

Revisiones

AMADORI PRODUCTS AS MEDIATORS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN DIABETES MELLITUS

Vascular complications are the main cause of morbidity and mortality in diabetes mellitus. Endothelial dysfunction is the first link in the chain of physiopathological mechanisms leading to diabetic vasculopathy, both in large blood vessels (macroangiopathy) and small vessels (microangiopathy). Endothelial dysfunction (reduction in endothelial-dependent vasodilator response with or without an increase in vasoconstrictor responses) is associated with the maintenance of sustained hyperglycemia and an increase in oxidative stress in diabetes. Several mechanisms that might increase levels of reactive oxygen species and produce alterations in endothelial function have been studied. In this context, it has been proposed that hyperglycemia *per se* is able to produce this effect. However, most researchers suggest that the sustained increase in plasma glucose levels modifies different enzyme pathways, which in turn cause an increase oxidative stress and eventually endothelial dysfunction. Thus, enzymes such as aldose-reductase, protein kinase-C, and poly(ADP-ribose) polymerase, as well as endothelin receptors, among other mechanisms, have been implicated. In addition, non-enzymatic mechanisms, such as protein glycosylation, as a source of reactive oxygen species, with special attention paid to glycosylation end products, the so-called advanced glycosylation end products, have been proposed. However, for several years our group has maintained the hypothesis that early and intermediate glycosylation products (Amadori products) are able to release reactive oxygen species and may play an important role in the development of endothelial dysfunction and, eventually, diabetic vasculopathy.

Key words: Diabetes mellitus. Endothelial dysfunction. Glycosylated proteins. Reactive oxygen species.

Los productos de Amadori como mediadores de disfunción endotelial en la diabetes mellitus

C.F. SÁNCHEZ^a, C. PEIRÓ^a Y L. RODRÍGUEZ^b

^aDepartamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. ^bUnidad de Investigación y Servicio de Geriatría. Hospital Universitario de Getafe. Getafe. Madrid. España.

Las complicaciones vasculares son la primera causa de morbilidad y mortalidad en la diabetes mellitus. La disfunción endotelial es el primer eslabón en la cadena de mecanismos fisiopatológicos que conducen a la vasculopatía diabética, tanto en vasos de conductancia (macroangiopatía) como de resistencia (microangiopatía). La disfunción endotelial (la reducción de las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio, con o sin aumento de las respuestas vasoconstrictoras) es un fenómeno que se asocia con el mantenimiento de hiperglucemias sostenidas y el incremento del estrés oxidativo de la diabetes. Se han estudiado múltiples mecanismos que pueden aumentar los valores de especies reactivas de oxígeno y producir alteraciones de la función endotelial. En este sentido, se ha propuesto que la propia hiperglucemia *per se* es capaz de producir este efecto. Sin embargo, la mayor parte de los investigadores manifiesta que el aumento sostenido de los valores plasmáticos de glucosa modifica diferentes vías enzimáticas que, a su vez, originan un incremento del estrés oxidativo y eventualmente disfunción endotelial. Así, se han implicado enzimas como la aldosa-reductasa, la proteíncinasa C, la polimerasa poli(ADP-riboza), así como los receptores de endotelina, entre otros mecanismos. También se han propuesto mecanismos no enzimáticos, como la glucosilación de proteínas, como fuente de especies reactivas de oxígeno, con especial atención a los productos finales del proceso de glucosilación, los denominados productos terminales de glucosilación avanzada. Sin embargo, nuestro grupo mantiene desde hace años la hipótesis de que los productos tempranos e intermedios del proceso de glucosilación proteínica (los productos de Amadori) son capaces de liberar especies reactivas de oxígeno y pueden tener un papel relevante en el desarrollo de la disfunción endotelial y, eventualmente, de la vasculopatía diabética.

Palabras clave: Diabetes mellitus. Disfunción endotelial. Proteínas glucosiladas. Especies reactivas de oxígeno.

INTRODUCCIÓN

La función del endotelio vascular en situaciones normales y patológicas es un área de investigación cardiovascular que se ha desarrollado mucho en los últimos 20 años. Su importancia no sólo abarca desde aspectos cuantitativos (el endotelio equivale a la masa de 5 corazones o a la extensión de 6 campos de tenis para un

Correspondencia: Dr. C.F. Sánchez Ferrer.
Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.
Arzobispo Morcillo, 4. 28029 Madrid. España.

Manuscrito recibido el 6-10-2003; aceptado para su publicación el 12-11-2003.

varón de 70 kg) sino cualitativos, ya que es reconociendo como un auténtico órgano de regulación autocrina, paracrína y endocrina. La fisiología y la fisiopatología del sistema vascular es actualmente incomprensible si no se considera esta porción luminal de la capa íntima de los vasos. Su privilegiada situación en la circulación, así como su capacidad para detectar cambios mecánicos, humorales y químicos, y realizar ajustes compensadores en el tono vascular o en la estructura de los vasos mediante la producción de sustancias biológicamente activas, hace del endotelio un elemento clave en la regulación de la homeostasis cardiovascular. Actualmente, es un hecho bien establecido la existencia de una disfunción de las respuestas dependientes del endotelio en diferentes enfermedades que cursan, en algún momento de su evolución, con manifestaciones vasculares: la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la diabetes mellitus (DM) o la insuficiencia cardíaca. Esta disfunción también puede observarse en situaciones que, aunque fisiológicas, predisponen a la experimentación de cuadros vasculares; tal es el caso del envejecimiento o de la menopausia. Respecto a la DM, el trabajo inicial de Fortes et al¹ destacó por primera vez, en 1983, la existencia de alteraciones en las respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio, en vasos procedentes de animales diabéticos; desde entonces, son múltiples los estudios que han confirmado tales hallazgos, tanto en modelos animales como en pacientes diabéticos.

