparación entre los grupos fue realizada utilizando el método de Kruskal-Wallis. Se realizó, un análisis de medidas repetidas para comparar los resultados obtenidos en el grupo de intervención. El análisis de regresión paso a paso se

realizó para evaluar posibles variables de confusión que puedan influenciar en la excreción urinaria de 8-epi-PGF<sub>2α</sub> y las concentraciones plasmáticas y urinaria de TGFβ<sub>1</sub> ( HBA<sub>1c</sub>, PA sistólica, diastólica, colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos). La correlación de Spearman se utilizó para determinar la relación entre las variables. Un valor P<0.05 se consideró significativo.

### **3.Desarrollo del objetivo**

#### Sujetos y métodos

Los criterios de inclusión en el estudio transversal fueron: pacientes entre 18-45 años, con diagnóstico de DM1 (definidos de acuerdo a los criterios diagnósticos de la Asociación Americana de DM), fumadores o no, con más de 5 años de evolución de la enfermedad, normotensos, con función renal normal y EUA dentro de los límites de la normalidad. Los criterios de exclusión fueron tratamiento con IECAS, ARA II, complejos multivitamínicos o aspirina. Estos pacientes fueron reclutados consecutivamente cuando acudían a las consultas externas del Servicio de Endocrinología para el control de su DM1. Se estudio además un grupo control, no fumador, apareado para edad. Los resultados obtenidos fueron comparados entre pacientes con DM1 fumadores y no fumadores y los no fumadores fueron además comparados con el grupo control.

Para el estudio del cese del CT, se seleccionó del estudio transversal a los fumadores graves (CT > 15 cigarrillos/día durante más de 5 años). Los pacientes que cumplían los criterios de inclusión iniciaron el programa de deshabituación del CT y a los que dejaron de fumar se les realizó una nueva determinación en sangre y en orina recogida durante 24 horas de todos los parámetros mencionados anteriormente, en la semana 1, semana 4 y en la semana 12 de dejar de fumar. En cada visita, se reforzó la conducta abstinentes, la dieta y se registró el peso. Además, para monitorizar el cumplimiento, se solicitaba durante la visita clínica una muestra de orina fresca para la medición de la concentración de la cotinina urinaria.

## 4. Resultados



doi: 10.1111/j.1464-5491.2004.01133.x

# The effects of smoking and its cessation on 8-epi-PGF2 $\alpha$ and transforming growth factor-beta 1 in Type 1 diabetes mellitus

L. Flores, M. Vidal, J. Abian\*, A. Casest, J. Ma. Campistol‡, J. Clària§, S. Lario¶ and E. Esmatjes

Diabetes Unit, \*Structural and Biological Mass Spectrometry Unit, †BB-CSC, ‡Dialysis Unit, §Renal Transplant Unit, ¶DNA Unit and ¶Hormonal Laboratory, Hospital Clinic, IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer), University of Barcelona, Barcelona, Spain

Accepted 23 June 2003

### Abstract

**Background** Oxidative stress and transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) are associated with diabetic complications, and smoking is a risk factor.

**Aims** This study aimed (i) to compare urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$  and plasma and urinary TGF- $\beta$ 1 levels obtained in heavy smokers with Type 1 diabetes with those observed in age-matched non-smoker patients with Type 1 diabetes and controls, and (ii) to investigate the effects of smoking cessation (SC) on the above-mentioned parameters in patients with Type 1 diabetes.

**Methods and results** Compared with control subjects ( $n = 12$ ), non-smoker diabetic patients ( $n = 12$ ) presented higher values of urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$  ( $74.2 \pm 29.6$  vs.  $29.6 \pm 11.1$  pg/mg urinary creatinine,  $P = 0.01$ ), plasma TGF- $\beta$ 1 ( $7.7 \pm 4.7$  vs.  $3.6 \pm 1.7$  ng/ml,  $P = 0.001$ ) and urinary TGF- $\beta$ 1 ( $15.3 \pm 6.3$  vs.  $8.1 \pm 4.4$  ng/mg urinary creatinine,  $P = 0.02$ ). Compared with non-smoker diabetic patients, smoker diabetic patients ( $n = 16$ ) showed higher levels of urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$  ( $107.8 \pm 40.2$  vs.  $74.2 \pm 29.6$  pg/mg urinary creatinine,  $P = 0.0001$ ), plasma TGF- $\beta$ 1 ( $12.6 \pm 4.9$  vs.  $7.7 \pm 4.7$  ng/ml,  $P = 0.001$ ) and urinary TGF- $\beta$ 1 ( $27.5 \pm 16.0$  vs.  $15.3 \pm 6.3$  ng/mg urinary creatinine,  $P = 0.01$ ). Smoker patients were included in a smoking cessation programme. In the 10 patients that gave up smoking there was a reduction of urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$  (basal:  $110.47 \pm 47.0$  vs. week 12:  $73.2 \pm 25.6$ ;  $P < 0.001$ ), plasma TGF- $\beta$ 1 (basal:  $11.2 \pm 5.9$  vs. week 12:  $4.89 \pm 2.25$ ;  $P < 0.01$ ) and urinary TGF- $\beta$ 1 (basal:  $18.12 \pm 9.27$  vs. week 12:  $10.32 \pm 2.0$ ;  $P < 0.01$ ) levels.

**Conclusions** In patients with Type 1 diabetes, smoking increased oxidative stress, evaluated by lipid peroxidation, and TGF- $\beta$ 1 production. Smoking cessation decreased these parameters, providing additional support to encourage diabetic patients to give up smoking.

Diabet. Med. 21, 285–289 (2004)

**Keywords** tobacco, diabetes mellitus, transforming growth factor beta 1, isoprostanes

### Introduction

The association between cigarette smoking and the atherosclerotic process is well established, with tobacco consumption a risk factor for premature or accelerated vascular disease

[1,2]. Patients with diabetes mellitus (DM) exhibit high morbidity and mortality due to cardiovascular disease and several studies have suggested that cigarette smoking in patients with DM confers a higher cardiovascular risk than in those without [3,4]. Other studies have demonstrated an association between cigarette smoking, diabetes and the poor prognosis of cardiovascular and renal disease [5,6].

An important pathogenic mechanism in cigarette smokers is oxidative stress. Cigarette smoke results in the formation of

Correspondence to: Dr E. Esmatjes, Endocrinology and Diabetes Department, Hospital Clinic, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: esmatjes@clinic.ub.es

pro-atherogenic oxidated particles, specifically oxidized LDL, facilitates DNA adduct formation and may directly induce platelet activation and endothelial dysfunction [7–10]. Furthermore, overproduction of radical oxygen species (ROS) and a reduction in anti-oxidant mechanisms have been reported in diabetes [11–13]. ROS may be involved in renal endothelial dysfunction [14], and attention has recently been focused on F<sub>2</sub>-isoprostanes, which are stable products of free radical-catalysed lipid peroxidation of arachidonic acid [15,16]. Using F<sub>2</sub>-isoprostane measurement (currently considered the most reliable marker of oxidative stress *in vivo* [15,16]), Morrow *et al.* [9] reported increased levels in heavy smokers, and found that smoking cessation decreased F<sub>2</sub>-isoprostane values. Later studies have also shown a decrease in 8-epi-PGF2 $\alpha$ , an abundant F<sub>2</sub>-isoprostane, after smoking cessation in non-diabetic subjects [10,17].

Transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) is the main fibrogenetic cytokine, overproduced in diabetes and one of the factors implicated in the pathogenesis of diabetic nephropathy [18,19]. Different factors, injurious to the kidney, can increase TGF- $\beta$ 1 expression [19–22]. Cigarette smoke condensate induces cell adhesion molecules in human endothelial cells, through protein kinase C activation, an intracellular pathway involved in the up-regulation of the TGF- $\beta$ 1 system [23]. We have previously observed that TGF- $\beta$ 1 levels are increased in smokers with Type 1 DM when compared with non-smoking subjects with Type 1 DM [24].

The aims of the present study were: (i) to compare urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$  and plasma and urinary TGF- $\beta$ 1 levels in heavy smoker Type 1 DM patients with those observed in age-matched non-smoker DM patients and controls, and (ii) to investigate the effects of smoking cessation on these measurements in patients with Type 1 DM.

## Patients and methods

### Inclusion criteria

Patients were recruited from the Endocrinology Out-patient Clinic. We recruited current heavy smokers from 18 to 45 years in age with a diagnosis of Type 1 diabetes (as defined in accordance with the criteria of the American Diabetes Association [25]) of at least 5 years of evolution, and normal blood pressure (< 130/80 mmHg), normal renal function (creatinine: females < 100  $\mu$ mol/l; males < 116  $\mu$ mol/l), normal urinary albumin excretion (< 20  $\mu$ g/min), not taking either angiotensin II converting enzyme inhibitor or angiotensin receptor antagonist drugs, multivitamin supplements or aspirin. Heavy smokers were defined as patients that consumed > 15 cigarettes/day for at least 5 years. Healthy non-smoker controls matched for age were also studied.

### Study design

#### Cross-sectional study

A 24-h urine collection was carried out in all subjects to determine urinary albumin (UAE), creatinine, 8-epi-PGF2 $\alpha$  and

TGF- $\beta$ 1 excretion. Immediately after overnight fasting and abstinence from smoking, blood samples were obtained to measure TGF- $\beta$ 1, glycaemia, creatinine, HbA<sub>1c</sub>, total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol. Spot urine was used to determine cotinine (urinary metabolite of nicotine) levels. Medical history and physical examination included height, weight, body mass index and blood pressure. We compared the results obtained between non-smoker DM patients, smoker DM patients and control subjects.

#### Smoking cessation study

Each smoker with diabetes in the cross-sectional study was invited to participate in a smoking cessation programme. This was delivered by an endocrinologist and a diabetes education nurse trained in counselling methods. Nicotine dependence was evaluated with the Fagerström test [26]. A cessation date was agreed upon and transdermal nicotine replacement therapy (NRT) was offered to all patients with Fagerström test scores > 5. The follow-up of the patient throughout the study was carried out weekly, from the day agreed for smoking cessation, alternating telephone calls and clinical visits until completion of the study. On each visit abstinent behaviour and dietary advice were strongly reinforced, body weight was registered and urinary cotinine determination was measured in spot urine during the visit to monitor compliance.

The initial physical examination, in addition to plasma and urine determinations, was repeated after 1, 4 and 12 weeks in the smoking cessation study. Smoking cessation was confirmed when the level of urinary cotinine was < 50 ng/ml.

The study protocol was approved by the Ethical Committee of our hospital and informed consent was obtained from all the patients.

### Subjects

In the cross-sectional study, 16 smoker and 12 non-smoker Type 1 DM patients and 12 non-DM control subjects were studied. In the smoking cessation study 45 smoker Type 1 DM patients agreed to participate. Smoking cessation was achieved for 1 week by the 16 patients included in the cross-sectional study. Eleven out of these 16 patients maintained smoking cessation for 4 weeks and 10 achieved smoking cessation for 12 weeks.

### Measurements

#### TGF- $\beta$ 1 immunoassays

Venous blood samples were collected in EDTA-K3 tubes and plasma stored at -70 °C until use. Samples were activated and immunoreactive TGF- $\beta$ 1 was determined using a solid-phase TGF- $\beta$ 1-specific immunoassay (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The intra-assay and interassay coefficients of variation (CV) were 6.5% and 10.3%, respectively.

TGF- $\beta$ 1 was also measured in samples taken from 24-h urine collection as described by Ellis *et al.* [27]. Urine (2 ml) was centrifuged in a YM-0 Centricron device (Amicon; Millipore Billerica, MA, USA) and the concentrate submitted to TGF- $\beta$ 1 immunoassay. Results were expressed as ng TGF- $\beta$ 1/mg urinary creatinine. The intra-assay and interassay CVs were 9.8% and 16%, respectively.

### F<sub>2</sub>-isoprostanes

Urine samples (2 ml) were centrifuged and spiked with 1.34 ng of the internal standard 8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -d<sub>4</sub> (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). The sample was left to equilibrate and 0.5 ml of 15% potassium hydroxide was added. After 30 min of equilibration, the sample was adjusted to pH 3 with 3 M hydrochloric acid and centrifuged (5 min at 600 g). Prostaglandins in the supernatants were absorbed in a 100-mg LMS polymer cartridge (Varian, Harbor City, CA, USA). After washing, the isoprostane was eluted with 1 ml ethanol.

This extract was further purified using a 8-isoprostane affinity column as indicated by the supplier (Cayman Chemical). The resulting extract was evaporated and redissolved in 100  $\mu$ l 0.5% ammonium acetate pH 6.5 (AMAC). Extracts were analysed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using a 50  $\times$  1 mm Symmetry column (3.5  $\mu$ m particles; Waters, Barcelona, Spain) and a Finnigan TSQ700 triple quadrupole MS provided with an electrospray source (Thermoquest, Barcelona, Spain). A 0.02% AMAC/methanol/acetonitrile solvent gradient was used for isoprostane separation. The flow rate was 50  $\mu$ l/min. The (M-H)<sup>-</sup> ions from the 8-isoprostane F<sub>2</sub> $\alpha$  (352.7) and its internal standard (356.7) were selected for fragmentation (collision energy 28 eV, collision pressure 2.1 mTorr). The corresponding product ions at m/z 192.5 and 196.5, respectively, were used for quantification. A urine pool from a healthy volunteer was used to prepare the standard samples for the calibration curves and the quality control samples. The intra- and interassay coefficients of variation of the assay at the 100 pg/ml level were 7% and 16%, respectively.

