

Gaceta Médica de México

Volumen **140**
Volume

Número **4**
Number

Julio-Agosto **2004**
July-August

Artículo:

Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Academia Nacional de Medicina de México, A.C.

**Otras secciones de
este sitio:**

-  **Índice de este número**
-  **Más revistas**
-  **Búsqueda**

***Others sections in
this web site:***

-  ***Contents of this number***
-  ***More journals***
-  ***Search***



Medigraphic.com

Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica

Margarita Díaz-Flores,* Luis Arturo Baiza-Gutman,** Miguel Ángel Ibáñez-Hernández,**
Dalila Pascoe-Lira,* Alberto M. Guzmán-Greenfel,**** Jesús Kumate-Rodríguez*

Recepción versión modificada: 7 de enero de 2004

aceptación: 5 de marzo de 2004

Resumen

El propósito de este trabajo es dar a conocer las bases moleculares de la fisiopatología de la diabetes mellitus, con el fin de prevenir la enfermedad o mejorar el tratamiento. La diabetes mellitus es una enfermedad compleja, donde la hiperglucemia crónica provoca complicaciones en distintos órganos. En esta condición aumentan las especies reactivas de oxígeno como resultado de su autooxidación, por lo que su metabolismo propicia la acumulación de metabolitos como la fructosa, el sorbitol y las triosas fosfato. Éstos últimos generan α -oxoaldehídos reactivos con alta capacidad de unirse a proteínas y generar estrés oxidativo. Además, hay aumento de la síntesis de diacilglicerol a partir de las triosas fosfato, las cuales activan a la proteína cinasa C. Por otra parte, la alteración de la proporción normal entre los nucleótidos de niacinamida reducidos con respecto a los oxidados conduce a una baja eficiencia de los sistemas antioxidantes. Finalmente, estas desregulaciones metabólicas causan alteración en la transducción de la señal, en la expresión anormal de genes, además de daño tisular, lo que propicia complicaciones en los pacientes con diabetes.

Palabras clave: diabetes mellitus, AGES, estrés oxidativo, sorbitol, diacilglicerol, proteína cinasa C, hexosaminas, complicaciones crónicas.

Summary

The knowledge of the molecular basis of diabetes mellitus physiopathology will allow improvements in treatment or prevention of the disease.

Diabetes mellitus is a complex disease in which hyperglycemia leads to complications in several organs. In this condition, there is increase in reactive oxygen species (ROS) as a result of glucose autooxidation; its metabolism produces accumulation of metabolites such as fructose, sorbitol, and triose phosphate. The latter generates α oxoaldehydes with high capacity to produce protein glycation and oxidative stress. Moreover, there is an increase in synthesis of diacylglycerol from triose phosphate, which activates protein kinase C.

On the other hand, alteration of normal ratio between reduced and oxidized niacinamide nucleotides leads to low efficiency of antioxidative systems. Finally, this metabolic dysregulation causes altered signal transduction, abnormal gene expression, and tissue damage, resulting in development of diabetic complications.

Key word: Diabetes mellitus, AGES, oxidative stress, sorbitol, diacylglycerol, protein kinase C, hexosamines, chronic complications.

*Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Laboratorio en Biología del desarrollo, Unidad de Morfología FES-IZTACALA, UNAM. *Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Bioquímica. Instituto Politécnico Nacional.

****Investigación Biomédica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Margarita Díaz-Flores. Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Coordinación de Investigación en Salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720 México, D.F. Tel. 5513 4846. E-mail: mardiaz2001@yahoo.com

Introducción

En la actualidad, la diabetes mellitus (DM) plantea un grave problema mundial de salud pública, debido a que ha aumentado su incidencia y prevalencia, en particular en los países en vías de desarrollo o de reciente industrialización. En México, el registro realizado por la Encuesta Nacional de Salud 2000¹ estimó que existen alrededor de 3.6 millones de mexicanos mayores de 20 años que padecen DM; con prevalencia de 7.5%, ligeramente mayor en las mujeres que en los hombres a partir de los 50 años. En 1980 ocupó el noveno lugar como causa de muerte, para colocarse a finales de los 90, en el tercero y primer lugar en el grupo de 55 a 64 años. Estas alarmantes cifras se asocian a un cambio en la alimentación y disminución de la actividad física cotidiana.

El término de DM describe diferentes trastornos metabólicos que resultan de alteraciones en la secreción de insulina, en la respuesta periférica a la misma o en ambas; lo que conduce a un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica y alteraciones del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos. Hasta el momento se han descrito por lo menos cuatro variedades de la enfermedad,² pero la gran mayoría de los casos corresponde a dos clases principales: la DM tipo 1 y la tipo 2. En la primera, la característica más relevante es la destrucción de las células β del páncreas, de manera que la producción de insulina es nula o insignificante. En la segunda, el rasgo principal es la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina.³ como resultado de alteraciones en los eventos bioquímicos posteriores a la unión de la hormona con su receptor, y en casos menos frecuentes a alteraciones en el receptor. La DM tipo 2 es la más frecuente en la población mexicana, al igual que en la población mundial.

Uno de los aspectos aún no resueltos de la DM, a pesar de la vasta información disponible, es el origen de las complicaciones crónicas en órganos y sistemas sensibles afectados por la hiperglucemia. Los mecanismos de la fisiopatogenia propuestos son diversos, tal vez porque derivan del análisis de distintos puntos de vista de un mecanismo patogénico común, o bien, existen mecanismos específicos del tipo de tejido. Se considera que el principal factor de riesgo es la hiperglucemia crónica, por ello las primeras complicaciones crónicas de la DM son el resultado de las reacciones químicas y de la activación o alteración del metabolismo causado por el exceso de glucosa. Se ha postulado que la hiperglucemia puede causar complicaciones micro y macrovasculares asociadas a la diabetes mediante cinco mecanismos principales;^{4,5} acumulación y acción de productos de glicación avanzada,⁶⁻⁸ incremento en la actividad de la vía del sorbitol,⁹ aumento en la vía de las hexosaminas,¹⁰ activación de diversas isoformas de la proteína cinasa C,¹¹ y

aumento en el estrés oxidativo.^{12,13} Cada uno de estos mecanismos moleculares merece especial atención y será tratado en esta revisión. Además, se enfatizará en las principales alteraciones metabólicas que se originan de ellos, todo encaminado a explicar parte de las causas de las complicaciones crónicas de la enfermedad y su clasificación, continuando con el análisis de los mecanismos mencionados.

Fisiopatología de la diabetes mellitus

Las manifestaciones clínicas de la DM son variadas y en muchas ocasiones inespecíficas, aunque la mayoría de los signos y de los síntomas están relacionados con la hiperglucemia sostenida o con la resistencia a la insulina. Las primeras manifestaciones de la diabetes tipo 2 tienden a aparecer durante la edad adulta, después de la tercera década de la vida, y son mucho más discretas que las que se presentan en la tipo 1; de hecho, un alto porcentaje de pacientes son asintomáticos y tan sólo exhiben altas concentraciones de glucosa en el plasma.