Las alteraciones vasculares que aparecen en el curso de la DM se han dividido habitualmente en microangiopatía (afección de la microcirculación de la retina y los pequeños vasos renales) y macroangiopatía (indistinguible de la aterosclerosis, excepto por su localización preferente en determinados lechos vasculares y la frecuente calcificación de la media arterial). No obstante, cada vez existen mayores evidencias de que ambos cuadros no son sino manifestaciones de un mismo proceso, en cuyo inicio predominarían las alteraciones funcionales, estrechamente ligadas a hiperglucemia o a fenómenos estrictamente relacionados con ésta. Estas alteraciones funcionales se pondrían de manifiesto con más facilidad en la microcirculación y serían potencialmente reversibles con el control de la glucemia. En fases más avanzadas de la enfermedad, la persistencia de estas alteraciones vasculares funcionales, junto con la aparición de otras manifestaciones de la enfermedad (especialmente las alteraciones del metabolismo lipídico y de las plaquetas) llevaría a la aparición de alteraciones estructurales rápidamente irreversibles y en las que el control de la glucemia sólo sería un factor más que considerar. Estas manifestaciones estructurales se expresarían fundamentalmente en los grandes vasos y mucho menos en la microcirculación, donde se sabe que no se desarrolla aterosclerosis. En este contexto, el endotelio vascular parece ser el "intermediario" por anonomasia en la aparición de las alteraciones funcionales iniciales y de las lesiones estructurales tardías, y promueve el desarrollo de las

complicaciones que componen las manifestaciones vasculares a largo plazo de la DM.

ALTERACIONES DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA DIABETES MELLITUS

Los estudios experimentales muestran de manera prácticamente unánime la existencia de disfunción endotelial en la diabetes mellitus. Este hallazgo se ha repetido con múltiples abordajes experimentales, en diferentes modelos de enfermedad, en distintos lechos y territorios vasculares, *in vitro* e *in vivo* y, finalmente, también en pacientes con diabetes mellitus. En diabetes experimentales se ha encontrado una disminución de las respuestas relajadoras dependientes del endotelio a diferentes sustancias vasodilatadoras, como la acetilcolina, la histamina, la bradicinina, el adenosindifosfato (ADP) y la trombina, todas ellas agonistas de receptores endoteliales, tanto en vasos de resistencia como de conductancia, incluyendo aquellos de gran relevancia fisiopatológica, como el lecho mesentérico y la microcirculación coronaria, renal y cerebral. Las alteraciones de la relajación dependiente del endotelio mediadas por receptor se han observado no sólo en diferentes animales y lechos vasculares, sino también en distintos modelos de DM (inducida por aloxano o estreptozocina, ratas Bio-Breeding-BB, etc.).

Resultados similares se han observado en pacientes. Los primeros estudios en este sentido se remontan a finales de los años ochenta y a principios de los noventa. Así, Sáenz de Tejada et al² demostraron *in vitro* una alteración en la relajación inducida por acetilcolina en el cuerpo cavernoso de pacientes diabéticos que presentaban impotencia. Sin embargo, la relajación inducida por nitroprusiato sódico, que es independiente del NO endotelial, permanecía indemne. Para los estudios con pacientes *in vivo* se utiliza la pletismografía por oclusión venosa, que posibilita el análisis del flujo arterial en humanos y su variación ante la infusión intraarterial de fármacos vasoactivos. Se ha recurrido a esta técnica para evaluar las respuestas dependientes del endotelio, y se ha confirmado la presencia de alteraciones funcionales en pacientes con DM tipo 1. En efecto, Calver et al³ observaron una menor reducción del flujo arterial basal en pacientes con diabetes tras la administración intraarterial de L-NMMA, lo que sugiere una menor participación del NO en el mantenimiento del tono arterial. Cabe destacar que estos autores, a diferencia de lo hallado *in vitro* por Sáenz de Tejada et al², encuentran una menor respuesta vasodilatadora a nitroprusiato sódico en sus sujetos diabéticos, lo que plantea la posibilidad de que el mecanismo efector del NO en la célula muscular lisa esté deteriorado en la diabetes. Por su parte, Johnstone et al⁴ comprobaron una menor respuesta a metacolina en pacientes diabéticos frente a controles, y las respuestas a nitroprusiato fueron similares en ambos grupos. Finalmente, McVeigh et al⁵ demostraron también que el de-