### Laboratory studies

Serum total cholesterol, HDL-cholesterol, and triglyceride levels were assessed with standard enzymatic spectrophotometric techniques, LDL-cholesterol was determined using the Friedewald equation. Fasting blood glucose was measured with the glucose oxidase method and HbA<sub>1c</sub> was measured

by high-performance liquid chromatography. Cotinine was quantified by radioimmunoassay using a commercial kit (Pharmacia, Freiburg, Germany).

### Statistical analysis

All data are expressed as mean  $\pm$  SD. Comparisons between groups were performed using the Kruskal-Wallis method. An analysis of variance of repeated measurements was carried out to compare the results obtained in the intervention group. Since TGF- $\beta$ 1 and UAE did not have a normal distribution, they were logarithmically transformed for the correlation and regression analyses. Stepwise regression analysis was carried out to check for confounding variables (HbA<sub>1c</sub>, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides) that may have influenced urinary excretion 8-epi-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 or plasma TGF- $\beta$ 1. Spearman's correlation was used to determine the relationship between variables. Statistical analyses were carried out using SPSS 10.1 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered statistically significant if the *P*-value was  $\leq$  0.05.

### Results

The clinical characteristics of patients and controls studied in the cross-sectional study are shown in Table 1. Non-smoker patients with diabetes, compared with controls, had higher values of urinary 8-epi-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (74.2  $\pm$  29.6 vs. 29.6  $\pm$  11.1 pg/mg urinary creatinine; *P* = 0.01), plasma TGF- $\beta$ 1 (7.7  $\pm$  4.7 vs. 3.6  $\pm$  1.7 ng/ml; *P* = 0.001) and urinary TGF- $\beta$ 1 (15.3  $\pm$  6.3 vs. 8.1  $\pm$  4.4 ng/mg urinary creatinine; *P* = 0.02). Moreover, compared with non-smokers, smokers with diabetes showed higher levels of urinary 8-epi-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (107.8  $\pm$  40.2 vs. 74.2  $\pm$  29.6 pg/mg urinary creatinine; *P* = 0.0001), plasma TGF- $\beta$ 1 (12.6  $\pm$  4.9 vs. 7.7  $\pm$  4.7 ng/ml; *P* = 0.001) and urinary TGF- $\beta$ 1 (27.5  $\pm$  16.0 vs. 15.3  $\pm$  6.3 ng/mg urinary creatinine;

Table 1 Clinical and laboratory data of the participants in the cross-sectional study

	Diabetic patients		
	Control 12	Non-smoker 12	Smoker 16
<i>n</i>			
Male (%)	50	60	40
Age (years)	34.4 $\pm$ 5.9	35.0 $\pm$ 7.6	30.4 $\pm$ 4.5
Evolution of disease (years)	—	13.8 $\pm$ 3.6	13.0 $\pm$ 6.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.6 $\pm$ 1.8	23.8 $\pm$ 2.4	24.8 $\pm$ 2.3
HbA <sub>1c</sub> (%)	—	7.6 $\pm$ 0.8	8.0 $\pm$ 1.5
Blood glucose (mmol/l)	4.9 $\pm$ 0.4*	11.5 $\pm$ 3.8	10.0 $\pm$ 4.0
Total cholesterol (mmol/l)	4.7 $\pm$ 0.6	4.6 $\pm$ 0.9	4.9 $\pm$ 0.8
Triglycerides (mmol/l)	1.0 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.5
Systolic/diastolic BP (mmHg)	124/76	126/76	125/78
Cotinine (ng/ml)	0.3 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.5	1473 $\pm$ 528
UAE ( $\mu$ g/min)	—	6.0 $\pm$ 5.8	5.1 $\pm$ 7.3
Quit smoking ( <i>n</i> )			10

BMI, Body mass index; HbA<sub>1c</sub>, glycosylated haemoglobin; BP, blood pressure, UAE, urinary albumin excretion.

\* *P* < 0.05 control vs. diabetic patients.

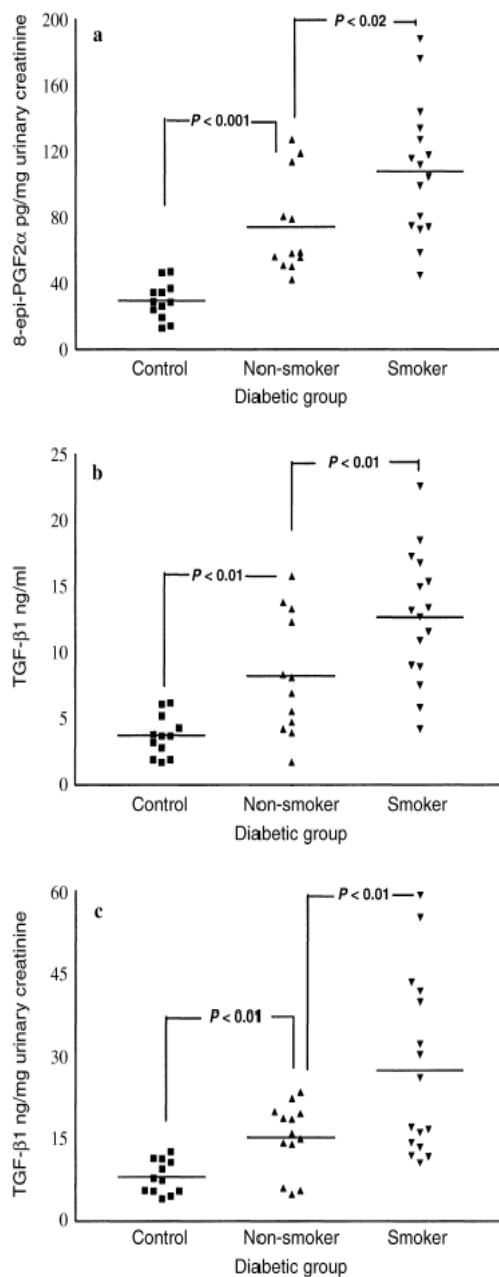


Figure 1 Urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$  (a), plasma transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) (b) and urinary TGF- $\beta$ 1 (c) levels observed in control subjects and non-smoker and smoker diabetic patients.

$P = 0.01$ ) (Fig. 1). In multiple regression analysis none of the variables showed an independent association with regard to either urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 or plasma TGF- $\beta$ 1 levels.

In the 10 that quit smoking, urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$  decreased progressively after smoking cessation, reaching a 36% reduction at week 12 in relation to baseline values ( $110.47 \pm 47.0$  vs.  $73.2 \pm 25.6$  pg/mg urinary creatinine;  $P < 0.001$ ). Likewise, plasma and urinary TGF- $\beta$ 1 levels showed a decrease after

1, 4 and 12 weeks of abstinence (12 weeks, plasma:  $11.2 \pm 5.9$  vs.  $4.89 \pm 2.25$  ng/ml,  $P < 0.01$ ; urinary  $18.12 \pm 9.27$  vs.  $10.32 \pm 2.0$  ng/mg urinary creatinine,  $P < 0.01$ ).

Mean urinary cotinine levels were  $1473 \pm 528$  ng/ml at baseline and fell to values  $< 50$  ng/ml at 1 week of abstinence, remaining at these levels throughout the study. A positive basal correlation was observed between urinary values of 8-epi-PGF2 $\alpha$  excretion and cotinine levels ( $r = 0.38$ ;  $P = 0.032$ ); however, there was no relationship between the number of cigarettes smoked and urinary cotinine, urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and plasma TGF- $\beta$ 1 levels. There were no variations in HbA $_{1c}$ , creatinine, cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol compared with values before intervention. There was a slight non-significant statistical increase in body weight (1.5 kg) in those who stopped smoking.

## Discussion

This is the first study comparing 8-epi-PGF2 $\alpha$ , as a lipid peroxidation marker, and TGF- $\beta$ 1 as indicative of fibrogenesis, among smokers and non-smokers with Type 1 diabetes, and the effect of smoking cessation. Our data show that those with diabetes have higher values of urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$  and plasma and urinary TGF- $\beta$ 1 levels compared with controls. Among patients with Type 1 DM, smokers exhibited higher levels compared with non-smokers. Smoking cessation produced a reduction in 8-epi-PGF2 $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 at levels comparable to those observed in non-smokers with diabetes.

Cigarette smoking produces oxidative stress [7–10] and increased F $_2$ -isoprostane levels have been described in smokers [9,10,17]. Enhanced 8-epi-PGF2 $\alpha$  production has also been demonstrated in diabetic populations [28,29]. We have confirmed these data and have observed that smokers with diabetes have higher levels of 8-epi-PGF2 $\alpha$  than non-smokers. One way to evaluate the effect of tobacco consumption on lipid peroxidation is to study the consequences of smoking cessation. Few studies have analysed the effect of smoking cessation on F $_2$ -isoprostanes, which are among the best markers of oxidative injury *in vivo*. Morrow *et al.* [9] observed a 30% reduction of plasma F $_2$ -isoprostanes. In other studies, urinary and plasma 8-epi-PGF2 $\alpha$  were evaluated after 3 weeks of smoking cessation [10,17]. Hyperglycaemia is also known to produce oxidative stress, and smoking cessation in patients with diabetes could be different from that observed in a non-diabetic population. We observed a 36% reduction in urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$  levels, a similar percentage reduction to that observed in non-diabetic smokers after stopping [9,10,17], with similar values to those observed in non-smokers with diabetes. This suggests that smoking cessation benefits lipid peroxidation in those with diabetes as well as reducing the pathogenic mechanisms of macro- and microvascular diabetic complications.

We have previously demonstrated that TGF- $\beta$ 1 plasma levels are higher in smokers with diabetes than in non-smokers [24], suggesting that tobacco stimulates TGF- $\beta$ 1 production. This has been confirmed in the present study in which both



plasma and 24-h urinary TGF- $\beta$ 1 levels were significantly higher in smokers. There is little information concerning the effect of smoking cessation on TGF- $\beta$ 1 production. The reduction we observed supports the concept that smoking contributes to overproduction of TGF- $\beta$ 1.

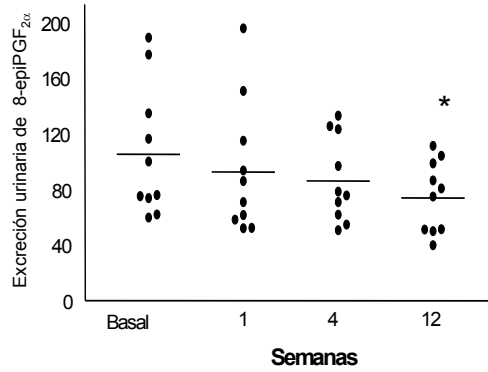
The possible link between the reduction observed in both 8-epi-PGF2 $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 levels after smoking cessation deserves further investigation. Incubation of mesangial and glomerular endothelial cells of streptozotocin-induced rats with DM with F<sub>2</sub>-isoprostanes stimulates TGF- $\beta$ 1 production [21]. In human mesangial cells hydrogen peroxide, an inducer of lipid peroxidation, increases TGF- $\beta$ 1 synthesis as well as extracellular matrix gene expression. Isoprostanes increase diacylglycerol in endothelial cells, which, in turn, could activate protein kinase C, a well-known pathway of TGF- $\beta$ 1 synthesis [22]. Smoking inducing OS may not only enhance lipid peroxidation, but also activates other pathogenic factors such as TGF- $\beta$ . However, we did not find a relationship between levels of F<sub>2</sub>-isoprostane and TGF- $\beta$ 1. Smoking may also increase advanced glycosylated end product production, another potent stimulus of TGF- $\beta$ 1 production [30,31].

Further studies are required to confirm our findings. Nonetheless, our data indicate that a relatively rapid reduction in the activity of two important pathogenic mechanisms related to the development of diabetes complications occurs in those who stop smoking. Our findings provide further support to encourage patients to avoid cigarettes.