Las complicaciones en los pacientes con diabetes pueden ser agudas o crónicas. Es poco frecuente que la primera manifestación sea un cuadro agudo de descompensación (cetoacidosis o coma hiperosmolar). Al paciente diabético se le identifica cuando manifiesta alguna complicación crónica de la enfermedad, como la neuropatía diabética. En la actualidad las complicaciones agudas han dejado de ser causa de muerte, por lo que el enfermo con DM tipo 2 tiene una vida más larga, pero debe enfrentarse a las complicaciones crónicas de la enfermedad. Estas complicaciones, dependiendo de si afectan los vasos capilares sanguíneos, pequeños o de mayor calibre, se clasifican en micro y macrovasculares, respectivamente. Las primeras se relacionan principalmente con daño al endotelio y músculo liso de microvasculatura y se manifiesta como nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética. Este tipo de complicaciones emerge por influencias genéticas sobre las cuales se yuxtaponen trastornos metabólicos y hemodinámicos, que tiene como característica anatómica el engrosamiento de las membranas bases de los vasos capilares, lo que posteriormente conduce a angiopatía oclusiva, hipoxia y daño del tejido. El aumento de estas complicaciones se correlaciona en la mayoría de los casos con la severidad y duración de la hiperglucemia crónica. Por ejemplo, niveles posprandiales de glucosa superiores a 11 mM, se asocian frecuentemente con las complicaciones renales, de retina y neurológicas, las que se pueden iniciar cinco o diez años después de manifestarse la enfermedad.¹⁴⁻¹⁶

Las complicaciones macrovasculares¹⁷ son las más comunes en la DM tipo 2, incluye a un grupo de trastornos que se caracterizan por aterosclerosis y enfermedad

isquémica del corazón en todas sus modalidades, y son una de las principales causas de muerte en el paciente diabético.

La hiperglucemia ha sido identificada como factor de riesgo autónomo, que causa daño cardíaco y conduce a la cardiomiopatía diabética, independiente de la presencia de enfermedad vascular. A diferencia de las complicaciones microvasculares, la asociación de aterosclerosis con hiperglucemia no es tan congruente. En cambio, la hiperglucemia posprandial y la concentración de insulina en el suero sí predicen el riesgo de enfermedad aterosclerótica.¹⁸ Frecuentemente los factores de riesgo para estas enfermedades (obesidad, hipertensión y dislipidemia), anteceden al diagnóstico de DM hasta por ocho o más años. En comparación con los no diabéticos, el enfermo diabético tiene de dos a cuatro veces más probabilidades de presentar infarto al miocardio, así como otros trastornos asociados con la aterosclerosis.

En gran medida las complicaciones de la diabetes inducida por la hiperglucemia, se originan por cambios químicos y funcionales de las proteínas, alteración en la expresión de los genes y daño del endotelio.¹⁹ Al parecer la disfunción del endotelio es la causa principal de las complicaciones vasculares, porque en este tejido se presenta un desequilibrio en la producción de sustancias vasoactivas, que consiste en la disminución de la producción de vasodilatadores como el óxido nítrico, y en el aumento de la liberación de vasoconstrictores como la endotelina-1 (ET-1). Asimismo, hay aumento en la liberación de factores procoagulantes. En conjunto estas alteraciones pueden explicar, en parte, la mayor incidencia de aterosclerosis e hipertensión en este tipo de pacientes. Pero además, en el endotelio y en otras células se incrementa la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), de proteínas de la matriz extracelular, citocinas y factores del crecimiento [entre los que se encuentran: el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α)]. Lo anterior provoca alteraciones celulares y orgánicas, dependiendo del lugar donde se producen.

Así, la sobreproducción del VEGF en la retina facilita la ruptura de la barrera de permeabilidad vascular, migración de leucocitos, inflamación y la neovascularización patológica, lo que propicia la aparición de la retinopatía diabética proliferativa, una de las causas principales de ceguera en los países industrializados.²⁰

El aumento en la expresión de proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, laminina y colágena tipo IV) y de PAI-1 está involucrado en el engrosamiento de la membrana basal de vasos capilares sanguíneos en glomérulos y retina, y en la expansión de la matriz mesangial en riñón,²¹ responsables en parte de la retinopatía y nefropatía diabéticas. Estas anomalías son

resultado de la acumulación de componentes de matriz extracelular, ya sea por aumento en su producción, por alteraciones en su degradación o por incremento de factores de crecimiento como el TGF β . La disminución en la degradación de la matriz extracelular en el paciente diabético se debe en gran medida a la sobreproducción del PAI-1, el cual inhibe la activación de las metaloproteinasas.²²

Alteraciones metabólicas en la diabetes mellitus

Acumulación y acción de productos de glicación avanzada

Louis-Camille Maillard, en 1912, fue el primero en señalar la importancia de las modificaciones de las proteínas inducidas por carbohidratos en la patología humana.²³ Estas modificaciones son producidas durante la hiperglucemia crónica y son causadas por la interacción de la glucosa y de otros carbohidratos —como la fructosa y la glucosa-6-fosfato o sus derivados— con las proteínas, ácidos nucleicos, y lípidos, para formar productos de glicación avanzada, conocidos como AGE o AGEs⁷ (por sus siglas en inglés, *advanced glycation end products*).

Este proceso, es conocido como glicación y está asociado con el envejecimiento que se acelera con la diabetes, y se inicia con la reacción de los grupos carbonilos de los carbohidratos con los grupos amino de las proteínas, en especial con el amino terminal y el ϵ -amino de residuos de lisina, dando origen a los productos tempranos de glicación, también llamados de Amadori o fructosamina. A partir de ellos y por cambios o transposiciones moleculares y oxidaciones, se forman compuestos α -dicarbonilos (α -oxoaldehídos) como la 3-desoxiglucosona,²⁴ el metilglioxal y el glioxal, los que son conocidos como precursores de los AGEs; éstos son más reactivos que sus predecesores y al combinarse simultáneamente con dos grupos reactivos de las proteínas, forman puentes cruzados entre ellas muy estables; produciendo su agregación, y pérdida en sus funciones biológicas. Las proteínas ricas en aminoácidos básicos (L-lisina y L-arginina) son especialmente susceptibles a la glicación.

La 3-desoxiglucosona se puede formar también directamente por la autooxidación de la glucosa catalizada por metales, en este proceso se produce el radical superóxido, precursor de otras especies reactivas de oxígeno. El metilglioxal y el glioxal derivan principalmente de intermediarios de la glucólisis²⁵ como el gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato, que se acumulan a consecuencia de la hiperglucemia. Las concentraciones de metilglioxal y 3-desoxiglucosona se elevan en el plasma del modelo animal con hiperglucemia y en el paciente diabético.^{26,27} La formación intracelular de AGEs

es más rápida que la extracelular, por lo que se ha propuesto que la alta concentración intracelular de glucosa desencadena la producción de AGEs intra y extracelularmente.²⁸

Diversos estudios han constatado que la formación de los AGEs aumenta en una proporción mayor a la de la glucemia, este hecho sugiere que incluso elevaciones moderadas resultarían en la acumulación substancial de estos productos de glicación avanzada en los pacientes diabéticos. De igual manera, períodos cortos de hiperglucemia, como ocurre con las alteraciones de la tolerancia a la glucosa, pueden ser suficientes para fomentar su formación. Este proceso se encontró en la hemoglobina de los pacientes. No obstante, a partir de los productos de Amadori, la glicación puede proceder independientemente de la glucemia. Estas reacciones son irreversibles y las modificaciones sólo desaparecen con la degradación de la proteína modificada. Los AGEs son compuestos muy variados estructuralmente, entre otros podemos encontrar a la hidroximidazolona, puentes cruzados de bis(lisina)imidazolio, derivados de monolisina (N-ε-carboximetil)-lisina), argipirimidina y pentosidina.