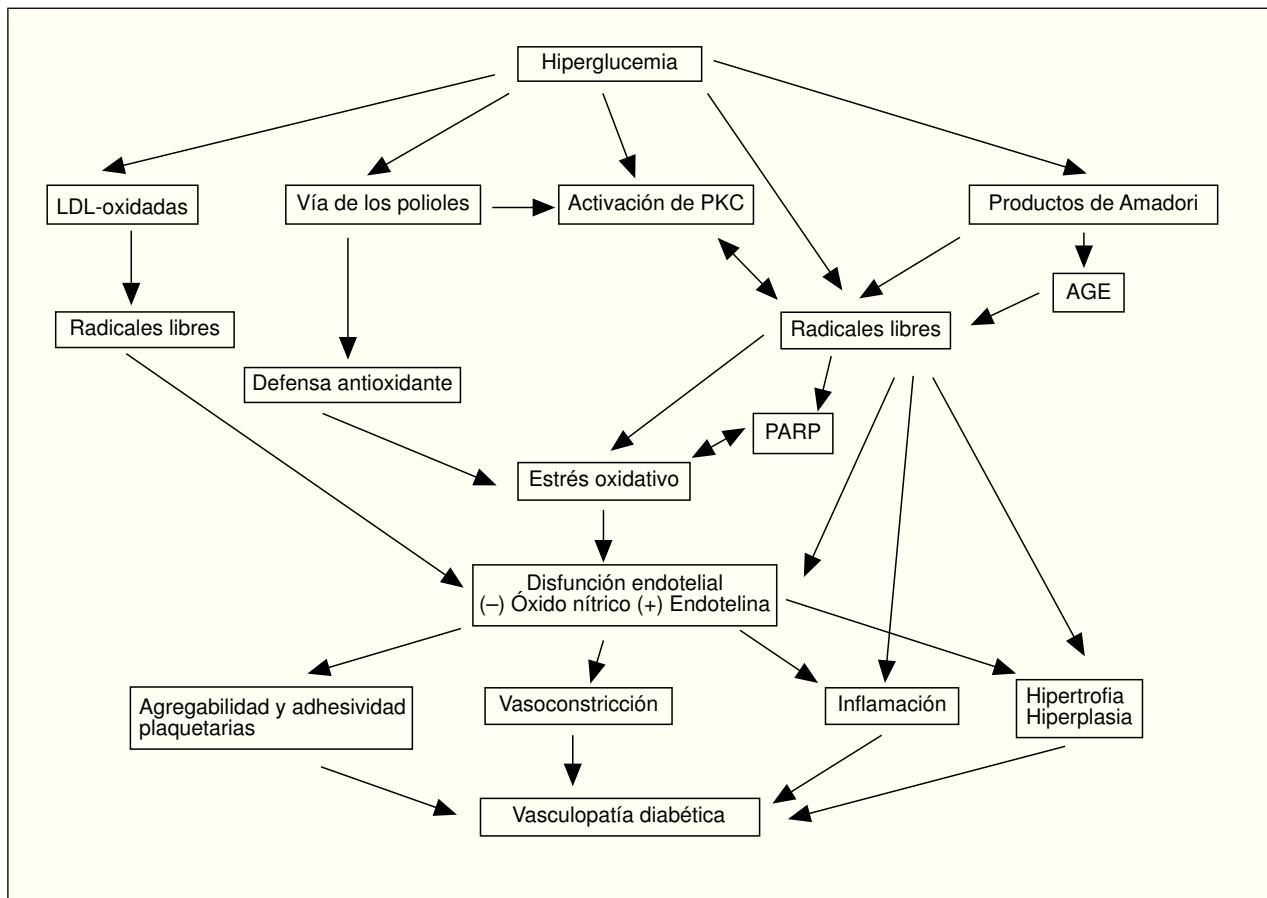


Fig. 1. Esquema de algunos factores potencialmente implicados en la disfunción endotelial diabética. AGE: productos de glucosilación avanzada; LDL: lipoproteínas de baja densidad; PARP: polimerasa poli(ADP-ribosa); PKC: proteíncinasa C.

terioro de la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina y la nitroglicerina se observa, asimismo, en sujetos con diabetes tipo 2.

Mecanismos implicados en la disfunción endotelial diabética

Aunque la hiperglucemia es el factor esencial en la producción de la disfunción vascular, no parece estar directamente implicada en la génesis de las alteraciones que se asocian al desarrollo de la enfermedad vascular. Parece, más bien, que la hiperglucemia produce una serie de alteraciones metabólicas y bioquímicas que, al actuar sobre la pared vascular, originan anomalías en la función y la estructura del vaso. En los párrafos siguientes se resumen los principales mecanismos que se han implicado en el desarrollo de la alteración vascular asociada a la DM, y que de un modo u otro están relacionados con la hiperglucemia (fig. 1).

Vía del sorbitol

Durante la hiperglucemia, una parte de la glucosa intracelular es reducida a sorbitol por acción de la aldosa-reductasa, y el NADPH se utiliza como cofac-

tor⁶. La glucosa es metabolizada por esta vía en los tejidos que no necesitan insulina para que la glucosa se incorpore a las células, como es el caso del tejido vascular, donde la glucosa accede por gradiente de concentración a través de un transportador que no requiere de insulina para ejercer su efecto. A continuación, el sorbitol se oxida a fructosa por la enzima sorbitol deshidrogenasa, pero este paso metabólico tiene una cinética más lenta, de modo que en la hiperglucemia no es capaz de impedir el aumento intracelular de la concentración de sorbitol. El incremento de actividad de la vía del sorbitol comporta diversos efectos. El primero de ellos es la disminución de los valores de NADPH, con lo que disminuye tanto la capacidad de defensa de la célula ante el estrés oxidativo como la producción de NO, al ser el NADPH un cofactor necesario para la NO sintetasa (NOS). También se produce un aumento de la relación NADH/NAD⁺, que incrementa los valores de triosa fosfato (agentes de glucosilación muy reactivos), así como de diacilglicerol (DAG) y la proteíncinasa C (PKC). Por el contrario, disminuye la síntesis y el transporte del mioinositol.

No está claro el papel que desempeña la vía del sorbitol en la producción de daño endotelial en la diabe-

tes. El tratamiento con inhibidores de la aldosa reductasa (sorbinil, tolrestat, ponalrestat) recupera las respuestas dependientes del endotelio en vasos sometidos a alta concentración de glucosa o procedentes de animales diabéticos. Sin embargo, no se observa un efecto importante del tratamiento con inhibidores de la aldosa reductasa sobre la función endotelial en ratas diabéticas, y varios estudios clínicos ponen de manifiesto que el tratamiento con inhibidores de la aldosa reductasa no es efectivo sobre la neuropatía o la retinopatía⁶.