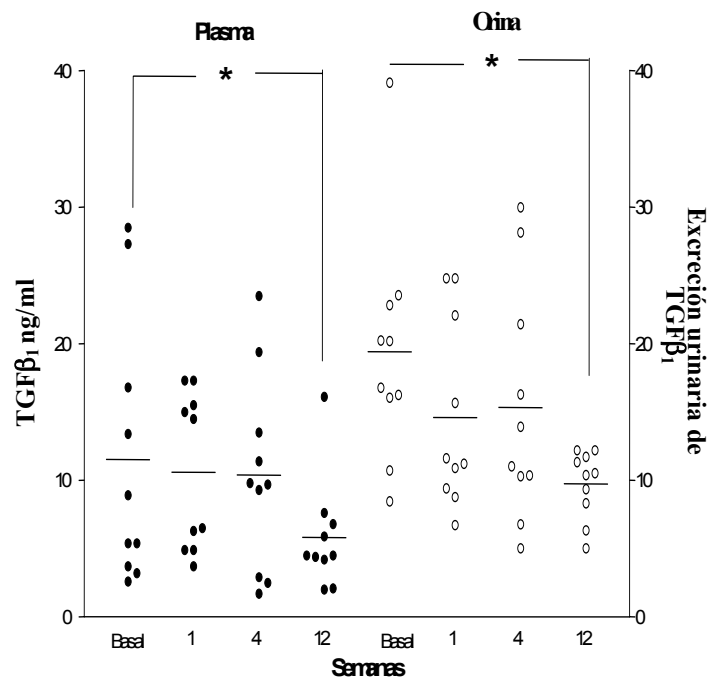
## References

- Peto R, Lopez A, Boreham J, Thun M, Heath C, Doll R. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimates from national vital statistics. *Lancet* 1992; 339: 1268–1278.
- Scott L, Warram J, Hanna L, Laffel L, Ryan L, Krolewski A. A nonlinear effect of hyperglycemia and current cigarette smoking are major determinants of the onset of microalbuminuria in Type 1 diabetes. *Diabetes* 2001; 50: 2842–2849.
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton J, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993; 16: 434–444.
- Moy C, Laporte R, Dorman J. Insulin dependent diabetes mellitus mortality: the risk of cigarette smoking. *Circulation* 1990; 82: 37–43.
- Sawicki P, Didjurgeit U, Mühlhauser I, Bender R, Heinemann L, Berger M. Smoking is associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1994; 17: 126–131.
- Forsblom C, Groop P, Ekstrand A, Totterman K, Sane T, Salorenta C *et al*. Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM. *Diabetes Care* 1998; 21: 1932–1938.
- Church D, Pryor W. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 96: 111–126.
- Frei B, Forte T, Ames B, Cross C. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. *Biochem J* 1991; 227: 133–138.
- Morrow J, Frei B, Atkinson W, Longmire A, Gaziano J, Lynch S *et al*. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F<sub>2</sub> isoprostanes) in smokers. *NEJM* 1995; 332: 1198–1203.
- Reilly M, Delanty N, Lawson J, FitzGerald G. Modulation of oxidant stress *in vivo* in chronic cigarette smokers. *Circulation* 1996; 94: 19–25.
- Baynes J, Thorpe S. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes* 1999; 48: 1–9.
- Giuliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257–267.
- Santini S, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana G *et al*. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997; 46: 1853–1858.
- Klahr S. Oxygen radicals and renal diseases. *Miner Electrolyte Metab* 1997; 23: 140–143.
- Roberts LJ, Morrow J. Measurement of F<sub>2</sub>-isoprostanes as an index of oxidative stress *in vivo*. *Free Rad Biol Med* 2000; 28: 505–513.
- Praticò D. F<sub>2</sub>-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation *in vivo*. *Atherosclerosis* 1999; 147: 1–10.
- Pilz H, Oguogho A, Chehne F, Lupattelli G, Palumbo B, Sinzinger H. Quitting cigarette smoking results in a fast improvement of *in vivo* oxidation injury (determined via plasma, serum and urinary isoprostane). *Thrombosis Res* 2000; 99: 209–221.
- Sharma K, Ziyadeh F, Alzahabi B, McGowan T, Kappor S, Kurnik B *et al*. Increased renal production of transforming growth factor TGF- $\beta$ 1 in patients with Type II diabetes. *Diabetes* 1997; 46: 84–89.
- Hoffman B, Sharma K, Ziyadeh F. Potential role of TGF  $\beta$ 1 in diabetic nephropathy. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24: 190–196.
- Sharma K, Ziyadeh F. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor- $\beta$  as a key mediator. *Diabetes* 1995; 44: 1139–1146.
- Montero A, Munger K, Khan R, Valdivielso J, Morrow J, Guasch A *et al*. F<sub>2</sub> isoprostanes mediate high glucose-induced TGF- $\beta$  synthesis and glomerular proteinuria in experimental Type 1 diabetes. *Kidney Int* 2000; 58: 1963–1972.
- Iglesias-de la Cruz M, Ruiz-Torres P, Alcami J, Diez-Marquez L, Ortega-Velasquez R, Chen S *et al*. Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF- $\beta$  in human mesangial cells. *Kidney Int* 2001; 59: 87–95.
- Shen Y, Rattan V, Sultana CH, Kalra V. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and trans-endothelial migration of monocytes. *Am J Physiol* 1996; 270: H1624–H1633.
- Esmatjes E, Flores L, Lario S, Clària J, Cases A, Iñigo P *et al*. Smoking increases serum levels of transforming growth factor- $\beta$  in diabetic patients. *Diabetes Care* 1999; 22: 1915–1916.
- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183–1197.
- Heatherton T, Kozlowski L, Frecker R, Fagerstrom K. The Fagerström test for nicotine dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *Br J Addict* 1991; 86: 1119–1127.
- Ellis D, Forrest K, Erbey J, Orchard T. Urinary measurement of TGF- $\beta$  and type IV collagen as new markers of renal injury: application in diabetic nephropathy. *Clin Chem* 1998; 44: 950–956.
- Gopaul N, Anggard E, Mallet A, Betteridge D, Wolff S, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF2 $\alpha$  levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1995; 368: 225–229.
- Davì G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santaronè S *et al*. *In vivo* formation of 8-iso-prostaglandin PGF2 $\alpha$  and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control. *Circulation* 1999; 99: 224–229.
- Cerami C, Found H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S *et al*. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13915–13920.
- Nicholl ID, Bucala R. Advanced glycation end-products and cigarette smoking. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)*, 1998; 44: 1025–1033.

En las siguientes figuras se presenta la evolución de la excreción urinaria de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> y de los niveles plasmáticos y urinarios de TGFβ<sub>1</sub> en los pacientes que dejaron de fumar.



**Figura 17:** Evolución de la excreción urinaria de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> Basal frente semana 12  $P < 0.001$



**Figura 18:** Evolución de las concentraciones de TGFβ<sub>1</sub> en plasma y orina de 24 horas. Basal frente semana 12  $P < 0.05$

## **Discusión**

Las complicaciones de la DM son el resultado de la interacción de múltiples factores patogénicos y la causa de una importante morbilidad y mortalidad en un segmento amplio de nuestra población. La base de esta tesis ha sido estudiar el efecto de dos noxas, la hiperglucemia y el consumo de tabaco, sobre las concentraciones de F2-IsoPs, como expresión de estrés oxidativo y de el TGF $\beta_1$ , como marcador de fibrogénesis, que son dos vías metabólicas estrechamente asociadas al desarrollo de las complicaciones crónicas de la DM. Durante el diseño de esta tesis, la información que existía respecto a la modulación de ambas vías patogénicas era escasa y se centraba en fases avanzadas de la enfermedad. Valorar el estrés oxidativo y la fibrogénesis al inicio de la DM nos permitía analizar de forma específica el papel de la hiperglucemia, pero también nos posibilitaba describir su actividad en una fase de la enfermedad hasta ahora no estudiada. El consumo de tabaco es otro factor de riesgo definido para el desarrollo de las complicaciones crónicas de la DM de creciente interés clínico y del cual no existe información en pacientes con DM respecto a su posible efecto sobre los factores analizados en este trabajo.

En los últimos años, los datos obtenidos fundamentalmente de estudios experimentales, han otorgado al estrés oxidativo un papel patogénico en el desarrollo de las complicaciones de la DM. En este sentido, la descripción de los F2-IsoPs como bio-marcadores fidedignos de estrés oxidativo *in vivo* han contribuido a ampliar los conocimientos existentes en esta área. Sin embargo, al plantearse esta tesis no existía información respecto a la fases de la historia natural de la DM en que comienza a ser relevante el estrés oxidativo. La detección de un aumento del estrés oxidativo coincidente en el tiempo con la existencia de complicaciones crónicas es consistente con un papel de los radicales libres de oxígeno en la injuria, pero no establece una relación causa-efecto. Para determinar el papel del estrés oxidativo en el desarrollo de las complicaciones asociadas a la DM es importante primero demostrar su existencia en una población libre de complicaciones. Por ello, nos pareció interesante conocer cual es el nivel de estrés oxidativo al inicio de la DM. El modo idóneo de hacerlo era estudiar pacientes con DM1, ya que podemos conocer perfectamente el inicio clínico de la enfermedad a diferencia de lo que sucede en la DM2. La demostración de que en una población joven, al inicio de la DM, ya se han puesto en marcha unos mecanismos que puedan incrementar una situación de riesgo para el desarrollo de las complicaciones micro y macroangiopáticas es una

información relevante desde el punto de vista clínico, que nos permitirá el desarrollo de estrategias en la prevención de estas complicaciones.

En relación al estrés oxidativo y el control glucémico, los datos existentes eran contradictorios, probablemente como consecuencia de que en los estudios en los que se analizó esta problemática, el estrés oxidativo fue evaluado en una etapa avanzada de la enfermedad en la que no se puede descartar la influencia de otros factores de confusión. En nuestro estudio, la utilización del inicio de la DM1 como modelo clínico nos permitió eliminar estos factores de confusión como son: las consecuencias metabólicas de la hiperglucemia crónica, el envejecimiento o la presencia de complicaciones crónicas. Además, este modelo clínico, es el único capaz de permitirnos la observación de una mejoría importante del control metabólico en un corto período de tiempo, tras la introducción de la terapia con insulina exógena. Nosotros, fuimos capaces de alcanzar a las 12 semanas del diagnóstico de la DM1, una reducción importante de los niveles de glucosa, demostrada por una disminución de 6 puntos en la HbA<sub>1c</sub> en ausencia de hipoglucemias moderadas-graves. Los resultados en este estudio demuestran que al inicio clínico de la DM1, los F<sub>2</sub>-IsoPs ya están aumentados y que esta elevación es dependiente de la hiperglucemia, tal como lo indica el hecho de que sus valores disminuyen un 27% a las 12 semanas de iniciar el tratamiento con insulina y de mejorar el control metabólico. Una de las limitaciones de este estudio, es que no podemos descartar la contribución de otros parámetros metabólicos, que también mejoraron con el tratamiento con insulina, como el perfil lipídico y, de manera especial, los niveles de colesterol LDL, que han sido implicados como un determinante directo del aumento de los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub>(351). Además, los ácidos grasos libres generados en cantidades elevadas en situación de deficiencia de insulina, como es el inicio clínico de la DM1, se han asociado con un incremento de la producción de los F<sub>2</sub>-IsoPs(352). Otro parámetro que puede haber contribuido a la disminución de la producción de F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub> es la corrección de la cetosis, ya que se ha descrito un aumento de la peroxidación lipídica con una disminución de los niveles de la glutatión peroxidasa, en pacientes con DM1 con episodios de cetonemia frecuentes debido a un DM mal controlada(353). Finalmente, no puede descartarse la contribución de la insulina *per se* en la disminución de la producción de los F<sub>2</sub>-IsoPs, ya que a la insulina se le ha atribuido un efecto anti-inflamatorio asociado con una disminución de la generación de radicales libres de oxígeno(354).

Una dato interesante, es que en los pacientes con DM1 a las 12 semanas de iniciar el tratamiento con insulina y de normalizar el control metabólico, la excreción de F2-IsoPs seguía siendo significativamente mayor a la de una población control de similar edad. El hecho de que no se consiguiera la normalización de los F2-IsoPs a pesar de alcanzar la normoglucemia, nos plantea varias hipótesis. Podría ser que el mínimo grado de hiperglucemia que presentan estos pacientes sea suficiente para generar estrés oxidativo, o que se precise de más tiempo para llegar a normalizar los niveles de F2-IsoPs, o que existan otros mecanismos en las etapas iniciales de la DM1, que se han activado en el medio ambiente diabético, cuyo efecto persiste a pesar de normalizar la glucemia. En este sentido, podría ser un mediador inflamatorio o la misma reacción inmune la que mantuviera el estrés oxidativo, como lo sugiere el hecho de que un año después del inicio de la DM1, se ha descrito una disminución progresiva de los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> cuando la reacción inmune/inflamatoria disminuye (355).

En base a la observación de unos niveles elevados de estrés oxidativo en la DM1 previo al inicio del tratamiento con insulina, cabría la posibilidad de plantearse el papel que puedan desempeñar los radicales libres de oxígeno en la patogenia de la DM1. Es decir, un posible efecto tóxico de los radicales libres de oxígeno sobre las células β en etapas previas a la normalización de la glucosa. Estudios *in vitro* apoyan la hipótesis de que los radicales libres de oxígeno están presentes ya al inicio de la DM y se ha propuesto que estos desencadenarían la destrucción de la célula β, cerrando un círculo vicioso en el cual el estrés oxidativo puede ser tanto causa como consecuencia de la disfunción de la célula β. Hasta ahora, sin embargo, no se han demostrado que los radicales libres de oxígeno sean inductores de la DM1 en humanos (356;357).