Las proteínas modificadas por los AGEs pueden encontrarse en el plasma, en el compartimiento intracelular y en la matriz extracelular; especialmente en la pared arterial, el mesangio glomerular, las membranas basales glomerulares, los vasos capilares sanguíneos, la vasculatura retiniana, el cristalino, el perineurium y las fibras nerviosas mielínicas y amielínicas. La acumulación de los AGEs ocurre más frecuentemente en proteínas de larga vida. Además se han encontrado AGEs en diversas proteínas, entre ellas la colágena de distintos tipos, las del citoesqueleto, la mielina y las histonas. De esta manera modifican al ensamble del citoesqueleto y a la función reguladora de la matriz extracelular sobre las células.

Los AGEs afectan no sólo por alterar la estructura y función de las proteínas, sino también por su acción con receptores específicos.²⁹ Se han descrito receptores para los AGEs en numerosas células, incluyendo a los monocitos, a los macrófagos, a las células endoteliales, a las células mesangiales, a los pericitos, a los podocitos, a las neuronas periféricas y a la microglía. La lista de las moléculas capaces de ligar a los AGEs incluye a los receptores I y II, al receptor de AGEs (RAGE), a la oligosacaril transferasa (AGE-RI), a la fosfoproteína 80K-H (AGE-R2) y la galectina-3 (AGE-R3). Las proteínas glicadas que se unen a estos receptores inducen diversos eventos como la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), estado proinflamatorio; proliferación de células (como los macrófagos) y las del endotelio y músculo liso arterial; la activación de factores de transcripción como el NFκB; así como la expresión de diversos péptidos y proteínas (incluyendo a factores de crecimiento, citocinas, proteínas de matriz extracelular y PAI-1). En

los macrófagos estimulan la producción de la interleucina-1, el factor de crecimiento-1, el factor de crecimiento tumoral α y el factor estimulante de colonias de granulocitos (IL-1, GF-1, TNF α y GC-SF, respectivamente, por sus siglas en inglés), en tanto en los glomérulos inducen el aumento de la síntesis de la colágeno tipo IV.

La respuesta inducida por la unión de los AGEs a su receptor RAGE es mediada a través de la producción de ERO, que a su vez, activan in vivo e in vitro al factor de transcripción sensible al estado óxido-reductor el NFκB.³⁰ De acuerdo con lo anterior se ha encontrado que las células mononucleares de sangre periférica provenientes de pacientes con mal control de la glucemia o con nefropatía diabética aumenta la activación de este factor,³¹ mientras que el control de la hiperglucemia o el uso de antioxidantes como el ácido α-lipoico disminuye su activación.

Durante algunos años se pensó que los AGEs se formaban solamente en las macromoléculas extracelulares de larga vida; debido a que la velocidad de formación de los AGEs por la glucemia es lenta, y las proteínas intracelulares con una velocidad de recambio de minutos u horas no tendrían tiempo suficiente para acumularse después de ser modificadas. Sin embargo, se ha demostrado *in vivo*,³² que los AGEs aparecen y se pueden acumular en las histonas de los hepatocitos. Resultados análogos se han encontrado en las células β de los islotes de Langerhans, las que comparten con los hepatocitos el mismo transportador de glucosa (GLUT 2) independiente de insulina. Esta glicación intracelular refleja el aumento de metabolitos intermediarios (glucosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato) inducido por la hiperglucemia, que son mucho más reactivos que la glucosa. De esta manera la formación de los AGEs en los ácidos nucleicos puede producir efectos dañinos en la proliferación celular y en la expresión génica. En resumen, la glicación es un fenómeno importante en el desgaste del tejido del paciente diabético.

Incremento en la actividad de la vía del sorbitol

La glucosa intracelular tiene varias alternativas metabólicas dependiendo de los requerimientos de la célula. En los órganos y tejidos que no requieren insulina para la captación de glucosa y en los cuales se presentan principalmente las complicaciones crónicas en condiciones de hiperglucemia (riñón, retina, cristalino, corazón y sistema nervioso central). La ruta preferencial de conversión de la glucosa es la vía del sorbitol, también conocida como la vía de los polioles. En ella, la glucosa es transformada por la acción secuencial de dos enzimas: la aldosa reductasa (AR) y la sorbitol deshidrogenasa (SDH). La primera es la responsable de la reducción irreversible de la glucosa en sorbitol y requiere como

coenzima a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Esta enzima controla la vía, y se activa al estar en contacto con altos niveles de glucosa.³³ Debido a lo anterior aumenta la concentración de sorbitol y disminuye la disponibilidad de NADPH.

La SDH, segunda enzima, cataliza la transformación del sorbitol en fructosa con la concomitante formación de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). Esta reacción es el punto crítico de la vía, con repercusión en las complicaciones diabéticas, tanto por la acumulación de los productos formados (NADH y fructosa), como por su reversibilidad.

A continuación analizaremos las consecuencias de las alteraciones en la concentración de metabolitos causadas por la activación del sorbitol.

Consecuencias del consumo de NADPH

La caída en la concentración de NADPH afecta negativamente la actividad de otras enzimas que también lo requieren, como la óxido nítrico sintasa (NOS), la glutatión reductasa (GR), la catalasa y la NADPH oxidasa. Algunas de ellas participan en los mecanismos antioxidantes; por lo tanto, el agotamiento de NADPH explicaría, en parte, la deficiencia de los sistemas antioxidantes en el paciente diabético como el dependiente del glutatión y de la catalasa.

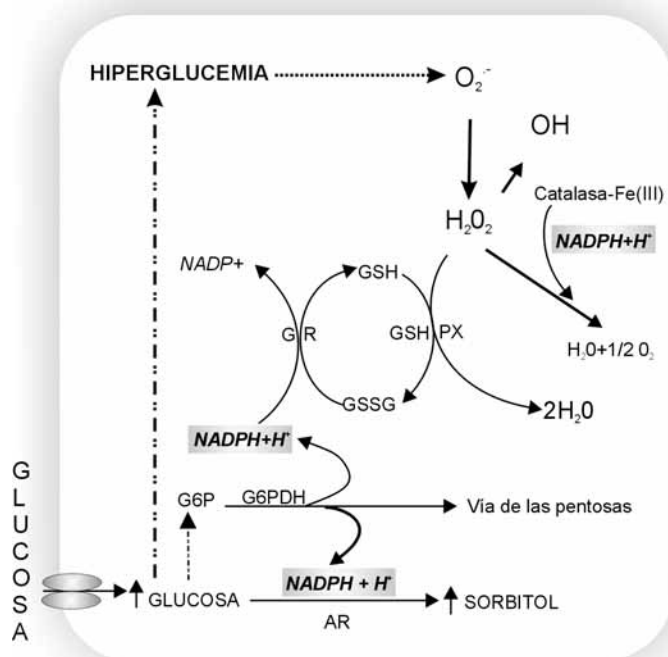


Figura 1. Formación de especies reactivas de oxígeno favorecidos por la hiperglucemia y disminución de los mecanismos antioxidantes por falta de NADPH (NADPH + H⁺).

Para que el glutatión realice su acción como principal antioxidante intracelular en respuesta a especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, radical hidróxilo y peróxidos orgánicos e inorgánicos) es requisito indispensable que mantenga su forma reducida (GSH),³⁴ por acción de la glutatión reductasa, sobre la forma oxidada (GSSG), lo que requiere del consumo de NADPH. Por otra parte, la activación de la catalasa³⁵ también depende de NADPH (Figura 1).