Activación de la proteíncinasa

La activación sostenida de la PKC por la hiperglucemia puede producirse por varios mecanismos, además de la ya mencionada vía de los sorbitoles. De hecho, en presencia de valores elevados de glucosa se observa un aumento en la síntesis *de novo* de ácido fosfatídico (a partir de gliceraldehído 3 fosfato, un metabolito de la glucólisis). Mediante la formación de fosfoinositol y la posterior acción de la fosfolipasa C, se incrementa la producción de DAG y la consiguiente activación de la PKC⁷. Parece, también, que la activación de la PKC puede estar relacionada con la glucosilación no enzimática de proteínas que se comenta más adelante⁸. Por otra parte, existen diferentes isoformas de la PKC, algunas de las cuales pueden estar implicadas en la disfunción endotelial diabética. De hecho, se han obtenido buenos resultados en la prevención de las complicaciones microvasculares y neuropáticas de modelos animales de diabetes con inhibidores selectivos de la isoforma α_2 de la PKC, por lo que se están diseñando ensayos clínicos para confirmar estos efectos en pacientes diabéticos^{7,8}. Sin embargo, pese al considerable interés de esta línea de investigación, no se debe olvidar algunas posibles limitaciones que pueden condicionar su desarrollo. En primer lugar, la activación de PKC es una vía de señalización intracelular de gran ubicuidad, de manera que la probabilidad de que el uso sistémico de inhibidores de la misma produzca efectos adversos es bastante alta, aun cuando se empleen fármacos muy selectivos por las respectivas isoformas. En segundo lugar, es posible que la isoforma de PKC activada en cada caso por la hiperglucemia varíe dependiendo del tipo celular; por ejemplo, en músculo liso vascular se activa preferentemente la isoforma β , mientras que en células endoteliales parece ser más relevante el papel de la isoforma α ^{7,8}.

Activación de la polimerasa poli(ADP-ribosa)

La polimerasa poli(ADP-ribosa) (PARP) es una enzima nuclear abundante en las células eucarióticas, que parece estar implicada en la respuesta a las agresiones en el ADN. Así, las lesiones celulares inducidas por oxidación debida a radicales libres suponen la activación de esta enzima. Cuando se rompe una cadena de ADN, la enzima PARP inicia la transferencia de unidades ADP-ribosa desde el NAD⁺ hasta las proteínas nucleares, en un proceso que consume energía. El resul-

tado final de este proceso es una deplección del NAD⁺ intracelular, así como de los depósitos de adenosintrifosfato (ATP), lo que a su vez reduce la tasa de glucólisis y la respiración mitocondrial y altera las funciones celulares. En ratas con diabetes inducida por estreptozocina, se ha observado una activación de PARP en la pared vascular, así como en cultivos de endotelio sometidos a elevados valores de glucosa⁹. Además, la disfunción endotelial de los animales diabéticos puede prevenirse mediante el tratamiento con un inhibidor de la enzima PARP, lo que sugiere su participación en el desarrollo de la vasculopatía diabética⁹.

Endotelina

La familia de las endotelinas (ET) consiste en 3 péptidos de 21 aminoácidos denominados ET-1, ET-2 y ET-3, cuyas acciones biológicas están determinadas por 2 tipos de receptores acoplados a proteínas G, designados como ET_A y ET_B. Los receptores ET_A tienen mayor afinidad por los péptidos ET-1 y ET-2, mientras que el receptor ET_B se une con igual afinidad por las 3 isoformas de endotelina. La ET-1 liberada por el endotelio puede actuar de forma autocrina sobre receptores ET_B de la propia célula endotelial y favorecer la secreción de NO y, por tanto, induce vasodilatación. Sin embargo, su efecto principal se ejerce sobre el músculo liso vascular subyacente, a través de receptores ET_A y ET_B, y produce vasoconstricción y mitogenia. El papel fisiológico de la endotelina no está claramente establecido, aunque se ha propuesto que está implicada en distintas enfermedades cardiovasculares, como hipertensión, arteriosclerosis o enfermedad coronaria. Hasta la fecha, los estudios experimentales indican una clara relación entre la existencia de vasculopatía diabética y la detección de valores elevados de endotelina. A su vez, los inhibidores de los receptores ET_A y ET_B parecen tener efecto beneficioso en algunas de las complicaciones asociadas a la diabetes, como nefropatía y neuropatía. No obstante, se carece de datos que permitan extrapolar estas hipótesis a pacientes¹⁰.

Radicales libres

Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón desapareado, lo que confiere una gran reactividad a estas especies químicas. Pueden formarse por transferencia de electrones, que es el mecanismo más común, o por procesos denominados de fisión homolítica y heterolítica. En los organismos vivos los radicales libres más importantes son los derivados del oxígeno. La reducción de éste por la transferencia de un electrón produce el anión superóxido, mientras que la transferencia de 2 electrones al oxígeno da lugar al peróxido de hidrógeno, que a su vez es la fuente del tercero de los radicales libres de interés prioritario en biología, el radical hidroxilo, que es el más reactivo y dañino de los radicales libres del oxígeno.

Los radicales libres se han implicado tanto en la génesis de la DM como en la producción de las

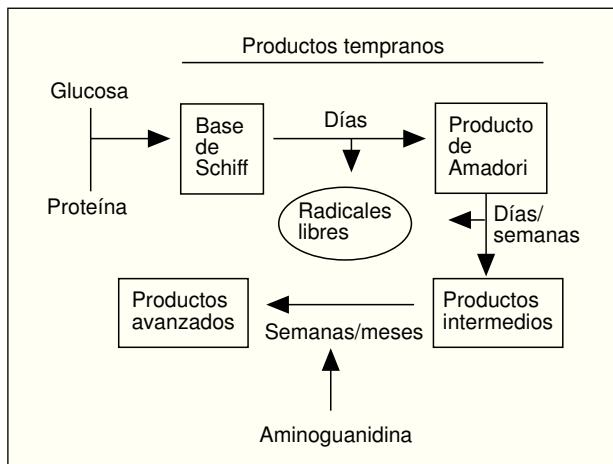


Fig. 2. Relación temporal de los productos generados durante las reacciones de Maillard.

complicaciones vasculares de ésta. En este sentido, se ha observado un incremento en la producción de radicales libres en la DM, así como una disminución en los sistemas de barreiros de radicales libres en tejidos diabéticos, incluyendo los microvasos y la aorta, lo que condiciona a su vez una mayor susceptibilidad a dichos radicales¹¹. Los radicales libres ejercen un efecto inhibidor sobre las relajaciones mediadas por NO, al que inactivan. Además, también pueden interferir con la producción de prostaciclina, probablemente a través de la inhibición de la prostaglandina sintetasa.