Otro de los aspectos a destacar de este estudio es la metodología utilizada. La cuantificación de los F2-IsoPs se realizó mediante la cromatografía líquida combinada con la espectrometría de masas que es el método considerado el “*gold standard*” por su elevada especificidad y sensibilidad en la cuantificación de los F2-IsoPs. Su principal inconveniente es que es una técnica laboriosa que precisa de la disponibilidad de un laboratorio especializado con gran tecnología que no está al alcance de todos los investigadores. En la actualidad, hay inmunoensayos para la cuantificación del 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, que son más fáciles de realizar y más baratos. Sin embargo, al igual que lo que sucede con la utilización de este método en la cuantificación de las prostaglandinas derivadas de la ciclooxigenasa tienen

una limitada especificidad, que es dependiente directamente del fabricante. En nuestro caso, la utilización de este método no nos fue posible ya que no obtuvimos un coeficiente de variación intra ni interensayo adecuados que hicieran reproducibles nuestros resultados. También es de destacar el tipo de muestra utilizada en este estudio para la cuantificación de los F2-IsoPs, que fue orina recogida durante 24 horas, lo que nos permitió una valoración integrada de la producción de los F2-IsoPs, reduciendo el impacto de la variación diurna individual de la excreción de F2-IsoPs y evitando la posible generación artefactual de F2-IsoPs por autooxidación del ácido araquidónico, que puede producirse en muestras de plasma y que es dependiente del contenido lipídico de la muestra. Con este tipo de muestra, la mayor limitación en la interpretación de los resultados es que se desconoce si los F2-IsoPs urinarios derivan de la producción exclusiva local en el riñón o de la filtración desde la circulación o de una combinación de ambos. Clásicamente, la cuantificación de los metabolitos urinarios de las prostaglandinas representa un índice fidedigno de la producción total endógena de las prostaglandinas originales, debido al hecho de que estas últimas derivan mayoritariamente del riñón. Se ha demostrado, que la excreción del metabolito urinario 2,3-dinor-5,6-dihidro-15-F<sub>2t</sub>-IsoP es proporcional al de su componente inicial el 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, por lo tanto, la cuantificación de este metabolito se aproxima a la excreción urinaria de su componente inicial. Además, hoy por hoy, no hay evidencia de que la cuantificación de este metabolito represente una ventaja adicional a la cuantificación del F2-IsoPs original. En nuestro estudio, el ambiente metabólico adverso al inicio de la DM1 apoya un estrés oxidativo generalizado y refuerza la idea de una producción general de F2-IsoPs por el organismo. De la misma manera, la disminución de la excreción de F2-IsoPs al mejorar el control metabólico, está a favor de una filtración, al menos en parte, desde la circulación.

Otro de los objetivos de este trabajo fue evaluar el efecto de la hiperglucemia sobre el TGFβ<sub>1</sub>. El modelo clínico utilizado en este estudio, nos permitía esta evaluación y además nos proporcionaba información sobre la actividad de esta vía metabólica al inicio clínico de la enfermedad. Observamos al inicio de la DM1, que los niveles de TGFβ<sub>1</sub> están 2,2 veces más elevados que los niveles del grupo control. Estos resultados son coherentes con la evidencia de que la hiperglucemia estimula la producción de TGFβ<sub>1</sub> y el inicio clínico de la DM1 es una situación de mal control metabólico. Se ha descrito, tanto en cultivos

celulares como en sistemas *in vivo*, que la principal característica del medio ambiente diabético, es decir la hiperglucemia, estimula la producción autocrina y la actividad del TGF $\beta_1$ , tanto directamente como a través del incremento de la glicación no enzimática de las proteínas, de la síntesis de novo del diacilglicerol que a su vez activa la proteína Kinasa C y del aumento de agentes vasoactivos como la angiotensina II, la endotelina y el tromboxano.

Cuando evaluamos el efecto del control glucémico sobre los niveles de TGF $\beta_1$ , observamos que a pesar de la importante mejoría del control glucémico obtenida en este estudio tras el inicio del tratamiento con insulina, estos niveles no se modificaron en ningún momento a lo largo del estudio. Este hecho nos sorprendió, debido a las evidencias existentes de que la hiperglucemia incrementa la actividad del TGF $\beta_1$ , y por tanto era de esperar que la mejoría del control glucémico disminuyera su actividad. Esto nos hizo hipotetizar que en esta fase de la DM1, la producción de TGF $\beta_1$  no está exclusivamente asociada al efecto estimulante de la hiperglucemia. El reciente conocimiento del papel de esta citocina en la modulación de la función celular inmune, permite plantear que estos niveles elevados de TGF $\beta_1$  probablemente estén relacionados con la actividad del proceso inmune implicado en la patogénesis de la enfermedad. En este sentido, se ha descrito que el TGF $\beta_1$  es una citocina pleiotrópica con múltiples acciones anti-inflamatorias, con capacidad para suprimir la actividad de las células T, B, macrófagos, e inhibir la expresión de múltiples citocinas proinflamatorias como el interferón  $\gamma$ , el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , la interleucina 1 y la interleucina 2, favoreciendo la diferenciación de los linfocitos TH2 sobre la diferenciación de los linfocitos TH1. Por otro lado, es capaz de bloquear la reacción inmune a diferentes niveles, que incluyen el procedimiento de presentación y procesamiento de antígenos por las células presentadoras de antígenos, la activación y diferenciación de las células TH1 o la producción de citocinas anti-inflamatorias, entre otros (340;341;343;345). Los sujetos con DM1 desarrollan una forma autoinmune de insulinitis con destrucción progresiva de las células  $\beta$  del páncreas y aparición de diabetes cuando esta destrucción es máxima. Numerosas evidencias experimentales sugieren que las citocinas proinflamatorias producidas por las células TH1 y los macrófagos desempeñan un papel importante en el desarrollo de esta lesión (358). Basados en los datos publicados, la actividad regulatoria del TGF $\beta_1$  produciría una acción directa sobre los macrófagos con una disminución de la reactividad TH1, por lo que es



aparentemente difícil explicar nuestros resultados, ya que nos esperaríamos, encontrar unos niveles disminuidos de esta citocina antiinflamatoria en sujetos que están siendo sometidos a un proceso autoinmune comparados con sujetos controles sanos. Sin embargo, ello probablemente sea debido aun aumento contra-egulatorio del  $TGF\beta_1$  en respuesta a la producción elevada de citocinas proinflamatorias, descrita tanto en estadios de pre-diabetes como durante los primeros años tras el inicio clínico de la enfermedad. Apoyan nuestros resultados la observación de niveles elevados de  $TGF\beta_1$  en familiares de primer grado de sujetos con DM1 y la correlación de estos niveles con el riesgo de desarrollar DM1 (338), la descripción de alteraciones del  $TGF\beta_1$  en diferentes estadios de la DM1, así como, que en sujetos con DM1 de más de dos años de evolución de la enfermedad disminuyen los niveles de  $TGF\beta_1$  sin relación con el control metabólico (350). Además, dos estudios recientes, han demostrado, que en DM1 experimental el tratamiento sistémico con  $TGF\beta_1$  detiene el fenómeno autoinmune que destruye los islotes, facilita su regeneración y cura la DM en ratones NOD diabéticos (359;360). Sin embargo, el papel patogénico del  $TGF\beta_1$  en el desarrollo o prevención de la DM1 en humanos necesita ser investigado en más profundidad.

En esta tesis también se ha evaluado el efecto del consumo de tabaco sobre el estrés oxidativo y la fibrogenesis. Nuestra inquietud surgió de la participación en un estudio epidemiológico nacional en la que se observó una prevalencia elevada de nefropatía diabética en sujetos fumadores y de la evidencia científica de numerosos estudios experimentales y epidemiológicos que apoyan un papel del consumo de tabaco en el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética. Sin embargo, a pesar de esta evidencia, el mecanismo patogénico de lesión del consumo de tabaco en la nefropatía diabética es aún desconocido. En los últimos años se ha atribuido al  $TGF\beta_1$  un papel en la nefropatía diabética debido a las propiedades proescleróticas de esta citocina. Se ha descrito que el  $TGF\beta_1$  regula la expresión de muchas de las proteínas de la matriz extracelular como el colágeno, fibronectina y proteinglicanos y que disminuye la síntesis de las enzimas proteolíticas que degradan las proteínas de la matriz extracelular, permitiendo la acumulación de la matriz extracelular que es la principal alteración patológica de la nefropatía diabética. Se han establecido varios factores que incrementan la expresión del  $TGF\beta_1$  entre los que destacan la hiperglucemia, la angiotensina II, la hipoxia, los productos finales de glicosilación avanzada, los radicales libres de

oxígeno, entre otros, que son factores nocivos al riñón. La manipulación del TGF $\beta_1$  mediante anticuerpos neutralizantes, el bloqueo del sistema renina angiotensina aldosterona o mediante la inhibición de la proteína kinasa C, en modelos experimentales de nefropatía diabética ha sido asociada con nefroprotección (361). La información existente en ese momento acerca del TGF $\beta_1$  y el consumo de tabaco era nula. De hecho, la base para analizar el efecto del tabaco sobre el TGF $\beta_1$  parte de nuestra propia observación de que pacientes con DM1 fumadores presentaban valores más elevados de esta citocina. Por el contrario, la capacidad oxidativa del tabaco era bien conocida aunque no se había explorado en pacientes con DM. Estudios previos habían establecido una asociación entre el consumo de tabaco y el estrés oxidativo y, consistente con esta noción, se había descrito que los niveles en plasma y urinarios de F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub> están aumentados en sujetos no diabéticos fumadores en comparación con sujetos no fumadores (362). En nuestro estudio, observamos que ambas vías metabólicas están aumentadas en los sujetos fumadores con DM1 en comparación con sujetos con y sin DM no fumadores. Observamos un incremento del 44% en la producción de F<sub>2</sub>-IsoP<sub>s</sub> en concordancia con los datos publicados y también confirmamos nuestra observación previa de una mayor actividad del TGF $\beta_1$  en los sujetos fumadores con DM1.

El aumento de la generación de los radicales libres de oxígeno ha sido extensamente estudiado en sujetos fumadores no diabéticos a través de la evaluación de la disminución antioxidativa, de la cuantificación de las proteínas, los lípidos y el DNA, modificados oxidativamente, estudiando los efectos del suplemento con antioxidantes sobre estos índices o los cambios de los mismos al dejar de fumar. En sujetos con DM1 no existe información acerca del efecto de dejar de fumar sobre ambas vías patogénicas. Sin embargo, este modelo clínico no es fácil de conseguir dado que los pacientes con DM1, generalmente jóvenes, no tienen conciencia del efecto perjudicial del consumo de tabaco y no son proclives al abandono del mismo, a pesar del cual, nos pareció que era el modelo clínico adecuado para valorar si el abandono del consumo de tabaco era capaz de llevar el estrés oxidativo y la actividad fibrogénica a unos niveles similares al de la población diabética no fumadora. Como era de esperar, a pesar de la evaluación de una gran cantidad de sujetos, el éxito en el abandono del consumo de tabaco fue escaso, a pesar de lo cual, la observación más relevante de este trabajo fue que, la actividad de ambas vías patogénicas disminuye en un período corto de tiempo

tras el cese del consumo de tabaco, implicando directamente al consumo de tabaco en este incremento de la actividad.

Como hemos visto durante el desarrollo de este trabajo la evidencia científica que apoya la existencia de un estrés oxidativo aumentado en fases iniciales de la DM1 y relacionado con la hiperglucemia es convincente. Dado que, este aumento precede en el tiempo al desarrollo de las complicaciones micro y macrovasculares de la DM1 es posible que intervengan en el futuro desarrollo de las mismas. Sin embargo, queda aún mucho por conocer ya que por ejemplo no se ha dilucidado como los radicales libres de oxígeno regulan las moléculas de señalización en el medio ambiente diabético. ¿ Qué pronostica el desequilibrio hacia un estado prooxidante en los sujetos con DM?. ¿ Son los antioxidantes la mejor manera de disminuir la biodisponibilidad de los radicales libres de oxígeno?. En este sentido, las líneas de investigación deben de dirigirse a intentar esclarecer los mecanismos por los que los radicales libres de oxígeno y los antioxidantes modifican las proteínas de señalización en la DM. Explorar porqué los sistemas que generan radicales libres de oxígeno están incrementados y los sistemas antioxidantes están disminuidos. Determinar si es preferible prevenir o limitar la formación de los radicales libres de oxígeno para atacar el origen de su formación, mejor que eliminarlos una vez se han generado. En relación al TGF $\beta_1$ , el avance en el conocimiento de los eventos moleculares por el cual este factor ejerce sus efectos celulares, mejorará la comprensión de los mecanismos de su naturaleza pleiotrópica o específica de contexto. Esto es particularmente relevante en la patofisiología de la DM porque la combinación de múltiples tipos de células (endoteliales, del músculo liso, leucocitos, glomerulares, mesangiales) que pueden verse afectadas por el ambiente bioquímico y humoral de esta enfermedad, proporciona numerosos contextos biológicos distintos en la que el TGF $\beta_1$  puede actuar.

En resumen, en este trabajo hemos podido demostrar que tanto el estrés oxidativo como la fibrogénesis están aumentadas ya en fases precoces de la enfermedad, así como la existencia de una relación directa entre la hiperglucemia y el estrés oxidativo. El modelo clínico utilizado para valorar el efecto de la hiperglucemia sobre la fibrogénesis no nos permitió extraer conclusiones definitivas, ya que la actividad del TGF $\beta_1$  estaba probablemente influida por el proceso autoinmune que destruía las células  $\beta$  del páncreas en estos sujetos. Por otra parte, se confirmó que el consumo de tabaco estimula directamente la

actividad de ambas vías patogénicas implicadas en la patogénesis de las complicaciones crónicas, explicando así, las numerosas evidencias epidemiológicas de la asociación entre el consumo de tabaco y el desarrollo y la progresión acelerada con un peor pronóstico de las complicaciones crónicas en los sujetos con DM1 fumadores. Este resultado es de relevancia clínica ya que aporta más argumentos para insistir a los sujetos con DM1 fumadores a abandonar este hábito perjudicial.

## **Conclusiones**

- ❖ El estrés oxidativo está aumentado al inicio clínico de la DM1
- ❖ La mejoría del control metabólico tras el inicio del tratamiento con insulina (corrección de la hiperglucemia, lípidos y de la cetosis) es asociada con una disminución del estrés oxidativo
- ❖ El TGF $\beta_1$  está elevado al inicio clínico de la DM1, pero su actividad no es modulada por la hiperglucemia. (Al inicio clínico de la DM1 el incremento de la actividad del TGF $\beta_1$  puede representar una respuesta contra-regulatoria a la activación inmuno-inflamatoria presente al diagnóstico de la DM1)
- ❖ El consumo de tabaco estimula directamente la actividad del EO y del TGF $\beta_1$ .
- ❖ El cese del consumo de tabaco disminuye en un período corto de tiempo la actividad de ambas vías patogénicas evaluadas.