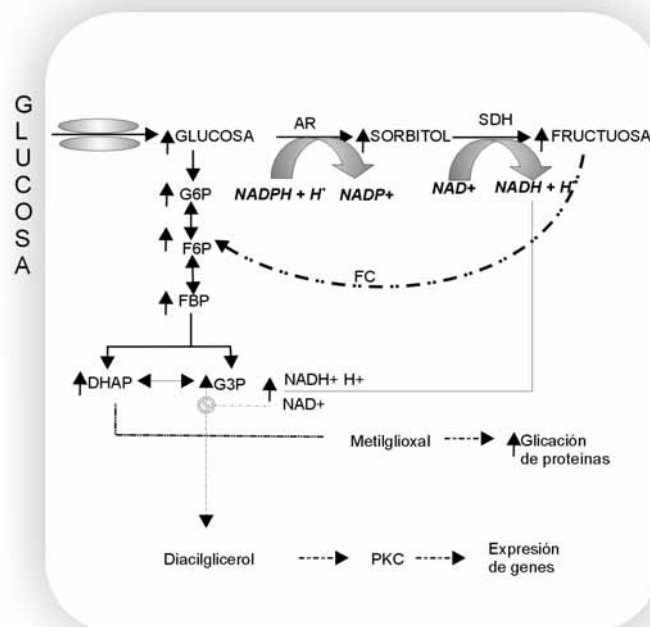


Figura 2. Repercusión del aumento de fructosa en la relación NADH/NAD⁺ y la vía glucolítica. Finalmente serán parte de los sustratos que originen las complicaciones crónicas en la diabetes mellitus.

PKC (proteína cinasa C), FC (fructosa cinasa), G6P (glucosa 6 fosfato), F6P (fructosa 6 fosfato), FBP (fructosa 1,6, bifosfato), G3P (gliceraldehído 3 fosfato), DHAP (dihidroxi acetona fosfato), NADPH (NADPH + H⁺), NADH (NADH + H⁺).

Efectos de la acumulación de la fructosa

La transformación bioquímica de la fructosa que afecta al organismo inicia en la mayoría de los tejidos, excepto en el hígado, con su fosforilación por una hexocinasa específica, dando lugar a la fructosa-6-fosfato que se metaboliza en la ruta glucolítica (Figura 2). De esta manera, la vía de los polioles y la glucólisis se acoplan; como ha sido descrito durante la isquemia y la perfusión del tejido cardiaco, así como de los glomérulos en ratas diabéticas.^{36,37}

La glucólisis es uno de las principales rutas que propicia la oxidación de la glucosa, que convierte una

molécula de azúcar en dos moléculas de piruvato, dos de ATP y dos equivalentes reductores en forma de NADH. Este proceso implica 10 reacciones catalíticas, desde la activación de la glucosa hasta la formación del piruvato. Las cinco primeras constituyen una fase de consumo de energía donde se sintetizan azúcares fosfato a expensas de la conversión de ATP en ADP, y el sustrato se rompe en dos carbohidratos fosforilados de tres carbonos (triosas fosfato). Las cinco últimas reacciones generan energía; porque las triosas-fosfato se convierten en compuestos ricos en ella y donan grupos fosfato para la síntesis de ATP a partir de ADP.

La oxidación del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) catalizada por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) es de las reacciones más importantes de la glucólisis, por que en ella se forma el primer intermediario de alta energía y un par de equivalentes reductores en forma de NADH.

El acoplamiento entre la glucólisis y la vía del sorbitol conduce a diversas alteraciones metabólicas, entre ellas:

- a) Acumulación de intermediarios de la glucólisis, principalmente el G3P y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), ambos altamente reactivos con la capacidad de glicar proteínas y generar estrés oxidativo. Como se mencionó anteriormente originan precursores de productos de glicación avanzada.
- b) Aumento de la relación NADH/NAD⁺. El aumento de esta relación se explica por dos mecanismos: por la actividad de la segunda enzima de la vía del sorbitol (SDH) y el desequilibrio entre la velocidad de oxidación del G3P a 1,3 bis-fosfo-glicerato (1,3BPG) y la velocidad de reducción del piruvato a lactato. La primera reacción produce NADH y la segunda lo consume; sin embargo, durante la hiperglucemia la primera es favorecida.³⁸
- c) Inhibición de la G3PDH. Esta enzima desempeña un papel fundamental en la génesis de las complicaciones diabéticas. Cuando la concentración intracelular de la glucosa es alta su actividad es inhibida, razón por la cual se acumulan las triosas fosfato con las consecuencias descritas. Son múltiples las causas que reducen su actividad entre ellas:
 - Aumento en su degradación debido a la disociación de sus cuatro subunidades, causado por las concentraciones altas de NADH generadas en la vía del sorbitol.³⁹
 - Oxidación de sus grupos tiol (SH) necesarios para su actividad, como consecuencia del estrés oxidativo.⁴⁰
 - Disminución de su expresión debido a la reducción de insulina, hormona que regula la transcripción del gen de la enzima.⁴¹

- La acumulación de aldehídos que inhiben a la enzima.⁴²
- Decremento de NAD⁺ necesario para que actúe.
- Glicación de la enzima.⁴³

De este análisis se puede especular que la G3PDH está involucrada en el estrés oxidativo de las células durante la diabetes.

En el hígado la fosforilación de la fructosa depende de otra enzima, la fructocinasa, la cual la convierte en fructosa-1-fosfato, que cuando es fragmentada por una enzima específica, la aldolasa B da origen a la DHAP y al glicerol. La presencia de la aldolasa B explica la facilidad con que la fructosa administrada por vía oral se convierte en lípidos, ya que sus productos DHAP y glicerol, se transforman en *sn* glicerol-3-fosfato, a partir del cual se sintetizan triacilgliceroles (síntesis de *novo*). La acumulación de triacilgliceroles conduce a la activación de la proteína cinasa C.

Otro compuesto derivado de la fructosa es la fructosa-3-fosfato, la cual se acumula en los cristalinis y eritrocitos de ratas diabéticas. "Este producto cuando se hidroliza produce 3-desoxiglucosona", ambos tienen la propiedad de glicar proteínas.⁴¹ Es evidente que el aumento de la fructosa-3-fosfato y su hidrólisis contribuye a la glicación de proteínas, efecto que depende de la concentración de la 3-desoxiglucosona, de la velocidad de hidrólisis de la fructosa-3-fosfato y de la eficiencia de algún mecanismo de desintoxicación para la 3-desoxiglucosona. La depuración de fructosa-3-fosfato en el cristalino y el eritrocito es a través de 3-desoxifructosa o del ácido 2-ceto-3-desoxiglucónico.