El anión superóxido es el principal radical libre implicado, que ejerce su efecto a través de la inactivación del NO. Así, se ha podido comprobar que la enzima superóxido dismutasa (SOD), que inactiva el anión superóxido, mejora las relajaciones dependientes de endotelio en vasos de animales diabéticos. También hay datos que sugieren la participación de otros radicales libres, ya que la catalasa (que promueve el catabolismo del radical peróxido), el manitol (un barredor de radicales hidroxilo), la dimetiltiourea (otro barredor de radicales hidroxilo) y la deferoxamina (un quelante del hierro) pueden mejorar total o parcialmente la disfunción endotelial diabética¹¹. El papel de los radicales libres en el daño vascular diabético no sólo se ha observado en modelos animales. En estudios pleismográficos realizados en sujetos con diabetes, la coinfiltración de un antioxidante como ácido ascórbico y un agonista muscarínico induce una mejoría en la respuesta vascular¹². Actualmente, cobra cuerpo la hipótesis de que el estrés oxidativo es un mediador común a todos los mecanismos propuestos capaces de inducir disfunción endotelial diabética, bien como desencadenante de la alteración de procesos bioquímicos, bien como resultado de éstos y causante directo del daño celular¹³.

Glucosilación no enzimática de proteínas

La glucosilación no enzimática (glucación) de las proteínas ha adquirido una gran importancia en el estudio de las complicaciones a largo plazo de la DM. Consiste en un conjunto de reacciones que comienzan con la condensación entre un hidrato de carbono y grupos amino libres de las proteínas. Posteriormente tienen lugar nuevas reacciones de condensación, hidrólisis, deshidratación, reordenación y polimerización que dan lugar a unos productos finales de carácter fluorescente. El conjunto de estas reacciones se denomina *reacciones de Maillard* (fig. 2). La fase inicial de unión entre un azúcar y una proteína da lugar primero a una base de Schiff y luego a un producto de Amadori. Esta fase se considera reversible y depende exclusivamente de la concentración de glucosa en el medio y del tiempo de permanencia de dicha concentración. *In vivo*, la acumulación de las bases de Schiff y los productos de Amadori alcanza el equilibrio en un período de horas (bases de Schiff) y semanas (producto de Amadori). Algunos ejemplos de productos de Amadori son la hemoglobina glucosilada, la albúmina glucosilada, las lipoproteínas glucosiladas o el factor de Von Willebrand glucosilado, como proteínas circulantes, o el colágeno glucosilado como proteína estructural.

En las proteínas de vida media más larga, los procesos de glucosilación no se detienen en los productos de Amadori, sino que éstos dan lugar a productos intermedios y más adelante a los denominados productos finales de la glucosilación avanzada (*advanced glycosylation end products* [AGE]). Los AGE tardan meses en formarse y son de carácter irreversible. Conviene destacar que en varias secuencias de las reacciones de Maillard se liberan radicales libres (radical superóxido). La glucosilación no enzimática es estimulada por el oxígeno y por catalizadores de reacciones de oxidación, tales como metales de transición (hierro y cobre). Además, los AGE favorecen también la autooxidación de las proteínas de vida media larga. Todo ello confirma una estrecha relación entre la glucosilación no enzimática de proteínas y el estrés oxidativo (la denominada glucooxidación o glucosilación autooxidativa), así como la posibilidad de que conjuntamente expliquen algunos aspectos de la patogenia de la vasculopatía diabética¹⁴.

En muestras de tejidos obtenidos de sujetos diabéticos se ha encontrado un aumento de los AGE respecto a sujetos controles, lo que hace pensar en su papel como agente patológico. Estos AGE no sólo se acumulan en tejidos, sino que también sus concentraciones plasmáticas son mayores en pacientes diabéticos. Los AGE podrían causar su efecto por varios mecanismos distintos. En la matriz extracelular producen alteraciones estructurales en sus proteínas, disminuyen las uniones entre el heparán-sulfato y el colágeno, y aumentan el entrecruzamiento (*cross-linking*) de colágeno. Además, interactúan con un receptor específico

(RAGE), localizado en las células musculares lisas, el hígado, el endotelio, los macrófagos, los monocitos y el mesangio, e inducen la liberación de factores procoagulantes (factor de necrosis tumoral [TNF], interleucina [IL] 1, IGF-I). Los AGE pueden formarse intracelularmente causando cambios en el ADN o alterando proteínas. Además, se ha descrito que los AGE aumentan el estrés oxidativo, inactivan el NO endotelial e interfieren con las respuestas dilatadoras dependientes del endotelio¹⁴.

La glucosilación proteína hasta la aparición de AGE es un proceso que puede ser interferido por medio de fármacos. La aminoguanidina es un agente que, entre otras distintas acciones, es capaz de inhibir la formación de AGE. Los efectos de la aminoguanidina sobre las complicaciones diabéticas se han investigado en la retina, el nervio, el riñón y los vasos, sin resultados definitivos hasta el momento. Su empleo puede reducir la incidencia de complicaciones vasculares asociadas a diabetes en modelos animales, si bien todavía no hay resultados de su utilización en pacientes. En experimentos realizados en nuestro laboratorio, el estudio de la función endotelial en vasos procedentes de ratas diabéticas tratadas con aminoguanidina mejora sólo parcialmente¹⁵. Cuando los vasos de los animales tratados con aminoguanidina se preincuban, además, con SOD, la recuperación de la respuesta vasodilatadora es completa, lo que sugiere que una parte de la disfunción endotelial diabética puede estar mediada por una acumulación de AGE en la pared vascular, pero existe otra parte que está mediada por otros mecanismos en los que participan los radicales superóxido¹⁵. En este sentido, sin descartar el posible papel de los productos avanzados de glucosilación, nosotros mantenemos la hipótesis, complementaria o alternativa, de que los productos tempranos o intermedios de glucosilación, como los productos de Amadori, pueden tener un papel tan relevante como el de los AGE o incluso mayor.