## **Bibliografía**

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;1414-31.
2. Goday A. [Epidemiology of diabetes and its non-coronary complications]. *Rev.Esp.Cardiol.* 2002;657-70.
3. Franch NJ, Alvarez Torices JC, Alvarez GF, Diego DF, Hernandez MR, Cueto EA. [Epidemiology of diabetes mellitus in the province of Leon]. *Med.Clin.(Barc.)* 1992;607-11.
4. Bayo J, Sola C, Garcia F, Latorre PM, Vazquez JA. [Prevalence of non-insulin dependent diabetes mellitus in Lejona (Vizcaya, Spain)]. *Med.Clin.(Barc.)* 1993;609-12.
5. Vila L, Subirats E, Vila T, Margalef N, Cardona M, Vallescar R. Prevalencia de la diabetes en La Cerdanya (comarca del Pirineo Oriental). *Endocrinologia* 1994;305-9.
6. Muniz J, Hervada J, Juane R, Lopez-Rodriguez I, Castro-Beiras A. Prevalence of diabetes mellitus in the population aged 40-69 years in Galicia, northwest Spain. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 1995;137-42.
7. Tamayo-Marco B, Faure-Nogueras E, Roche-Asensio MJ, Rubio-Calvo E, Sanchez-Oriz E, Salvador-Olivan JA. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in Aragon, Spain. *Diabetes Care* 1997;534-6.
8. Castell C, Tresserras R, Serra J, Goday A, Lloveras G, Salleras L. Prevalence of diabetes in Catalonia (Spain): an oral glucose tolerance test-based population study. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 1999;33-40.
9. Botas CP, Delgado AE, Castano FG, Diaz dG, Prieto SJ, Diaz Cadorniga FJ. [Prevalence of diabetes mellitus and glucose intolerance in the population aged 30 to 75 years in Asturias, Spain]. *Rev Clin Esp* 2002;421-9.
10. Pablos-Velasco PL, Martinez-Martin FJ, Rodriguez-Perez F, Ania BJ, Losada A, Betancor P. Prevalence and determinants of diabetes mellitus and glucose intolerance in a Canarian Caucasian population - comparison of the 1997 ADA and the 1985 WHO criteria. *The Guia Study. Diabet.Med.* 2001;235-41.
11. Masia R, Sala J, Rohlfis I, Piulats R, Manresa JM, Marrugat J. [Prevalence of diabetes mellitus in the province of Girona, Spain: the REGICOR study]. *Rev Esp Cardiol.* 2004;261-4.
12. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;1183-97.
13. Estadísticas de Salud 1978-1987. Información Sanitaria y Epidemiológica. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección General de Salud Pública. Report 1991.
14. Garancini MP, Calori G, Ruotolo G, Manara E, Izzo A, Ebbli E, Bozzetti AM, Boari L, Lazzari P, Gallus G. Prevalence of NIDDM and impaired glucose tolerance in Italy: an OGTT-based population study. *Diabetologia* 1995;306-13.
15. Keen H, Jarrett RJ, McCartney P. The ten-year follow-up of the Bedford survey (1962-1972): glucose tolerance and diabetes. *Diabetologia* 1982;73-8.



16. Vazquez JA, Gaztambide S, Soto-Pedre E. [10-year prospective study on the incidence and risk factors for type 2 diabetes mellitus]. *Med.Clin (Barc.)* 2000;534-9.
17. Goday A, Castell C, Tresserras R, Canela J, Taberner JL, Lloveras G. Incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Catalonia, Spain. The Catalan Epidemiology Diabetes Study Group. *Diabetologia* 1992;267-71.
18. Serrano RM, Moy CS, Martin SR, Minuesa AA, Tomas Labat ME, Zarandieta RG, Herrera J. Incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in subjects 0-14 years of age in the Comunidad of Madrid, Spain. *Diabetologia* 1990;422-4.
19. Chueca M, Oyarzabal M, Reparaz F, Garagorri JM, Sola A. Incidence of type I diabetes mellitus in Navarre, Spain (1975-91). *Acta Paediatr.* 1997;632-7.
20. Morales-Perez FM, Barquero-Romero J, Perez-Miranda M. Incidence of type I diabetes among children and young adults (0-29 years) in the province of Badajoz, Spain during 1992 to 1996. *Acta Paediatr.* 2000;101-4.
21. Carrillo DA. [Incidence of type 1 diabetes mellitus in the Canary Islands (1995-1996). Epidemiologic Group of the Canary Society of Endocrinology and Nutrition]. *Rev Clin Esp* 2000;257-60.
22. Lopez-Siguero JP, Del Pino-De la Fuente, Martinez-Aedo MJ, Moreno-Molina JA. Increased incidence of type 1 diabetes in the south of Spain. *Diabetes Care* 2002;1099.
23. Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Christlieb AR, Busick EJ, Kahn CR. Risk of proliferative diabetic retinopathy in juvenile-onset type I diabetes: a 40-yr follow-up study. *Diabetes Care* 1986;443-52.
24. Pirart J. [Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973 (author's transl)]. *Diabete Metab* 1977;97-107.
25. Palmberg P, Smith M, Waltman S, Krupin T, Singer P, Burgess D, Wendtlan T, Achtenberg J, Cryer P, Santiago J, White N, Kilo C, Daughaday W. The natural history of retinopathy in insulin-dependent juvenile-onset diabetes. *Ophthalmology* 1981;613-8.
26. 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;837-53.
27. 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. *The New England Journal of Medicine* 1993;977-86.
28. Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Ophthalmology* 1995;647-61.
29. Cordonnier D, Bayle F, Benhamou PY, Milongo R, Zaoui P, Maynard C, Halimi S. Future trends of management of renal failure in diabetics. *Kidney Int.Suppl* 1993;S8-13.

30. Lopez RK, Saracho R, Garcia LF, Gentil MA, Castro P, Castilla J, Gutierrez JA, Martin-Martinez E, Alonso R, Bernabeu R, Munar MA, Lorenzo V, Vega N, Escallada R, Sierra T, Lara M, Estebanez C, Cleries M, Vela E, Tallon S, Garcia-Blasco MJ, Zurriaga O, Vazquez C, Sanchez-Casajus A, Torralbo A, Rodado R, Genoves A, Ripoll J, Asin JL, Magaz A, Aranzabal J. [Dialysis and Transplant Registry of the Spanish Society of Nephrology and regional registries. Rapport 2001]. *Nefrologia*. 2004;21-33.
31. Robles NR, Cid MC, Pizarro JL, Sanchez-Casado E. End-stage renal failure due to diabetic nephropathy in Spain. *Nephrol.Dial.Transplant*. 1996;393-4.
32. Mogensen CE. [The natural history of diabetic nephropathy in insulindependent diabetics and the concept of non-glycemic treatment]. *Journ.Annu.Diabetol.Hotel Dieu* 1989;225-46.
33. Renal involvement in type 1 (IDDM) diabetes in Spain. ESTUDIO DIAMANTE. *Diabetes Res.Clin Pract*. 1997;129-37.
34. Esmatjes E, Castell C, Gonzalez T, Tresserras R, Lloveras G. Epidemiology of renal involvement in type II diabetics (NIDDM) in Catalonia. The Catalan Diabetic Nephropathy Study Group. *Diabetes Res.Clin Pract*. 1996;157-63.
35. Esmatjes E, Castell C, Goday A, Montanya E, Pou JM, Salinas I, Simo R, Gonzalez MT, Tresserras R, Lloveras G. [Prevalence of nephropathy in type I diabetes]. *Med Clin (Barc.)* 1998;6-10.
36. Robles NR, Cid MC, Roncero F, Pizarro JL, Sanchez-Casado E, Perez MM. [Incidence of diabetic nephropathy in the province of Badajoz along the period from 1990 to 1994]. *An.Med Interna* 1996;572-5.
37. Robles NR, Cid MC, Pizarro JL, Sanchez-Casado E. Increasing incidence of diabetic nephropathy in Spain. *Nephron* 1996;455-6.
38. Cabezas-Cerrato J. The prevalence of clinical diabetic polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. Neuropathy Spanish Study Group of the Spanish Diabetes Society (SDS). *Diabetologia* 1998;1263-9.
39. Figuerola D, Recasens A, Castell C, Lloveras G. [Care for the diabetic patient in Catalonia. A study of a population sample]. *Med Clin (Barc.)* 1992;90-5.
40. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. *Diabetes Care* 1979;120-6.
41. Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;937-42.
42. Feskens EJ, Kromhout D. Glucose tolerance and the risk of cardiovascular disease: the Zutphen Study. *J Clin Epidemiol*. 1992;1327-34.
43. Nichols GA, Gullion CM, Koro CE, Ephross SA, Brown JB. The Incidence of Congestive Heart Failure in Type 2 Diabetes: An update. *Diabetes Care* 2004;1879-84.
44. Laakso M, Lehto S. Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis* 1998;S65-S73.
45. Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 1987;463-524.

46. Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine* 1998;229-34.
47. Krolewski AS, Warram JH, Valsania P, Martin BC, Laffel LM, Christlieb AR. Evolving natural history of coronary artery disease in diabetes mellitus. *Am.J Med* 1991;56S-61S.
48. Lackland DT, Moore MA. Hypertension-related mortality and morbidity in the southeast. *South.Med J* 1997;191-8.
49. Burchfiel CM, Curb JD, Rodriguez BL, Abbott RD, Chiu D, Yano K. Glucose intolerance and 22-year stroke incidence. The Honolulu Heart Program. *Stroke* 1994;951-7.
50. Gray CS, Taylor R, French JM, Alberti KG, Venables GS, James OF, Shaw DA, Cartledge NE, Bates D. The prognostic value of stress hyperglycaemia and previously unrecognized diabetes in acute stroke. *Diabet.Med* 1987;237-40.
51. Schaper NC, Nabuurs-Franssen MH, Huijberts MS. Peripheral vascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res.Rev* 2000;S11-S15.
52. Reichard P. Are there any glycemic thresholds for the serious microvascular diabetic complications? *J Diabetes Complications* 1995;25-30.
53. 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;2159-67.
54. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Retinopathy and Nephropathy in Patients with Type 1 Diabetes Four Years after a Trial of Intensive Therapy. *The New England Journal of Medicine* 2000;381-9.
55. Knatterud GL, Klimt CR, Levin ME, Jacobson ME, Goldner MG. Effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes. VII. Mortality and selected nonfatal events with insulin treatment. *JAMA* 1978;37-42.
56. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res.Clin Pract.* 1995;103-17.
57. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. Relationship of hyperglycemia to the long-term incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch.Intern.Med* 1994;2169-78.
58. Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 1995;258-68.
59. Effect of intensive diabetes management on macrovascular events and risk factors in the Diabetes Control and Complications Trial. *Am.J Cardiol.* 1995;894-903.

60. Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Poor glycemic control predicts coronary heart disease events in patients with type 1 diabetes without nephropathy. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999;1014-9.
61. Koivisto VA, Stevens LK, Mattock M, Ebeling P, Muggeo M, Stephenson J, Idzior-Walus B. Cardiovascular disease and its risk factors in IDDM in Europe. EURODIAB IDDM Complications Study Group. *Diabetes Care* 1996;689-97.
62. Orchard TJ, Olson JC, Erbey JR, Williams K, Forrest KYZ, Smithline Kinder L, Ellis D, Becker DJ. Insulin Resistance-Related Factors, but not Glycemia, Predict Coronary Artery Disease in Type 1 Diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications study. *Diabetes Care* 2003;1374-9.
63. Forrest KY, Becker DJ, Kuller LH, Wolfson SK, Orchard TJ. Are predictors of coronary heart disease and lower-extremity arterial disease in type 1 diabetes the same? A prospective study. *Atherosclerosis* 2000;159-69.
64. Moss SE, Klein R, Klein BE. The 14-year incidence of lower-extremity amputations in a diabetic population. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* 1999;951-9.
65. Keen H, Rose G, Pyke DA, Boyns D, Chlouverakis C. Blood-sugar and arterial disease. *Lancet* 1965;505-8.
66. Ostrander LD, Jr., Francis T, Jr., HAYNER NS, KJELSBURG MO, Epstein FH. THE RELATIONSHIP OF CARDIOVASCULAR DISEASE TO HYPERGLYCEMIA. *Ann.Intern.Med* 1965;1188-98.
67. Asymptomatic hyperglycemia and coronary heart disease. A series of papers by the International Collaborative Group, based on studies in fifteen populations. Introduction. *J Chronic.Dis.* 1979;683-91.
68. Uusitupa MI, Niskanen LK, Siitonen O, Voutilainen E, Pyorala K. Ten-year cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipoprotein composition in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia* 1993;1175-84.
69. Kuusisto J, Mykkanen L, Pyorala K, Laakso M. NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. *Diabetes* 1994;960-7.
70. Kuusisto J, Mykkanen L, Pyorala K, Laakso M. Non-insulin-dependent diabetes and its metabolic control are important predictors of stroke in elderly subjects. *Stroke* 1994;1157-64.
71. Turner RC, Millns H, Neil HA, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR, Holman RR. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ* 1998;823-8.
72. UKPDS 28: a randomized trial of efficacy of early addition of metformin in sulfonylurea-treated type 2 diabetes. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes Care* 1998;87-92.
73. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;854-65.

74. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999;920-4.
75. Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KGMM. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diabetic Medicine* 2002;708-23.
76. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ* 1998;703-13.
77. Andersson DK, Svardsudd K. Long-term glycemic control relates to mortality in type II diabetes. *Diabetes Care* 1995;1534-43.
78. Gall MA, Borch-Johnsen K, Hougaard P, Nielsen FS, Parving HH. Albuminuria and poor glycemic control predict mortality in NIDDM. *Diabetes* 1995;1303-9.
79. Malmberg K, Ryden L, Efendic S, Herlitz J, Nicol P, Waldenstrom A, Wedel H, Welin L. Randomized trial of insulin-glucose infusion followed by subcutaneous insulin treatment in diabetic patients with acute myocardial infarction (DIGAMI study): effects on mortality at 1 year. *J Am.Coll.Cardiol.* 1995;57-65.
80. Hanefeld M, Fischer S, Julius U, Schulze J, Schwanebeck U, Schmechel H, Ziegelasch HJ, Lindner J. Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. *Diabetologia* 1996;1577-83.
81. Standl E, Balletshofer B, Dahl B, Weichenhain B, Stiegler H, Hormann A, Holle R. Predictors of 10-year macrovascular and overall mortality in patients with NIDDM: the Munich General Practitioner Project. *Diabetologia* 1996;1540-5.
82. Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Predictors of stroke in middle-aged patients with non-insulin-dependent diabetes. *Stroke* 1996;63-8.
83. Lehto S, Ronnema T, Haffner SM, Pyorala K, Kallio V, Laakso M. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. *Diabetes* 1997;1354-9.
84. Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 1998;1167-72.
85. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* 2003;383-93.
86. Mogensen CE. Diabetes mellitus and the kidney. *Kidney Int.* 1982;673-5.
87. Epstein M, Sowers JR. Diabetes mellitus and hypertension. *Hypertension* 1992;403-18.
88. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC, Jr., Sowers JR. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999;1134-46.

89. Fuller JH. Epidemiology of hypertension associated with diabetes mellitus. *Hypertension* 1985;113-117.
90. Fuller JH, Stevens LK. Epidemiology of hypertension in diabetic patients and implications for treatment. *Diabetes Care* 1991;8-12.
91. Christlieb AR. The hypertensions of diabetes. *Diabetes Care* 1982;50-8.
92. Simonson DC. Etiology and prevalence of hypertension in diabetic patients. *Diabetes Care* 1988;821-7.
93. Earle K, Walker J, Hill C, Viberti G. Familial clustering of cardiovascular disease in patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 1992;673-7.
94. Krolewski AS, Canessa M, Warram JH, Laffel LM, Christlieb AR, Knowler WC, Rand LI. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* 1988;140-5.
95. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 1989;1161-5.
96. Lurbe A, Fioretto P, Mauer M, LaPointe MS, Battle D. Growth phenotype of cultured skin fibroblasts from IDDM patients with and without nephropathy and overactivity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Kidney Int.* 1996;1684-93.
97. Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Norgaard K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen T. Microalbuminuria. Implications for micro- and macrovascular disease. *Diabetes Care* 1992;1181-91.
98. Bank N. Mechanisms of diabetic hyperfiltration. *Kidney Int.* 1991;792-807.
99. Barzilay J, Warram JH, Bak M, Laffel LM, Canessa M, Krolewski AS. Predisposition to hypertension: risk factor for nephropathy and hypertension in IDDM. *Kidney Int.* 1992;723-30.
100. Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen FS, Hansen BV, Lecerf L, Poirier O, Danilov S, Boelskifte S, Borch-Johnsen K. Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-I-converting enzyme gene is associated with coronary heart disease in IDDM patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1995;798-803.
101. Barker DJ. The fetal origins of type 2 diabetes mellitus. *Ann.Intern.Med* 1999;322-4.
102. Weidmann P, Ferrari P. Central role of sodium in hypertension in diabetic subjects. *Diabetes Care* 1991;220-32.
103. Rowe JW, YounG JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallotta J, Landsberg L. Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes* 1981;219-25.
104. Baum M. Insulin stimulates volume absorption in the rabbit proximal convoluted tubule. *J Clin Invest* 1987;1104-9.
105. Hall JE, Coleman TG, Mizelle HL. Does chronic hyperinsulinemia cause hypertension? *Am.J Hypertens.* 1989;171-3.

106. Lurbe E, Redon J, Kesani A, Pascual JM, Tacons J, Alvarez V, Batlle D. Increase in nocturnal blood pressure and progression to microalbuminuria in type 1 diabetes. *The New England Journal of Medicine* 2002;797-805.
107. Mitchell TH, Nolan B, Henry M, Cronin C, Baker H, Greely G. Microalbuminuria in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus relates to nocturnal systolic blood pressure. *Am.J Med* 1997;531-5.
108. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens.* 2003;1011-53.
109. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003;2560-72.
110. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *The New England Journal of Medicine* 1993;1456-62.
111. Hebert LA, Bain RP, Verme D, Cattran D, Whittier FC, Tolchin N, Rohde RD, Lewis EJ. Remission of nephrotic range proteinuria in type I diabetes. Collaborative Study Group. *Kidney Int.* 1994;1688-93.
112. Mogensen CE. Microalbuminuria and hypertension with focus on type 1 and type 2 diabetes. *J Intern.Med* 2003;45-66.
113. Lewis JB, Berl T, Bain RP, Rohde RD, Lewis EJ. Effect of intensive blood pressure control on the course of type 1 diabetic nephropathy. Collaborative Study Group. *Am.J Kidney Dis.* 1999;809-17.
114. Should all patients with type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria receive angiotensin-converting enzyme inhibitors? A meta-analysis of individual patient data. *Ann.Intern.Med* 2001;370-9.
115. Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ* 1998;713-20.
116. Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlof B, Elmfeldt D, Julius S, Menard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet* 1998;1755-62.
117. Ruggenenti P, Fassi A, Ilieva AP, Bruno S, Iliev IP, Brusegan V, Rubis N, Gherardi G, Arnoldi F, Ganeva M, Ene-Iordache B, Gaspari F, Perna A, Bossi A, Trevisan R, Dodesini AR, Remuzzi G. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* 2004;1941-51.
118. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* 2001;851-60.
119. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S. Effects of losartan on renal and

cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 2001;861-9.

120. Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* 2001;870-8.
121. Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman J, Snapinn S. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002;1004-10.
122. Diuretic versus alpha-blocker as first-step antihypertensive therapy: final results from the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Hypertension* 2003;239-46.
123. Curb JD, Pressel SL, Cutler JA, Savage PJ, Applegate WB, Black H, Camel G, Davis BR, Frost PH, Gonzalez N, Guthrie G, Oberman A, Rutan GH, Stamler J. Effect of diuretic-based antihypertensive treatment on cardiovascular disease risk in older diabetic patients with isolated systolic hypertension. *Systolic Hypertension in the Elderly Program Cooperative Research Group. JAMA* 1996;1886-92.
124. Tuomilehto J, Rastenyte D, Birkenhager WH, Thijs L, Antikainen R, Bulpitt CJ, Fletcher AE, Forette F, Goldhaber A, Palatini P, Sarti C, Fagard R. Effects of calcium-channel blockade in older patients with diabetes and systolic hypertension. *Systolic Hypertension in Europe Trial Investigators. The New England Journal of Medicine* 1999;677-84.
125. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Lancet* 2000;253-9.
126. Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, Luomanmaki K, Dahlof B, de Faire U, Morlin C, Karlberg BE, Wester PO, Bjorck JE. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet* 1999;611-6.
127. Sowers JR, Haffner S. Treatment of cardiovascular and renal risk factors in the diabetic hypertensive. *Hypertension* 2002;781-8.
128. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. *American Diabetes Association. Diabetes Care* 1998;179-82.
129. Haffner SM. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. *Diabetes Care* 2003;S83-S86.
130. Krentz AJ. Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes.Metab* 2003;S19-S27.
131. 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;2893-8.



132. Haffner SM, Mykkanen L, Festa A, Burke JP, Stern MP. Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state. *Circulation* 2000;975-80.
133. Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990;495-506.
134. Coresh J, Kwiterovich PO, Jr., Smith HH, Bachorik PS. Association of plasma triglyceride concentration and LDL particle diameter, density, and chemical composition with premature coronary artery disease in men and women. *J Lipid Res.* 1993;1687-97.
135. Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA* 1996;875-81.
136. Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, Thomson J, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis* 1994;241-53.
137. Blake GJ, Otvos JD, Rifai N, Ridker PM. Low-density lipoprotein particle concentration and size as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy as predictors of cardiovascular disease in women. *Circulation* 2002;1930-7.
138. Rosenson RS, Otvos JD, Freedman DS. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) trial. *Am.J Cardiol.* 2002;89-94.
139. St Pierre AC, Bergeron J, Pirro M, Cantin B, Dagenais GR, Despres JP, Lamarche B. Effect of plasma C-reactive protein levels in modulating the risk of coronary heart disease associated with small, dense, low-density lipoproteins in men (The Quebec Cardiovascular Study). *Am.J Cardiol.* 2003;555-8.
140. Malmstrom R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Jarvinen H, Shepherd J, Taskinen MR. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* 1997;454-62.
141. Cummings MH, Watts GF, Umpleby AM, Hennessy TR, Naoumova R, Slavin BM, Thompson GR, Sonksen PH. Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in NIDDM. *Diabetologia* 1995;959-67.
142. Kelley DE, Simoneau JA. Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1994;2349-56.
143. Sniderman AD, Scantlebury T, Cianflone K. Hypertriglyceridemic hyperapob: the unappreciated atherogenic dyslipoproteinemia in type 2 diabetes mellitus. *Ann.Intern.Med* 2001;447-59.
144. 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;2486-97.

145. Clearfield M, Downs JR, Weis S, Whitney EJ, Kruyer W, Shapiro DR, Stein EA, Langendorfer A, Beere PA, Gotto AM. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS): efficacy and tolerability of long-term treatment with lovastatin in women. *J Womens Health Gend.Based.Med* 2001;971-81.
146. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;2005-16.
147. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JH. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;685-96.
148. Pyorala K, Pedersen TR, Kjekshus J, Faergeman O, Olsson AG, Thorgeirsson G. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care* 1997;614-20.
149. Goldberg RB, Mellies MJ, Sacks FM, Moye LA, Howard BV, Howard WJ, Davis BR, Cole TG, Pfeffer MA, Braunwald E. Cardiovascular events and their reduction with pravastatin in diabetic and glucose-intolerant myocardial infarction survivors with average cholesterol levels: subgroup analyses in the cholesterol and recurrent events (CARE) trial. The Care Investigators. *Circulation* 1998;2513-9.
150. Long-term effectiveness and safety of pravastatin in 9014 patients with coronary heart disease and average cholesterol concentrations: the LIPID trial follow-up. *Lancet* 2002;1379-87.
151. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;1711-8.
152. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Nelson DB, Elam MB, Schaefer EJ, Faas FH, Anderson JW. Diabetes, plasma insulin, and cardiovascular disease: subgroup analysis from the Department of Veterans Affairs high-density lipoprotein intervention trial (VA-HIT). *Arch.Intern.Med* 2002;2597-604.
153. Wakefield M, Wilson D, Phillips P, Kent P, Roberts L, Owen N. Smoking-related beliefs and behaviour of South Australians with diabetes. *Aust.J Public Health* 1995;309-12.
154. Manson JE, Ajani UA, Liu S, Nathan DM, Hennekens CH. A prospective study of cigarette smoking and the incidence of diabetes mellitus among US male physicians. *Am.J Med* 2000;538-42.
155. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England Journal of Medicine* 2001;790-7.
156. Ikeda Y, Suehiro T, Takamatsu K, Yamashita H, Tamura T, Hashimoto K. Effect of smoking on the prevalence of albuminuria in Japanese men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res.Clin Pract.* 1997;57-61.

157. Muhlhauser I, Sawicki P, Berger M. Cigarette-smoking as a risk factor for macroproteinuria and proliferative retinopathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986;500-2.
158. Christiansen JS. Cigarette smoking and prevalence of microangiopathy in juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1978;146-9.
159. Risk factors for development of microalbuminuria in insulin dependent diabetic patients: a cohort study. Microalbuminuria Collaborative Study Group, United Kingdom. *BMJ* 1993;1235-9.
160. Chase HP, Garg SK, Marshall G, Berg CL, Harris S, Jackson WE, Hamman RE. Cigarette smoking increases the risk of albuminuria among subjects with type I diabetes. *JAMA* 1991;614-7.
161. Forsblom CM, Groop PH, Ekstrand A, Totterman KJ, Sane T, Saloranta C, Groop L. Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM. *Diabetes Care* 1998;1932-8.
162. Sawicki PT, Didjurgeit U, Muhlhauser I, Bender R, Heinemann L, Berger M. Smoking is associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1994;126-31.
163. Biesenbach G, Grafinger P, Janko O, Zazgornik J. Influence of cigarette-smoking on the progression of clinical diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Clin Nephrol.* 1997;146-50.
164. Scott LJ, Warram JH, Hanna LS, Laffel LM, Ryan L, Krolewski AS. A nonlinear effect of hyperglycemia and current cigarette smoking are major determinants of the onset of microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 2001;2842-9.
165. Chuahirun T, Wesson DE. Cigarette smoking predicts faster progression of type 2 established diabetic nephropathy despite ACE inhibition. *Am.J Kidney Dis.* 2002;376-82.
166. Chuahirun T, Simoni J, Hudson C, Seipel T, Khanna A, Harrist RB, Wesson DE. Cigarette smoking exacerbates and its cessation ameliorates renal injury in type 2 diabetes. *Am.J Med Sci.* 2004;57-67.
167. Ekberg G, Grefberg N, Larsson LO, Vaara I. Cigarette smoking and glomerular filtration rate in insulin-treated diabetics without manifest nephropathy. *J Intern.Med* 1990;211-7.
168. Esmatjes E, Flores L, Lario S, Claria J, Cases A, Inigo P, Campistol JM. Smoking increases serum levels of transforming growth factor-beta in diabetic patients. *Diabetes Care* 1999;1915-6.
169. Hansen KW, Pedersen MM, Christiansen JS, Mogensen CE. Night blood pressure and cigarette smoking: disparate association in healthy subjects and diabetic patients. *Blood Press* 1994;381-8.
170. Poulsen PL, Ebbehoj E, Hansen KW, Mogensen CE. Effects of smoking on 24-h ambulatory blood pressure and autonomic function in normoalbuminuric insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Am.J Hypertens.* 1998;1093-9.
171. Morgado PB, Chen HC, Patel V, Herbert L, Kohner EM. The acute effect of smoking on retinal blood flow in subjects with and without diabetes. *Ophthalmology* 1994;1220-6.