Efectos de la acumulación del sorbitol

Las células animales tienden a mantener su volumen normal, inicialmente acumulando sales de sodio y potasio, posteriormente captando agua. Sin embargo, esta fase de osmorregulación es temporal, debido a que después de un tiempo prolongado las células en general y, en particular, las de la médula renal, necesitan mecanismos adicionales para regular su osmolaridad; por lo que acumulan osmolitos orgánicos que provienen del medio o de la síntesis intracelular. Los solutos orgánicos osmóticamente activos se conocen como *solutos compatibles* o *solutos no perturbadores*. El sorbitol, la glicerofosforilcolina y el inositol (polioles) pertenecen a este grupo de compuestos que tienden a acumularse en una gran variedad de organismos expuestos a un ambiente alto en sales. Si bien, la acumulación de sorbitol puede ser benéfica en la médula renal, éste y otros polioles normalmente no se concentran en otros tejidos y cuando esto ocurre puede producir daño celular. Así, la

acumulación de sorbitol debido a su incapacidad para difundir con facilidad al exterior, conduce a un aumento de estrés osmótico en las células, y esto es especialmente importante para explicar el daño a nivel de cristalino.⁴⁶ Además los estudios realizados en ratas diabéticas han asociado el exceso de sorbitol en los cristalinos con el desarrollo de cataratas.⁴⁷

El estrés osmótico en los cristalinos se origina debido a que la acumulación del sorbitol provoca que la célula se hinche, alterando la permeabilidad de la membrana y promoviendo cambios bioquímicos asociados con la formación de la catarata. Con base en estas observaciones y en estudios de células en cultivo y modelos experimentales, se ha postulado que el estrés osmótico es iniciado por la AR. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que el uso de inhibidores de la AR previenen o retardan significativamente la formación de cataratas.⁴⁸ Sin embargo, la acumulación de sorbitol no es suficiente para explicar el origen de la neuropatía, retinopatía y nefropatía diabéticas, porque la concentración de sorbitol en estos órganos es mucho menor que la observada en los cristalinos, a menos que la acumulación del sorbitol sea muy alta en pequeños compartimientos de estas células.

La inhibición de las dos enzimas de la vía de los polioles podría ser una alternativa terapéutica para el tratamiento de las complicaciones diabéticas. Sin embargo, Tilton y colaboradores⁴⁹ han considerado que podría ser más importante inhibir a la SDH que a la AR, dado que esto evitaría la acumulación de fructosa, de NADH y de metabolitos que favorecen el aumento de productos de glicosilación avanzada relacionados con el estrés oxidativo, la resistencia a la insulina y alteraciones enzimáticas. También proponen que el estrés osmótico ocasionado por el aumento de sorbitol, podría contrarrestarse por la disminución de los desequilibrios redox y metabólico que resultan de la oxidación del sorbitol a fructosa.

Activación de la vía de las hexosaminas

La fructosa vía sorbitol contribuye en la activación de la vía de las hexosaminas, debido a que la formación de la glucosamina-6-fosfato proviene exclusivamente de la fructosa-6-fosfato y la glutamina, mediante una reacción irreversible catalizada por la glutamina: fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA), enzima que regula la vía. La glucosamina-6-fosfato a través de tres reacciones subsecuentes, finalmente da origen a la UDP-N-acetilglucosamina y a la UDP-N-acetilgalactosamina, que se utilizan en la formación de las glicoproteínas y los proteoglicanos. El aumento del flujo a través de esta vía está relacionado con algunos efectos de la diabetes, contribuye en parte a la estimulación de la expresión de genes como los del TGF α , TGF β ¹⁵⁰, y del inhibidor del activador del plasminógeno-

1 (PAI-1).⁵¹ También participa en la inducción de la resistencia a la insulina por lípidos o por hiperglucemia.⁵²

La resistencia de ciertos tejidos a responder a la acción de la insulina es una característica distintiva de ciertas patologías como la DM tipo 2. No obstante que los mecanismos celulares y moleculares responsables de este fenómeno no son del todo entendidos, se ha asociado a la activación de vía de las hexosaminas con el desarrollo de la resistencia a la insulina.⁵³

Mediante el uso de infusiones de glucosamina, se ha podido demostrar que hay una correlación entre los incrementos tanto de la UDP-N-acetilglucosamina como de la actividad de la GFA, y la insuficiencia de la captación de glucosa en los tejidos adiposo y muscular.⁵⁴ Quizá la evidencia más contundente al respecto provenga del modelo transgénico,⁵⁵ ya que cuando se sobreexpresa la enzima GFA, se propicia el aumento de intermediarios de esta vía y disminuye la inducción por la insulina de la traslocación de los transportadores de glucosa (GLUT 4) a la membrana celular.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el mecanismo por el cual la activación de las hexosaminas induce resistencia a la insulina. Una de ellas gira en torno a la glucosamina como responsable de impedir la acción de la insulina, al inhibir la fosforilación y la activación para el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1), proteína de señalización postreceptor de insulina. Otra propuesta más compleja, sugiere que algunas de las proteínas que participan en la acción de la insulina, como los IRS y el transportador GLUT4, pueden ser modificadas a nivel postraduccional⁵⁶ por la adición de la N-acetilglucosamina. Estos residuos de serina y/o treonina requieren de ser fosforilados para que la insulina ejerza su acción; sin embargo, al unirse la N-acetilglucosamina, el proceso de fosforilación no se realiza y con ello la acción de la insulina disminuye. El enlace que se forma entre las proteínas de señalización y la N-acetilglucosamina es del tipo "O"-glicosídico (O-NaGlc). Existen evidencias de que la incorporación de N-acetilglucosamina en residuos de serina y treonina puede afectar varios procesos celulares al inhibir la fosforilación de proteínas en estos residuos.⁵⁷ En apoyo a lo anterior, Patti y colaboradores⁵⁸ observaron que las infusiones de glucosamina producían un aumento de las uniones O-NaGlc en IRS-1 e IRS-2 en músculo esquelético. Es factible que a consecuencia de ello se alteren eventos tempranos en la vía de señalización de la insulina, ya sea en forma global o en sitios específicos, disminuyendo finalmente la fosforilación de IRS y el transporte de glucosa dependiente de la hormona. La glucosaminilación del transportador GLUT4 altera su afinidad a la glucosa, disminuye su actividad y estabilidad, y modifica su distribución celular; lo cual puede conducir a la falla o al desarreglo del sistema de transporte de la glucosa (Figura 3).

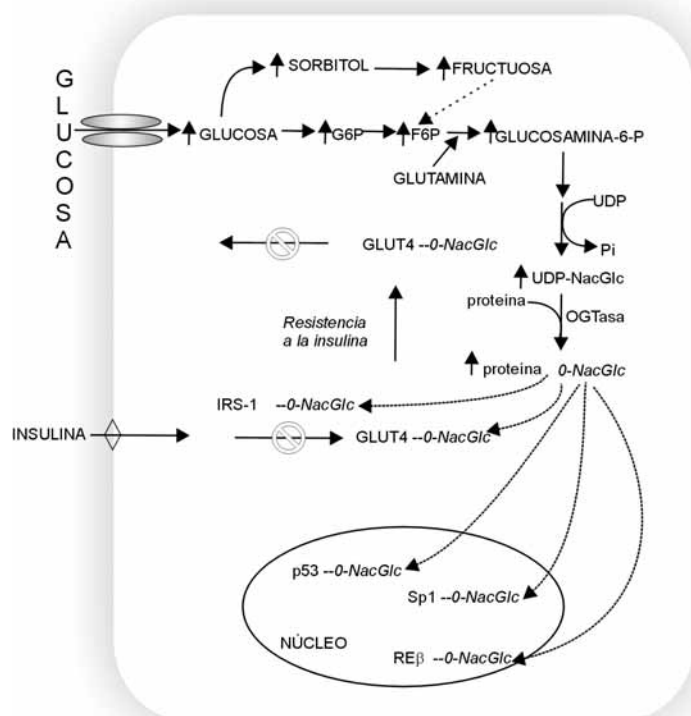


Figura 3. Resistencia a la insulina potenciada por el incremento del flujo de la vía de las hexosaminas. IRS-1 (sustrato del receptor de insulina I), GLUT4 (transportador de glucosa 4), Sp-1 (factor transcripcional), REO (receptor de estrógeno p), p53 (proteína supresora tumoral 53).