En apoyo de nuestra propuesta, disponemos de datos experimentales que nos permiten apoyar nuestra propuesta. En primer lugar, hemos demostrado que un producto de Amadori, como la oxihemoglobina glucosilada, es decir, un producto relativamente temprano de glucosilación proteína, interfiere con la función endotelial a concentraciones nanomolares, es decir, en cantidades que se encuentran libres en plasma en condiciones fisiológicas¹⁶⁻¹⁸. Cabe destacar que este efecto sólo se observa en porcentajes de glucosilación patológicos, pero no en porcentajes normales. Además, a estas bajas concentraciones, la oxihemoglobina no glucosilada carece de efecto significativo sobre las dilataciones dependientes de endotelio¹⁶. Los efectos de la oxihemoglobina glucosilada se deben a su capacidad para generar aniones superóxido, que a su vez destruyen el NO liberado por el endotelio. Este hecho se pone de manifiesto porque el NO exógeno en solución es inactivado de manera análoga por la oxihemoglobina glucosilada; este efecto es revertido en todos

los casos con SOD¹⁷. Estos estudios, realizados inicialmente en vasos de conductancia (aorta) y microvasos de resistencia (mesentéricos) obtenidos de ratas controles no diabéticas^{16,17}, se han confirmado en microvasos mesentéricos de origen humano procedentes de pacientes no diabéticos y sin enfermedad cardiovascular¹⁸. Asimismo, otros investigadores han demostrado que la hemoglobina glucosilada también interfiere con la relajación dependiente de NO en el cuerpo cavernoso de la rata, lo que sugiere una posible participación de los productos de Amadori en la disfunción eréctil asociada a la diabetes¹⁹.

La interferencia con la función endotelial no se limita a la hemoglobina, sino que otras proteínas solubles, como la albúmina²⁰, o estructurales, como el colágeno²¹, pueden probablemente ejercer un efecto similar cuando están glucosiladas. Además, hay trabajos que sugieren que la albúmina glucosilada puede modificar la actividad y la expresión de la sintasa de NO en células endoteliales, aunque los datos son contradictorios; así, la albúmina glucosilada como producto de Amadori incrementa la actividad y la expresión de la enzima²², mientras que los AGE de albúmina la reducen²³.

Los distintos experimentos realizados en nuestro laboratorio con modelos experimentales de DM (ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, es decir, de tipo 1) han corroborado hasta el momento la hipótesis original. Tanto *in vivo* como *in vitro*, la disfunción endotelial observada en los animales diabéticos se debe a un aumento del estrés oxidativo y se correlaciona estrechamente con los valores de glucosilación de la hemoglobina (HbA_{1c}), lo que indica que, además de constituir un marcador del control metabólico de la enfermedad, esta proteína glucosilada puede tener un papel causal en las anomalías de la función endotelial^{15,24,25}.

En etapas tempranas tras la inducción de diabetes, las anomalías vasculares observadas son reversibles con un tratamiento adecuado con insulina. No obstante, la recuperación de la función endotelial no se produce de forma inmediata tras la normalización de la glucemia, sino que requiere 2 o 3 semanas de normoglucemia¹⁵. Este hecho es importante, ya que éste es el periodo necesario para que se descienda significativamente el porcentaje de HbA_{1c} en sangre hasta alcanzar valores normales (en torno al 5%), aunque durante dicho periodo los valores plasmáticos de AGE permanecen elevados. Por otro lado, existe un alto grado de correlación entre la presencia de disfunción endotelial en este modelo de diabetes y el porcentaje de HbA_{1c} , mientras que su correlación es baja con los valores plasmáticos de AGE y con la glucemia¹⁵. En conclusión, estos datos sugieren claramente que la aparición o la reversión de la disfunción endotelial diabética está estrechamente relacionada con el aumento o la disminución de los valores de hemoglobina glucosilada, es decir, de productos de Amadori, mientras que su relación con otros parámetros es mucho menos evi-

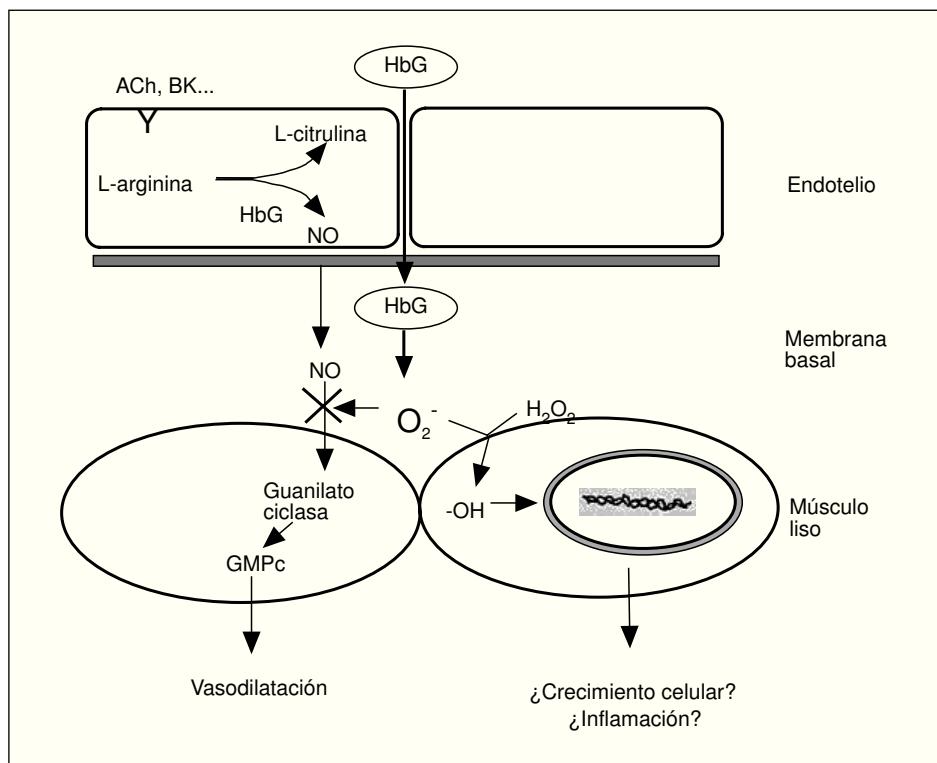


Fig. 3. Mecanismos de interferencia entre un producto de Amadori, como la hemoglobina glucosilada (HbG), y el óxido nítrico (NO). ACh: acetilcolina; BK: bradicinina; GMPc: guanosinmonofosfato cíclico; O_2^- : anión superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno.