172. Wasada T, Kawahara R, Katsumori K, Naruse M, Omori Y. Plasma concentration of immunoreactive vascular endothelial growth factor and its relation to smoking. *Metabolism* 1998;27-30.
173. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;434-44.
174. Morrish NJ, Stevens LK, Fuller JH, Jarrett RJ, Keen H. Risk factors for macrovascular disease in diabetes mellitus: the London follow-up to the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics. *Diabetologia* 1991;590-4.
175. Adler AI, Stevens RJ, Neil A, Stratton IM, Boulton AJ, Holman RR. UKPDS 59: hyperglycemia and other potentially modifiable risk factors for peripheral vascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;894-9.
176. Kothari V, Stevens RJ, Adler AI, Stratton IM, Manley SE, Neil HA, Holman RR. UKPDS 60: risk of stroke in type 2 diabetes estimated by the UK Prospective Diabetes Study risk engine. *Stroke* 2002;1776-81.
177. Al Delaimy WK, Willett WC, Manson JE, Speizer FE, Hu FB. Smoking and mortality among women with type 2 diabetes: The Nurses' Health Study cohort. *Diabetes Care* 2001;2043-8.
178. Wannamethee SG, Shaper AG, Perry IJ. Smoking as a modifiable risk factor for type 2 diabetes in middle-aged men. *Diabetes Care* 2001;1590-5.
179. Will JC, Galuska DA, Ford ES, Mokdad A, Calle EE. Cigarette smoking and diabetes mellitus: evidence of a positive association from a large prospective cohort study. *Int.J Epidemiol.* 2001;540-6.
180. Stegmayr BG. A study of patients with diabetes mellitus (type 1) and end-stage renal failure: tobacco usage may increase risk of nephropathy and death. *J Intern.Med* 1990;121-4.
181. Yudkin JS. How can we best prolong life? Benefits of coronary risk factor reduction in non-diabetic and diabetic subjects. *BMJ* 1993;1313-8.
182. Chaturvedi N, Stevens L, Fuller JH. Which features of smoking determine mortality risk in former cigarette smokers with diabetes? The World Health Organization Multinational Study Group. *Diabetes Care* 1997;1266-72.
183. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996;1422-8.
184. Gabbay KH. Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu.Rev Med* 1975;521-36.
185. Van den Enden MK, Nyengaard JR, Ostrow E, Burgan JH, Williamson JR. Elevated glucose levels increase retinal glycolysis and sorbitol pathway metabolism. Implications for diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1995;1675-85.
186. Xia P, Kramer RM, King GL. Identification of the mechanism for the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J Clin Invest* 1995;733-40.

187. Garcia SF, Virag L, Jagtap P, Szabo E, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KG, Salzman AL, Southan GJ, Szabo C. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat.Med* 2001;108-13.
188. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den EM, Kilo C, Tilton RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 1993;801-13.
189. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999;23-30.
190. Pugliese G, Tilton RG, Williamson JR. Glucose-induced metabolic imbalances in the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab Rev* 1991;35-59.
191. Engerman RL, Kern TS, Larson ME. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. *Diabetologia* 1994;141-4.
192. Sima AA, Bril V, Nathaniel V, McEwen TA, Brown MB, Lattimer SA, Greene DA. Regeneration and repair of myelinated fibers in sural-nerve biopsy specimens from patients with diabetic neuropathy treated with sorbinil. *The New England Journal of Medicine* 1988;548-55.
193. Greene DA, Arezzo JC, Brown MB. Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. *Zenarestat Study Group. Neurology* 1999;580-91.
194. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;813-20.
195. Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 1998;1139-45.
196. Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 1995;3702-9.
197. Thornalley PJ. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem.J* 1990;1-11.
198. Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, Beisswenger P, Thorpe SR, Onorato J, Brownlee M. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest* 1998;1142-7.
199. Eble AS, Thorpe SR, Baynes JW. Nonenzymatic glucosylation and glucose-dependent cross-linking of protein. *J Biol.Chem.* 1983;9406-12.
200. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1993;2463-9.
201. Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol.Chem.* 1989;21597-602.

202. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol.Chem.* 1992;14998-5004.
203. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler H, Muller M, Wahl P, Ziegler R, Nawroth PP. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997;1481-90.
204. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol.Chem.* 1997;17810-4.
205. Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler.Thromb.* 1994;1521-8.
206. Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;11047-52.
207. Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, Cerami A. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol.Med* 1995;634-46.
208. Horiuchi S, Higashi T, Ikeda K, Saishoji T, Jinnouchi Y, Sano H, Shibayama R, Sakamoto T, Araki N. Advanced glycation end products and their recognition by macrophage and macrophage-derived cells. *Diabetes* 1996;S73-S76.
209. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986;1629-32.
210. Edelstein D, Brownlee M. Aminoguanidine ameliorates albuminuria in diabetic hypertensive rats. *Diabetologia* 1992;96-7.
211. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;11555-8.
212. Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1991;1328-34.
213. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001;129-46.
214. Wolffenbuttel BH, Boulanger CM, Crijns FR, Huijberts MS, Poitevin P, Swennen GN, Vasani S, Egan JJ, Ulrich P, Cerami A, Levy BI. Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;4630-4.
215. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am.J Med* 1991;31S-8S.

216. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;721-4.
217. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000;655-73.
218. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am.J Med* 1994;5S-13S.
219. Griending KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003;1912-6.
220. Meagher EA, FitzGerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic.Biol.Med* 2000;1745-50.
221. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am.J Clin Nutr.* 1993;715S-24S.
222. Holley AE, Walker MK, Cheeseman KH, Slater TF. Measurement of n-alkanals and hydroxyalkanals in biological samples. *Free Radic.Biol.Med* 1993;281-9.
223. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem.* 1996;498-506.
224. Kosugi H, Kato T, Kikugawa K. Formation of yellow, orange, and red pigments in the reaction of alk-2-enals with 2-thiobarbituric acid. *Anal.Biochem.* 1987;456-64.
225. Yeo HC, Helbock HJ, Chyu DW, Ames BN. Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal.Biochem.* 1994;391-6.
226. Corongiu FP, Poli G, Dianzani MU, Cheeseman KH, Slater TF. Lipid peroxidation and molecular damage to polyunsaturated fatty acids in rat liver. Recognition of two classes of hydroperoxides formed under conditions in vivo. *Chem.Biol.Interact.* 1986;147-55.
227. Dormandy TL, Wickens DG. The experimental and clinical pathology of diene conjugation. *Chem.Phys.Lipids* 1987;353-64.
228. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990;9383-7.
229. Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hoberg AM, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella A, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB. Biomarkers. *Mol.Aspects Med* 2002;101-208.
230. Porter NA, Funk MO. Letter: Peroxy radical cyclization as a model for prostaglandin biosynthesis. *J Org.Chem.* 1975;3614-5.
231. Pryor WA, Stanley JP, Blair E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* 1976;370-9.
232. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic.Biol.Med* 2000;505-13.

233. Taber DF, Morrow JD, Roberts LJ. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins* 1997;63-7.
234. Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, Adiyaman M, Lawson JA, FitzGerald GA. Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins* 1997;853-73.
235. Liu T, Stern A, Roberts LJ, Morrow JD. The isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J Biomed.Sci.* 1999;226-35.
236. Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2005;279-86.
237. Pratico D. F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 1999;1-10.
238. Morrow JD, Roberts LJ. Mass spectrometric quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods Enzymol.* 1999;3-12.
239. Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, Adiyaman M, Lawson JA, FitzGerald GA. The isoprostanes: a perspective. *Prostaglandins* 1997;823-51.
240. Pratico D, Barry OP, Lawson JA, Adiyaman M, Hwang SW, Khanapure SP, Iuliano L, Rokach J, FitzGerald GA. IPF2alpha-I: an index of lipid peroxidation in humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;3449-54.
241. Fam SS, Morrow JD. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. *Curr.Med Chem.* 2003;1723-40.
242. Sodergren E, Vessby B, Basu S. Radioimmunological measurement of F(2)-isoprostanes after hydrolysis of lipids in tissues. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 2000;149-52.
243. Wang Z, Ciabattini G, Creminon C, Lawson J, FitzGerald GA, Patrono C, Macclouf J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 1995;94-100.
244. Helmersson J, Basu S. F(2)-isoprostane and prostaglandin F(2 alpha)metabolite excretion rate and day to day variation in healthy humans. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 2001;99-102.
245. Montine TJ, Quinn JF, Milatovic D, Silbert LC, Dang T, Sanchez S, Terry E, Roberts LJ, Kaye JA, Morrow JD. Peripheral F2-isoprostanes and F4-neuroprostanes are not increased in Alzheimer's disease. *Ann.Neurol.* 2002;175-9.
246. Morrow JD, Zackert WE, Yang JP, Kurhts EH, Callewaert D, Dworski R, Kanai K, Taber D, Moore K, Oates JA, Roberts LJ. Quantification of the major urinary metabolite of 15-F2t-isoprostane (8-iso-PGF2alpha) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *Anal.Biochem.* 1999;326-31.
247. Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, Hoover RL, Badr KF. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest* 1992;136-41.



248. Fukunaga M, Makita N, Roberts LJ, Morrow JD, Takahashi K, Badr KF. Evidence for the existence of F2-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am.J Physiol* 1993;C1619-C1624.
249. Kunapuli P, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Functional characterization of the ocular prostaglandin f2alpha (PGF2alpha) receptor. Activation by the isoprostane, 12-iso-PGF2alpha. *J Biol.Chem.* 1997;27147-54.
250. Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1997;2309-15.
251. Morrow JD, Minton TA, Roberts LJ. The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* 1992;155-63.
252. Pratico D, Smyth EM, Violi F, FitzGerald GA. Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F2alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol.Chem.* 1996;14916-24.
253. Kinsella BT, O'Mahony DJ, FitzGerald GA. The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 1997;957-64.
254. Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;224-9.
255. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Graham LB, Parker CE, Ames BN, Basu S, FitzGerald GA, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plastaras J, Roberts LJ, Rokach J, Shigenaga MK, Sun J, Walter PB, Tomer KB, Barrett JC, Mason RP. Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclufenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl(4) poisoning. *Free Radic.Biol.Med* 2005;711-8.
256. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, FitzGerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plastaras J, Roberts LJ, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP, Barrett JC. Biomarkers of Oxidative Stress Study II: Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl(4) poisoning? *Free Radic.Biol.Med* 2005;698-710.
257. Altomare E, Grattagliano I, Vendemaile G, Micelli-Ferrari T, Signorile A, Cardia L. Oxidative protein damage in human diabetic eye: evidence of a retinal participation. *Eur.J Clin Invest* 1997;141-7.
258. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997;457-68.
259. Dizdaroglu M. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett.* 1993;1-6.

260. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch.Biochem.Biophys.* 1990;1-8.
261. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.* 1990;69-71.
262. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem.J* 1987;243-50.
263. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, III. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem.Mol.Toxicol.* 2003;24-38.
264. Akkus I, Kalak S, Vural H, Caglayan O, Menekse E, Can G, Durmus B. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim.Acta* 1996;221-7.
265. Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hanninen O, Sen CK. Increased resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men. *Diabetes Care* 1996;569-74.
266. Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, Manto A, Ghirlanda G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997;1853-8.
267. Natarajan R, Lanting L, Gonzales N, Nadler J. Formation of an F<sub>2</sub>-isoprostane in vascular smooth muscle cells by elevated glucose and growth factors. *Am.J Physiol* 1996;H159-H165.
268. Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF<sub>2</sub> alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 1995;225-9.
269. Sampson MJ, Gopaul N, Davies IR, Hughes DA, Carrier MJ. Plasma F<sub>2</sub> isoprostanes: direct evidence of increased free radical damage during acute hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;537-41.
270. Catella-Lawson F, FitzGerald GA. Oxidative stress and platelet activation in diabetes mellitus. *Diabetes Res.Clin Pract.* 1996;13-8.
271. Vita JA, Keaney JF, Jr., Raby KE, Morrow JD, Freedman JE, Lynch S, Koulouris SN, Hankin BR, Frei B. Low plasma ascorbic acid independently predicts the presence of an unstable coronary syndrome. *J Am.Coll.Cardiol.* 1998;980-6.
272. Vessby J, Basu S, Mohsen R, Berne C, Vessby B. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *J Intern.Med* 2002;69-76.
273. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992;607-14.
274. Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 2000;496-503.
275. Way KJ, Katai N, King GL. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med* 2001;945-59.