Activación de la proteína cinasa C

La acumulación de DHAP y G3P promueve la producción de diacilglicerol (DAG), y la subsecuente activación de la proteína cinasa C (PKC), mismos que también afectan la homeostasis vascular.⁶⁹

La PKC pertenece a la familia de las serinas/treoninas fosfocinasas, y presenta por lo menos 11 isoformas (α , β 1, β 2, γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , λ y μ), codificadas por 10 genes diferentes. Estas proteínas se clasifican en cuatro clases: las convencionales o clásicas (α , β 1, β 2 y γ), las dependientes de Ca^{2+} y fosfolípidos; las nuevas isoformas independientes de Ca^{2+} (ϕ , ϵ , η , θ , μ), las atípicas (ζ y λ) y las independientes de Ca^{2+} y fosfolípidos (μ).

El DAG es un activador natural de la PKC y su producción aumenta en las células del endotelio, la retina y los glomérulos renales durante las complicaciones diabéticas en modelos animales y en el humano.⁶⁰ En células vasculares en cultivo, concentraciones altas de glucosa (22 mM) causan el aumento en el contenido de DAG, alcanzando un máximo al tercer y quinto día de inicio del tratamiento. Además, los niveles elevados de DAG se mantienen de manera crónica en animales diabéticos.

El DAG puede formarse también a partir de fosfoinosítidos por la acción de la fosfolipasa C. Sin embargo, durante la diabetes su aumento es principalmente por la síntesis de novo a partir de intermediarios glucolíticos,⁶¹ en particular de la dehidroxiacetona fosfato. Otros posibles activadores de la PKC son el metilglioxal,⁶² la glucosamina,⁶³ y las ERO.⁶⁴ Todos ellos se generan debido a alteraciones metabólicas que se presentan en la diabetes.

Las alteraciones celulares y funcionales atribuidas a la activación de la PKC son muy variadas, y dependen de la función de esta enzima en los mecanismos de transducción de señales y en su participación en la regulación de la expresión de diversos genes, incluyendo a los de proteínas de matriz extracelular (fibronectina y colágeno tipo IV), del PAI-1 y del TGF β y su receptor.⁶⁵ Su activación induce la expresión de los genes antes señalados en células mesangiales en cultivo o en glomérulos de ratas diabéticas. Además, afecta la producción de sustancias vasoactivas, por una parte deprime la producción de óxido nítrico y por otra estimula la expresión de la ET-1,⁶⁶ lo que conduce a la disminución del flujo sanguíneo de la retina, los nervios periféricos y el riñón, en el modelo de diabetes experimental.

En la retina, el decremento del flujo sanguíneo puede llevar a una hipoxia local, que induce la expresión del VEGF, que a su vez aumenta la permeabilidad del endotelio y la formación de microaneurismas. *In vitro*, la interacción de ET-1 y VEGF incrementa la permeabilidad vascular debido a un desarreglo de la actina F y a un desajuste en las uniones de los endotelios, pudiendo ser esto una posible explicación de la patología ocular.

Se piensa que los genes de las proteínas de matriz extracelular tienen secuencia consenso en su región promotora, la que interactúa con factores transcripcionales modulados por la PKC. Uno de estos factores es el activador de proteínas (AP-1), que media la inducción de la transcripción en respuesta a activadores de la PKC, como son los ésteres de forbol y el DAG, uniéndose a elementos conservados del DNA conocidos como *elementos de respuesta*. Los genes para la fibronectina y la laminina contienen esta secuencia de unión para el AP-1 en su promotor. La activación de la PKC por la hiperglucemia disminuye la degradación de la matriz extracelular al causar la sobreexpresión del inhibidor del PAI-1.

Aumento del estrés oxidativo

Muchos de los cambios metabólicos causados por la hiperglucemia producen estrés oxidativo debido al aumento en la formación de ERO y a la disminución de los sistemas de defensa antioxidantes.^{30,67} En condiciones de hiperglucemia las ERO se generan principalmente durante la autooxidación de la glucosa y en diferentes

reacciones oxidativas que acompañan a la glicación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Existen resultados contradictorios cuando se analizan metabolitos o enzimas antioxidantes, dependiendo de los tejidos o sistemas que se estudien; sin embargo, en general se ha observado un declive en ellos, lo que es consecuencia de la disminución en la disponibilidad del NADPH y del glutatión reducido; así como del daño oxidativo de las enzimas involucradas.

El estrés oxidativo está íntimamente vinculado a la glicación, por lo cual la acción combinada de estos dos procesos se conoce como glucooxidación. Las ERO conducen también a modificaciones estructurales de las proteínas, originando compuestos en ocasiones similares a los productos de glicación. Además, los compuestos resultantes de la lipoperoxidación, como el malondialdehído, se pueden unir a las proteínas y amplificar el daño inducido por la glucooxidación.

La generación de las ERO se encuentra aumentada tanto en la diabetes tipo 1 como en la 2, y en modelos experimentales, aun antes de que las complicaciones diabéticas sean evidentes; por ello, se ha sugerido que el surgimiento de la diabetes, el desarrollo de resistencia a la insulina y de las complicaciones tardías de la diabetes, están estrechamente asociados al estrés oxidativo. Las ERO contribuyen a la resistencia a la insulina, debido a que interfiere con las vías de señalización inducida por esta hormona y evitan la traslocación del transportador de glucosa GLUT 4 a la membrana plasmática. El mecanismo por el que contribuyen a las complicaciones de la diabetes es parcialmente conocido y se piensa que actúan por la modificación oxidativa de macromoléculas y por la activación del factor de transcripción NF κ B.³⁰ lo que conduce a la expresión alterada de genes. En concordancia con esta hipótesis, se ha encontrado que en pacientes diabéticos el empleo de antioxidantes como el ácido lipoico reduce la activación del NF κ B.

Conclusiones

Las complicaciones en los pacientes con diabetes son consecuencia de la hiperglucemia y la resistencia a la insulina, y probablemente la forma en que la primera induce el daño en diversos tejidos u órganos depende de las características metabólicas de los mismos.

Las alteraciones metabólicas inducidas por la hiperglucemia intervienen conjuntamente en el desarrollo de la enfermedad (Figura 4), por lo que es difícil evaluar cuál es más importante. El uso de inhibidores de la AR en animales y humanos indica que la vía de los polioles está implicada en la neuropatía diabética, sin embargo pudiera tener poca relevancia en el daño en la retina, el riñón y el músculo. Esto tal vez se deba a la limitada eficiencia

y efectos adversos de las drogas; pero se espera que al inhibir la vía de los polioles, la glucosa sea canalizada a la glucólisis, donde se favorece la acumulación de triosas y formación de los precursores de glicación, lo que causa en gran medida las complicaciones asociadas a la enfermedad. Hasta el momento se han evaluado clínicamente diferentes inhibidores de la AR: el Alrestatin de gran toxicidad y con una respuesta pobre en el tratamiento de la neuropatía diabética. El sorbinil, efectivo en prevenir la formación de la catarata; y mejorar la conducción nerviosa, pero con efectos cutáneos colaterales que determinaron su retirada del mercado.⁶⁸ El stabil, mostró resultados más alentadores en animales, pero no se pudieron reproducir en el ser humano. Bimoclobol otra alternativa en el tratamiento de la retinopatía diabética, los resultados fueron desalentadores por la formación de productos tóxicos al inhibir la AR. El tolrestat y zenarestat causaron disfunción hepática⁶⁹ y toxicidad renal,⁷⁰ respectivamente. Entre las drogas mas actuales está el fidarestat,⁷¹ diseñado para el tratamiento de la neuropatía y su eficiencia se atribuye a una rápida distribución en los tejidos, unión selectiva a la AR, un metabolismo limitado, ausencia de efectos farmacológicos y no presenta efectos sobre enzimas hepáticas que metabolizan drogas. Otra alternativa terapéutica probada clínicamente y en el modelo