dente. En cualquier caso, no podemos descartar de manera definitiva que los AGE (probablemente AGE tisulares en mayor grado que plasmáticos) tengan un papel como inductores de daño vascular en modelos crónicos de diabetes o en pacientes con enfermedad de larga evolución. Proponemos, sin embargo, que productos mucho más tempranos en el proceso de glucosilación (productos de Amadori como la hemoglobina glucosilada) pueden tener una participación muy relevante en el desencadenamiento de las complicaciones vasculares asociadas a la DM¹⁵ (fig. 3).

La recuperación de la disfunción endotelial diabética, al menos en modelos experimentales, también puede conseguirse mediante tratamientos con agentes antioxidantes. La menor relajación observada en vasos de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina puede prevenirse mediante el tratamiento de los animales con ácido ascórbico y curiosamente con un antidiabético oral con propiedades antioxidantes como la gliclacida²⁶. Dado que las sulfonilureas no tiene efecto metabólico alguno en este modelo de diabetes, que es totalmente dependiente de la insulina, es razonable concluir que los efectos de la gliclacida sobre la función endotelial son enteramente debidos a sus propiedades antioxidantes, lo que se corrobora por su capacidad de producir efectos similares en experimentos *in vitro*^{26,27}. Asimismo, los tratamientos capaces de reducir la hiperglucemia en este modelo experimental de diabetes también se acompañan de menor disfunción endotelial²⁸.

La hipótesis mantenida por nuestro grupo de investigación sobre el papel fisiopatológico de los productos de Amadori en la vasculopatía diabética se ha basado fundamentalmente en datos *in vitro* u obtenidos de modelos experimentales de la enfermedad. No obstante, hemos realizado, asimismo, estudios sobre funcionalidad endotelial en pacientes diabéticos, mediante la técnica de pletismografía por oclusión venosa del antebrazo, en los que la extrapolación de dicha hipótesis a humanos es perfectamente factible²⁹. En efecto, los pacientes diabéticos de corta evolución, cuya selección permite descartar otras causas de disfunción endotelial, presentan alteraciones en las relajaciones dependientes de NO estrechamente relacionadas con el grado de control metabólico, expresado en función de sus niveles de HbA_{1c}. Las anomalías de la función endotelial observadas sólo en los pacientes mal controlados están mediadas por un aumento del estrés oxidativo y se recuperan tras un adecuado tratamiento insulínico que normalice el control metabólico de los pacientes, en un proceso que se correlaciona estrechamente con los valores plasmáticos de productos de Amadori²⁹. En definitiva, todos nuestros datos indican que los productos tempranos en intermedios de glucosilación proteínica deben tenerse en cuenta como causantes de estrés oxidativo y disfunción endotelial diabética. En apoyo de esta idea, existen datos clínicos sobre el incremento del estrés oxidativo observado en estadios tempranos de pacientes infantiles o adolescentes con diabetes tipo 1³⁰.

Otros posibles efectos patológicos mediados por la glucosilación no enzimática de proteínas

Además de lo expuesto hasta ahora, nuestro laboratorio ha obtenido datos adicionales que sugieren que el papel de los productos de Amadori puede no estar limitado a las alteraciones de carácter funcional, como la interferencia con las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio, sino que pueden también participar en las alteraciones estructurales que aparecen en la vasculopatía diabética, concretamente en el desarrollo de hipertrofia vascular que se ha descrito tanto en pacientes como en modelos experimentales^{31,32}. Estudios realizados en cultivos de células de músculo liso vascular obtenidas de ratas no diabéticas, mediante técnicas de análisis de imagen por ordenador, han permitido demostrar que la oxihemoglobina glucosilada induce hipertrofia celular sin modificar la tasa de proliferación celular³³. Este efecto hipertrófico se puede observar a concentraciones nanomolares y no se da al tratar los cultivos celulares con concentraciones similares de hemoglobina no glucosilada. La hipertrofia de la célula muscular lisa inducida por hemoglobina glucosilada está mediada por la liberación de especies reactivas de oxígeno, en particular aniones superóxido y radicales hidroxilo, ya que se puede contrarrestar mediante la utilización de compuestos barreductores de dichas especies como superóxido dismutasa o dimetiltiourea³³. Estudios análogos realizados en cultivos de músculo liso vascular de origen humano, obtenidos de pacientes sanos desde el punto de vista cardiovascular, ofrecen similares resultados sobre el crecimiento celular³⁴. Además, demuestran que los productos de Amadori estimulan, en estas células, la actividad de distintos factores de transcripción, como AP-1 y NFκB. Este hecho es interesante, ya que se conoce que la activación de AP-1 está efectivamente relacionada con el crecimiento celular, también demostrado, mientras que NFκB es un factor de transcripción pleiotrópico que estimula la expresión de genes que codifican distintas citocinas proinflamatorias y quimiotácticas, junto con enzimas inflamatorias, moléculas de adhesión y receptores, todos ellos involucrados en la inflamación vascular descrita en estadios tempranos de aterosclerosis³⁴. En definitiva, todo parece indicar que el proceso de glucosilación no enzimática de proteínas, y concretamente los productos tempranos en intermedios de este proceso, tiene un papel relevante como activador de los mecanismos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de vasculopatía diabética.