276. Ishii H, Koya D, King GL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol.Med* 1998;21-31.
277. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998;859-66.
278. Di Mario U, Pugliese G. 15th Golgi lecture: from hyperglycaemia to the dysregulation of vascular remodelling in diabetes. *Diabetologia* 2001;674-92.
279. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 1996;728-31.
280. Wakasaki H, Koya D, Schoen FJ, Jirousek MR, Ways DK, Hoit BD, Walsh RA, King GL. Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;9320-5.
281. Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Pickard T, Roden R, Bristow MR, Sabbah HN, Mizrahi JL, Gromo G, King GL, Vlahos CJ. Increased protein kinase C activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation* 1999;384-91.
282. Osicka TM, Yu Y, Panagiotopoulos S, Clavant SP, Kiriazis Z, Pike RN, Pratt LM, Russo LM, Kemp BE, Comper WD, Jerums G. Prevention of albuminuria by aminoguanidine or ramipril in streptozotocin-induced diabetic rats is associated with the normalization of glomerular protein kinase C. *Diabetes* 2000;87-93.
283. Pugliese G, Pricci F, Romeo G, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Di Mario U. Autocrine and paracrine mechanisms in the early stages of diabetic nephropathy. *J Endocrinol.Invest* 1999;708-35.
284. Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, McAuley E, Archer DB. Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes* 1998;945-52.
285. Park JY, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, Yamauchi T, Ha SW, Meier M, Rhodes CJ, King GL. Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes* 2000;1239-48.
286. Pricci F, Pugliese G, Mene P, Romeo G, Romano G, Galli G, Casini A, Rotella CM, DiMario U, Pugliese F. Regulatory role of eicosanoids in extracellular matrix overproduction induced by long-term exposure to high glucose in cultured rat mesangial cells. *Diabetologia* 1996;1055-62.
287. Williams B, Schrier RW. Glucose-induced protein kinase C activity regulates arachidonic acid release and eicosanoid production by cultured glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1993;2889-96.
288. Maiello M, Boeri D, Podesta F, Cagliero E, Vichi M, Odetti P, Adezati L, Lorenzi M. Increased expression of tissue plasminogen activator and its inhibitor and reduced fibrinolytic potential of human endothelial cells cultured in elevated glucose. *Diabetes* 1992;1009-15.
289. Morigi M, Angioletti S, Imberti B, Donadelli R, Micheletti G, Figliuzzi M, Remuzzi A, Zoja C, Remuzzi G. Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF-kB-dependent fashion. *J Clin Invest* 1998;1905-15.

290. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, . Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *The New England Journal of Medicine* 1994;1480-7.
291. Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1995;9:13-7.
292. Gilbert RE, Rumble JR, Cao Z, Cox AJ, van Eeden P, Allen TJ, Kelly DJ, Cooper ME. Endothelin receptor antagonism ameliorates mast cell infiltration, vascular hypertrophy, and epidermal growth factor expression in experimental diabetes. *Circ.Res.* 2000;158-65.
293. Inaba T, Ishibashi S, Gotoda T, Kawamura M, Morino N, Nojima Y, Kawakami M, Yazaki Y, Yamada N. Enhanced expression of platelet-derived growth factor-beta receptor by high glucose. Involvement of platelet-derived growth factor in diabetic angiopathy. *Diabetes* 1996;50:7-12.
294. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu.Rev Biochem.* 1998;75:3-91.
295. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England Journal of Medicine* 2000;343:50-8.
296. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: an overview. *Kidney Int.Suppl* 1995;S19-S23.
297. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994;341:7.
298. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, . Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;352:9.
299. Schlick AH, Taylor AJ, Zuo W, Qiu CB, Dong G, Woodward RN, Agah R, Roberts AB, Virmani R, Dichek DA. Overexpression of transforming growth factor beta1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:83-8.
300. Grainger DJ, Metcalfe JC. A pivotal role for TGF-beta in atherogenesis? *Biol.Rev Camb.Philos.Soc.* 1995;70:96.
301. Metcalfe JC, Grainger DJ. TGF-beta: implications for human vascular disease. *J Hum.Hypertens.* 1995;9:679.
302. McCaffrey TA, Du B, Consigli S, Szabo P, Bray PJ, Hartner L, Weksler BB, Sanborn TA, Bergman G, Bush HL, Jr. Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest* 1997;100:2182-8.
303. Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Vascular cell apoptosis: cell type-specific modulation by transforming growth factor-beta1 in endothelial cells versus smooth muscle cells. *Circulation* 1999;100:2019-26.
304. Kanzaki T, Tamura K, Takahashi K, Saito Y, Akikusa B, Oohashi H, Kasayuki N, Ueda M, Morisaki N. In vivo effect of TGF- beta 1. Enhanced intimal thickening by administration of TGF- beta 1 in rabbit arteries injured with a balloon catheter. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1995;15:1951-7.

305. Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Bottinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 1996;991-1003.
306. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;2572-6.
307. Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN. High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF-beta. *Kidney Int.* 1992;647-56.
308. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1994;536-42.
309. Ziyadeh FN, Han DC, Cohen JA, Guo J, Cohen MP. Glycated albumin stimulates fibronectin gene expression in glomerular mesangial cells: involvement of the transforming growth factor-beta system. *Kidney Int.* 1998;631-8.
310. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 1997;115-26.
311. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998;160-9.
312. Wolf G, Ziyadeh FN. The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: emphasis on nonhemodynamic mechanisms. *Am.J Kidney Dis.* 1997;153-63.
313. Nakamura T, Ebihara I, Fukui M, Tomino Y, Koide H. Effect of a specific endothelin receptor A antagonist on mRNA levels for extracellular matrix components and growth factors in diabetic glomeruli. *Diabetes* 1995;895-9.
314. Studer RK, Negrete H, Craven PA, DeRubertis FR. Protein kinase C signals thromboxane induced increases in fibronectin synthesis and TGF-beta bioactivity in mesangial cells. *Kidney Int.* 1995;422-30.
315. Humes HD, Nakamura T, Cieslinski DA, Miller D, Emmons RV, Border WA. Role of proteoglycans and cytoskeleton in the effects of TGF-beta 1 on renal proximal tubule cells. *Kidney Int.* 1993;575-84.
316. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA. Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta 1. *Kidney Int.* 1992;1213-21.
317. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int.* 1992;557-9.
318. Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massague J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol.Chem.* 1989;380-8.

319. Ziyadeh FN, Sharma K. Role of transforming growth factor-beta in diabetic glomerulosclerosis and renal hypertrophy. *Kidney Int.Suppl* 1995;S34-S36.
320. Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, Kouahou M, Han DC, Kalluri R, Mundel P, Chen S. Effects of high glucose and TGF-beta1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int.* 2002;901-13.
321. Mogyrosi A, Kapoor A, Isono M, Kapoor S, Sharma K, Ziyadeh FN. Utility of serum and urinary transforming growth factor-beta levels as markers of diabetic nephropathy. *Nephron* 2000;234-5.
322. Arteaga CL, Hurd SD, Winnier AR, Johnson MD, Fendly BM, Forbes JT. Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest* 1993;2569-76.
323. Han DC, Hoffman BB, Hong SW, Guo J, Ziyadeh FN. Therapy with antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice. *Am.J Physiol Renal Physiol* 2000;F628-F634.
324. Hill C, Flyvbjerg A, Gronbaek H, Petrik J, Hill DJ, Thomas CR, Sheppard MC, Logan A. The renal expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in acute and chronic experimental diabetes in rats. *Endocrinology* 2000;1196-208.
325. Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagaoka I, Tomino Y, Koide H. mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 1993;450-6.
326. Sharma K, Ziyadeh FN. Renal hypertrophy is associated with upregulation of TGF-beta 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. *Am.J Physiol* 1994;F1094-01.
327. Fukui M, Nakamura T, Ebihara I, Shirato I, Tomino Y, Koide H. ECM gene expression and its modulation by insulin in diabetic rats. *Diabetes* 1992;1520-7.
328. Hong SW, Isono M, Chen S, Iglesias-de la Cruz MC, Han DC, Ziyadeh FN. Increased glomerular and tubular expression of transforming growth factor-beta1, its type II receptor, and activation of the Smad signaling pathway in the db/db mouse. *Am.J Pathol.* 2001;1653-63.
329. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-de la Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;8015-20.
330. Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993;1814-8.
331. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, Border WA. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int.* 1996;461-9.

332. Iwano M, Kubo A, Nishino T, Sato H, Nishioka H, Akai Y, Kurioka H, Fujii Y, Kanauchi M, Shiiki H, Dohi K. Quantification of glomerular TGF-beta 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1996;1120-6.
333. Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, McGowan TA, Kapoor S, Kurnik BR, Kurnik PB, Weisberg LS. Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997;854-9.
334. Sharma K, Eltayeb BO, McGowan TA, Dunn SR, Alzahabi B, Rohde R, Ziyadeh FN, Lewis EJ. Captopril-induced reduction of serum levels of transforming growth factor-beta1 correlates with long-term renoprotection in insulin-dependent diabetic patients. *Am.J Kidney Dis.* 1999;818-23.
335. Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Abrahamian H, Fuller JH, Stehouwer CD. Circulating and urinary transforming growth factor beta1, Amadori albumin, and complications of type 1 diabetes: the EURODIAB prospective complications study. *Diabetes Care* 2002;2320-7.
336. Belghith M, Bluestone JA, Barriot S, Megret J, Bach JF, Chatenoud L. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat.Med* 2003;1202-8.
337. Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;10878-83.
338. Kretowski A, Maciej K, Ida K. The analysis of in vitro transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) production by peripheral blood in overt and pre-clinical type 1 diabetes mellitus. *Immunol.Lett.* 2000;85-9.
339. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu.Rev Immunol.* 1998;137-61.
340. Czarniecki CW, Chiu HH, Wong GH, McCabe SM, Palladino MA. Transforming growth factor-beta 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J Immunol.* 1988;4217-23.
341. Kehrl JH, Thevenin C, Rieckmann P, Fauci AS. Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. *J Immunol.* 1991;4016-23.
342. Morikawa M, Harada N, Nunomura Y, Koike T, Hashimoto S, Soma G, Yoshida T. Fc gamma receptor-mediated biological activities of human leukemic cell lines and their modulation by transforming growth factor-beta 1 and interleukin 6. *Cytokine* 1993;255-63.
343. Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol.* 1986;3855-60.
344. Moses HL. TGF-beta regulation of epithelial cell proliferation. *Mol.Reprod.Dev.* 1992;179-84.

345. Zhang X, Giangreco L, Broome HE, Dargan CM, Swain SL. Control of CD4 effector fate: transforming growth factor beta 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. *J Exp.Med* 1995;699-709.
346. Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol.Today* 1997;61-4.
347. Bridoux F, Badou A, Saoudi A, Bernard I, Druet E, Pasquier R, Druet P, Pelletier L. Transforming growth factor beta (TGF-beta)-dependent inhibition of T helper cell 2 (Th2)-induced autoimmunity by self-major histocompatibility complex (MHC) class II-specific, regulatory CD4(+) T cell lines. *J Exp.Med* 1997;1769-75.
348. Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp.Med* 1996;2669-74.
349. King C, Davies J, Mueller R, Lee MS, Krahl T, Yeung B, O'Connor E, Sarvetnick N. TGF-beta1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype. *Immunity*. 1998;601-13.
350. Azar ST, Salti I, Zantout MS, Major S. Alterations in plasma transforming growth factor beta in normoalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol.Metab* 2000;4680-2.
351. De Caterina R, Cipollone F, Filardo FP, Zimarino M, Bernini W, Lazzerini G, Bucciarelli T, Falco A, Marchesani P, Muraro R, Mezzetti A, Ciabattoni G. Low-density lipoprotein level reduction by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A inhibitor simvastatin is accompanied by a related reduction of F2-isoprostane formation in hypercholesterolemic subjects: no further effect of vitamin E. *Circulation* 2002;2543-9.
352. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 2003;2882-7.
353. Jain SK, McVie R. Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes in vitro and in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 1999;1850-5.
354. Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, Ahmad S. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol.Metab* 2001;3257-65.
355. Davi G, Chiarelli F, Santilli F, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, Basili S, Ciabattoni G, Patrono C. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation* 2003;3199-203.
356. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;927-32.
357. Rabinovitch A, Suarez WL, Thomas PD, Strynadka K, Simpson I. Cytotoxic effects of cytokines on rat islets: evidence for involvement of free radicals and lipid peroxidation. *Diabetologia* 1992;409-13.



358. Falcone M, Sarvetnick N. The effect of local production of cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Immunol.* 1999;2-9.
359. Luo X, Yang H, Kim IS, Saint-Hilaire F, Thomas DA, De BP, Ozkaynak E, Muthukumar T, Hancock WW, Crystal RG, Suthanthiran M. Systemic transforming growth factor-beta1 gene therapy induces Foxp3+ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice. *Transplantation* 2005;1091-6.
360. Piccirillo CA, Chang Y, Prud'homme GJ. TGF-beta1 somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 1998;3950-6.
361. Flyvbjerg A. Putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease. *Diabetologia* 2000;1205-23.
362. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *The New England Journal of Medicine* 1995;1198-203.