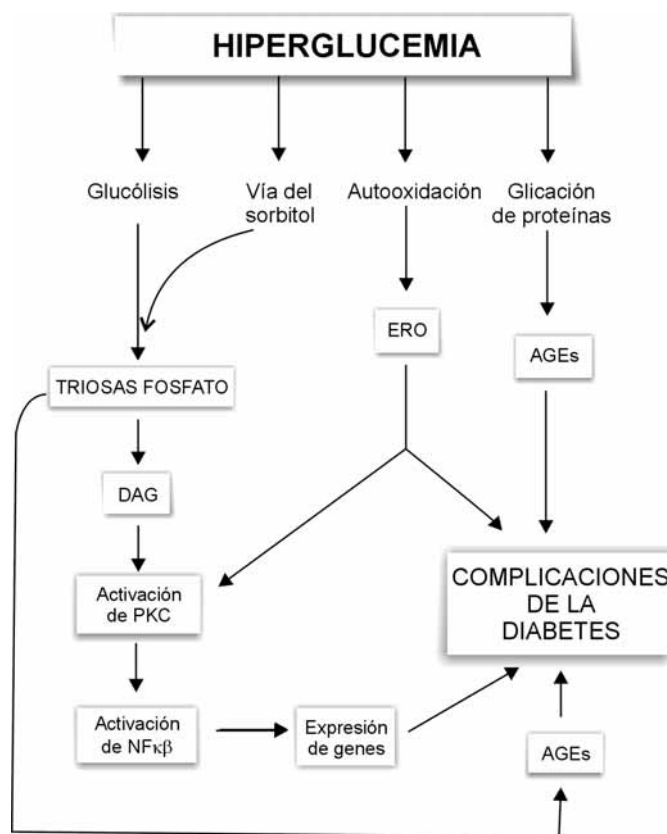


Figura 4. Modelo integrativo del mecanismo de inducción de las complicaciones de la diabetes.

experimental es el uso de dosis altas de tiamina o su análogo benzotiamina (S-benzoil piridoxamina fosfato), que previenen la acumulación de triosas, la formación de AGEs y el desarrollo de la neuropatía diabéticas.⁵

La formación acelerada de AGEs al parecer desempeña una función más general en la patogenia de las complicaciones diabéticas; su administración conduce al engrosamiento de la membrana basal arterial, a la disfunción vascular compleja, a la expansión del mesangio, a la glomerulosclerosis y a la proteinuria,¹³ mientras que inhibidores de su formación (aminoguanidina y piridoxamina) impiden parcialmente las manifestaciones de la retino, nefro y neuropatías diabéticas en animales y humanos.²¹

También el bloqueo del receptor RAGE inhibe el desarrollo de la nefropatía y la aterosclerosis, y mejora la cicatrización en individuos diabéticos.⁷²

Por otra parte, inhibidores de la proteína cinasa C disminuyen la disfunción vascular que conduce a la retino y neuropatía diabéticas.¹¹ Es probable que cuando la concentración intracelular de glucosa sea alta, al metabolizarse por la vía del sorbitol y la glucólisis, se favorezca la acumulación de metabolitos y las condiciones que desencadenen la glicación, la activación de la proteína cinasa C y aumento del estrés oxidativo. Todos ellos en conjunto conducen a la alteración en la estructura y funcionalidad de las proteínas, además de la expresión de genes así como base de las anormalidades tisulares que conducen al desarrollo de las complicaciones de la diabetes. El estudio de los mecanismos moleculares del origen de las complicaciones diabéticas permitirá encontrar nuevas opciones terapéuticas para su prevención y tratamiento.

Referencias

1. Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. México: Secretaría de Salud; 2000.
2. Kahn R. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-1193.
3. Lebovitz HE. Type 2 diabetes: an overview. *Clin Chem* 1999;45(8 pt 2):1339-1345.
4. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414(6865):813-820.
5. Thornalley PJ, Jahan I, Ng R. Suppression of the accumulation of triosaphosphates and increased formation of methylglyoxal in human red blood cells during hyperglycaemia by thiamine *in vitro*. *J Biochem* 2001;129:543-549.
6. Méndez JD. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gac Med Mex* 2003;139:49-54.
7. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Progr Horm Res* 2001;56:1-21.
8. Thornalley PJ. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes and therapeutic options. *Int Rev Neurobiol* 2002;50:37-57.
9. Gabbay KH. Hyperglycaemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 1975;26:521-536.
10. Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* 1991;266(8):4706-4712.
11. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998;47(6):859-866.
12. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48(1):1-9.
13. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17(1):24-38.
14. Turner R. The U.K. Prospective Diabetes Study. A review. *Diabetes Care* 1998;21(3):C35-C38.
15. Clark CJ, Lee D. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995;332:1210-1217.
16. Fore W. Noninsulin-dependent diabetes mellitus. The prevention of complications. *Med Clin North Am* 1995;79(2):287-298.
17. American Diabetes Association. Consensus Statement: Role of cardiovascular risk factors in prevention and treatment of macro-vascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 1993;16(Suppl 2):72-78.
18. Cai L, Kang YJ. Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: a brief review. *Cardiovasc Toxicol* 2001;1(3):181-193.
19. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000;1130(5):963-974.
20. Morauski CJ, Skinner SL, Stubbs AJ. The renin-angiotensin system influences ocular endothelial cell proliferation in diabetes: transgenic and interventional studies. *Am J Pathol* 2003;162(1):151-160.
21. Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, Boyle C, Januszewski AS, Chachich M, Baynes JW, Thorpe SR, Anderson NL. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes* 2002;51(9):2826-2832.
22. Zorina SG, Khatir JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The good, the bad and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251-262.
23. Monnier VM, Sell DR, Odetti P. Maillard reaction and oxidative stress are interrelated stochastic mechanisms of aging. Poli G, Albano E, Ditzian UM, editores. *Free radicals: from basic science to medicine*. Basel, Suiza: Birkhäuser Verlag;1993.
24. Niwa T. 3-deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;731(1):23-26.
25. Best L, Thornalley PJ. Trioses and related substances: tools for the study of pancreatic beta cell function. *Biochem Pharmacol* 1999;57(6):583-588.
26. Wells-Knecht KJ, Lyons TJ, McCance DR, Thorpe SR, Feather MS, Baynes JW. 3-deoxyfructose concentrations are increased in human plasma and urine in diabetes. *Diabetes* 1994;43(9):1152-1156.
27. Yamada H, Miyata S, Igaki N, Yatabe H, Miyauchi Y, Ohara T, Sakai M, Soda H, Oimomi M, Kasuga M. Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma. Specific *in vivo* determination of intermediate and advanced Maillard reaction. *J Biol Chem* 1994;69(32):20275-20280.
28. Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol* 1998;44(7):1139-1145.
29. Thornalley P. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol* 1998;44:1013-1023.
30. Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, Ziegler R, Nawroth PP. The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. *Biofactors* 1999;10(2-3):157-167.
31. Hofmann MA, Schiekofer S, Iserman B, Kanitz M, Henkeis M, Joswing M, Treuch A, Marcos M, Weiss T, Borcea V, Abdel Khalek AK, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahi P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappa B. *Diabetologia* 1999;42(2):222-232.
32. Giardino I, Edelstein D, Browlee M. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996;97(6):1422-1428.
33. Hodgkinson AD, Sondergaard KL, Yang B, Cross DF, Millward BA, Demaine AG. Aldose reductase expression is induced by hyperglycemia in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2001;60(1):211-218.
34. Meister A. Biochemistry of glutathione. En: De D, Greenberg, editores. *Metabolism of sulfur compounds*. New York: Academic Press;1975. pp. 101-188.
35. Diplock AT. Antioxidants and free radical scavengers. En: Rice-Evans CA, Burdon RH. Elsevier Science LLC, editores. *Free radical damage and its control*. Amsterdam, Holanda: Elsevier Science BV 1994;99:113-130.
36. Trueblood N, Ramasamy R. Aldose reductase inhibition improves altered glucose metabolism of isolated diabetic rat hearts. *Am J Physiol* 1998;275(1 Pt 2):H75-H83.
37. Gabbay KH. Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1975;291:521-536.
38. Fukase S, Sato S, Mori K, Secchi EF, Kador PF. Polyol pathway and NADPH-dependent reductases in dog leukocytes. *J Diabetes Complications* 1996;10(6):304-313.
39. Knecht E, Roche E. The reduction-oxidation status may influence the degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett* 1986;206(2):339-342.
40. Morgan PE, Dean RT, Davis MJ. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen attack. *Eur J Biochem* 2002;269:1916-1925.
41. Alexander MC, Lomato M, Nasrin N, Ramaika C. Insulin stimulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression through cis-acting DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;185:5092-5096.
42. Novotny MV, Yancey MF, Yanuy MF, Stuart R, Weisler D, Peterson RG. Inhibition of glycolytic enzymes by endogenous aldehydes: a possible relation to diabetic neuropathies. *Biochim Biophys Acta* 1994;1226(2):145-150.