BIBLIOGRAFÍA

- Fortes ZB, Leme JG, Scivoletto R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1983;79:771-81.
- Saénz de Tejada I, Goldstein I, Azadzoi K, Krane R, Cohen RA. Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med* 1989;320:537-44.
- Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1992;90:2548-54.
- Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco J A, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993;88:2510-6.
- McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath IT, Henry WR. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992;35:771-6.
- Yabe-Nishimura C. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol Rev* 1998;50:21-31.
- Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isoform-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* 2001;44:659-73.
- DiMario U, Pugliese G. 15th Golgi lecture: from hyperglycaemia to the dysregulation of vascular remodelling in diabetes. *Diabetologia* 2001;44:674-92.
- García-Soriano F, Virág L, Jagtap P, Szabó E, Mabley JB, Liaudet L, et al. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Med* 2001;7:108-13.
- Hopfner RL, Gopalakrishnan V. Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. *Diabetologia* 1999;42:1383-94.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-67.
- Ting HH, Timimi FK, Boles K, Creager S, Ganz P, Creager MA. Vitamin C acutely improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1995;92(Suppl 1):1747.
- De Vries ASD, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000;130:963-74.
- Vlassara H. Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes* 1997;46(Suppl 2);S19-S25.
- Rodríguez-Mañas L, Angulo J, Vallejo S, Peiró C, Sánchez-Ferrer A, Cercas E, et al. Early and intermediate Amadori glycosylation adducts, oxidative stress, and endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rat vasculature. *Diabetologia* 2003;46:556-66.
- Rodríguez-Mañas L, Arribas S, Girón C, Villamor J, Sánchez-Ferrer CF, Marín J. Interference of glycosylated human hemoglobin with endothelium-dependent responses. *Circulation* 1993;88:2111-6.
- Angulo J, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C, Marín J, Rodríguez-Mañas L. Impairment of endothelium-dependent relaxation by increasing percentages of glycosylated human hemoglobin. Possible mechanisms involved. *Hypertension* 1996;28:583-92.
- Vallejo S, Angulo J, Peiró C, Nevado J, Sánchez-Ferrer A, Petidier R, et al. Highly glycated oxyhaemoglobin impairs nitric oxide relaxations in human mesenteric microvessels. *Diabetologia* 2000;43:83-90.
- Cartledge JJ, Eardley I, Morrison JFB. Impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation by glycosylated haemoglobin. *BJU Int* 2000;85:735-41.
- Schalkwijk CG, Ligtvoet N, Twaalfhoven H, Jager A, Blaauwgeers HGT, Schlingeman RO, et al. Amadori albumin in type 1 diabetic patients. Correlation with markers of endothelial function, association with diabetic nephropathy, and localization in retinal capillaries. *Diabetes* 1999;48:2446-53.
- Monnier VM, Bautista O, Kenny D, Sell DR, Fogarty J, Dahms W, et al. Skin collagen glycation, glycoxidation, and crosslink-

Sánchez CF, et al. Los productos de Amadori como mediadores de disfunción endotelial en la diabetes mellitus

- king are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of Type 1 diabetes. Relevance of glycated collagen products versus HbA_{1c} as markers of diabetic complications. *Diabetes* 1999;48:870-80.
22. Amore A, Cirina P, Mitola S, Peruzzi L, Gianoglio B, Rabbone I, et al. Nonenzymatically glycated albumin (Amadori adducts) enhances nitric oxide synthase activity and gene expression in endothelial cells. *Kidney Int* 1996;51:27-35.
23. Rojas A, Romay S, González D, Herrera B, Delgado R, Otero K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products. *Circ Res* 2000;86:e50-e4.
24. Rodríguez-Mañas L, Angulo J, Peiró C, Llergo JL, Sánchez-Ferrer A, López-Dóriga P, et al. Endothelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1998;123:1495-502.
25. Angulo J, Rodríguez-Mañas L, Peiró C, Neira M, Marín J, Sánchez-Ferrer CF. Impairment of nitric oxide-mediated relaxations in anaesthetized autoperfused streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1998;358:529-37.
26. Vallejo S, Angulo J, Peiró C, Sánchez-Ferrer A, Cercas E, Llergo JL, et al. Prevention of endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by gliclazide treatment. *J Diabetes Complicat* 2000;14:224-33.
27. Vallejo S, Angulo J, Peiró C, Sánchez-Ferrer A, Cercas E, Nevado J, et al. Correction of glycosylated oxyhaemoglobin-induced impairment of endothelium-dependent vasodilatation by gliclazide. *J Diabetes Complicat* 2000;14:207-14.
28. Vallejo S, Angulo J, Peiró C, Cercas E, Sánchez-Ferrer A, Nevado J, et al. Treatment with acarbose may improve endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:255-62.
29. Rodríguez-Mañas L, López-Dóriga P, Petidier R, Neira M, Solís J, Pavón I, et al. Effect of glycaemic control on the vascular nitric oxide system in patients with type 1 diabetes. *J Hypertens* 2003;21:1137-43.
30. Domínguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 1998;21:1736-42.
31. Sowers JR, Epstein M. Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease, and nephropathy. An update. *Hypertension* 1995;26:869-79.
32. Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S, et al. Vascular hypertrophy in experimental diabetes. Role of advanced glycation end products. *J Clin Invest* 1997;99:1016-27.
33. Peiró C, Angulo J, Rodríguez-Mañas L, Llergo JL, Vallejo S, Cercas E, et al. Vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by glycosylated human oxyhaemoglobin. *Br J Pharmacol* 1998;125:637-44.
34. Peiró C, Matesanz N, Nevado J, Lafuente N, Cercas E, Azcutia V, et al. Glycosylated human oxyhaemoglobin activates nuclear factor-kB and activator protein-1 in cultured human aortic smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2003;160:681-90