43. Beisswenger PJ, Howell SK, Smith K, Szwergold BS. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as an independent modifier of methylglyoxal levels in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2003;1637(1):98-106.
44. Szwergold BS, Kappier F, Brown TR. Identification of fructose 3- phosphate in the lens of diabetic rats. *Science* 1990;247(4941):451-454.
45. Kusunoki H, Miyata S, Ohara T, Liu BF, Uriuhara A, Kojima H, Suzuki K, Miyazaki H, Yamashita Y, Inaba K, Kasuga M. Relation between serum 3-deoxyglucosone and development of diabetic microangiopathy. *Diabetes Care* 2003;26(6):1889-1894.
46. Burg M, Kador PF. Sorbitol, osmoregulation, and the complications of diabetes. *J Clin Invest* 1988;81(3):635-640.
47. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999;13(1):23-30.
48. Naruse K, Nakamura J, Hamada Y, Nakayama M, Chaya S, Komori T, Kato K, Kasuya Y, Miwa K, Hotta N. Aldose reductase inhibition prevents glucose-induced apoptosis in cultured bovine retinal microvascular pericytes. *Exp Eye Res* 2000;71(3):309-315.
49. Tilton RG, Chang K, Nyengaard JR, Van den Enden M, Ido Y, Williamson JR. Inhibition of sorbitol dehydrogenase. Effects on vascular and neural dysfunction in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1995;44(2):234-242.
50. Koim-Litty V, Sauer U, Nerfich A, Lehmann R, Schieicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998;101(1):160-169.
51. Du XL, Edestein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldeberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Spl glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;97(22):12222-12226.
52. Hawkins M, Barzilai N, Liu R, Hu M, Chen W, Rossetti L. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 1997;99(9):2173-2182.
53. McClain DA, Crook ED. Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* 1996;45(8):1003-1009.
54. Baron AD, Zhu JS, Garvey WT, et al. Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. *J Clin Invest* 1995;96:2792-2801.
55. Hebert LF, Daniels MC, Zhou J, Crook ED, Turner RL, Simmons ST, Neidigh JL, Zhu JS, Baron AD, McClain DA. Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J Clin Invest* 1996;98:930-936.
56. Liu K, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE. Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(6):2820-2825.
57. Welis L, Vosseller K, Hart GW. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 2001;291(5512):2376-2378.
58. Patti ME, Virkamaki A, Landaker EJ, Kahn CR, Yki-Jarvinen H. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine *in vivo* induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* 1999;48(8):1562-1571.
59. Yuan SY, Ustinova EE, Wu MH, Tinsley JH, Xu W, Korompai FL, Taulman AC. Protein kinase C activation contributes to microvascular barrier dysfunction in the heart at early stages of diabetes. *Circ Res* 2000;87(5):412-417.
60. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Kohner EM, et al. Protein kinase C beta 2-dependent phosphorylation of core 2 GlcNAc-T promotes leukocyte-endothelial cell adhesion: a mechanism underlying capillary occlusion in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2003;52(6):1519-1527.
61. Wolf BA, Williamson JR, Easom RA, Chang K, Sherman WR, Turk J. Diacylglycerol accumulation and microvascular abnormalities induced by elevated glucose levels. *J Clin Invest* 1991;87:31-38.
62. Godbout JP, Pesavento J, Hartman ME, Manson SR, Freund GG. Methylglyoxal enhances cisplatin-induced cytotoxicity by activating protein kinase C delta. *J Biol Chem* 2002;277(4):2554-2561.
63. Filippis A, Ciark S, Proietto J. Increased flux through the hexosamine biosynthesis pathway inhibits glucose transport acutely by activation of protein kinase C. *Biochem J* 1997;1324(Pt 3):981-985.
64. Scivittaro V, Ganz MB, Weiss MF. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta(11) in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278(4):F676-F683.
65. Lindschau C, Quass P, Haller H, et al. Glucose-induced TGF-beta 1 and TGF-beta receptor expression in vascular smooth muscle cells is mediated by protein kinase Calpha. *Hypertension* 2003;42(3):335-341.
66. Park JY, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Sazuma 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;49(7):1239-1248.
67. Gugliucci A, Menini T. The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? *Life Sci* 2003;72(23):2603-2616.
68. Jaspan JB, Towie VL, Maselli R, Herold K. Clinical studies with an aldose reductase inhibitor in the autonomic and somatic neuropathies of diabetes. *Metabolism* 1986;35:83-92.
69. Foppiano M, Lombardo G. Worldwide pharmacovigilance systems and tolrestat withdrawal. *Lancet* 1997;349:399-400.
70. Davids J, editor: Pfizer suspends zenarestat. *Scrip* 2000;2584:24 (October 18 th).
71. Nigishi H, Toyota T, Sakamoto N. Clinical efficacy of fidarestat, a novel aldose reductase inhibitor, for diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Care* 2001;24:1776-1782.
72. Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Rong LL, Mosher B, Markowitz GS, Stein G, Bierhaus A, Liliensiek B, Arnold B, Naeiroth PP, Stern DM, D'Agati VD, Schmidt AM. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 2003;162(4):1123-1137.

