



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Vol. 38. No. 4 Octubre-Diciembre 2015
pp 249-263

La memoria metabólica y las complicaciones cardiovasculares en el paciente diabético

Dr. Pastor Luna-Ortiz,* Dr. Pedro L. Flores-Chávez,** Dra. Verónica Guarner-Lans,*** Dra. Alexa María Machado-Díaz,**** Dra. Mónica Eugenia Olivares-Sanromán,***** Dr. Martín Martínez-Rosas****

- * Departamento de Farmacología. Instituto Nacional de Cardiología «Ignacio Chávez», México, D.F.
- ** Departamento de Instrumentación Electromecánica. Instituto Nacional de Cardiología «Ignacio Chávez», México, D.F.
- *** Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología «Ignacio Chávez», México, D.F.
- **** Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California, campus Mexicali.
- ***** Universidad Tecnológica de México, Campus Marina Nacional, D.F.

Solicitud de sobretiros:

Martín Martínez Rosas
Departamento de Fisiología.
Instituto Nacional de Cardiología «Ignacio Chávez».
Juan Badiano Núm. 1,
Col. Sección XVI, 14080,
México, D.F., México.
Tel: ++ (52) 5573-2911
Fax: ++ (52) 5573-0994
E-mail: martin5163@hotmail.com

Recibido para publicación: 12-03-2015.

Aceptado para publicación: 07-10-2015.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en
<http://www.medigraphic.com/rma>

RESUMEN

La diabetes mellitus se considera una pandemia en la actualidad y es una enfermedad comúnmente encontrada durante la anestesia. Representa un factor de riesgo independiente de morbilidad en cirugías mayores. En la actualidad, las herramientas farmacológicas con las que contamos no son suficientes para detener y revertir las alteraciones vasculares propias de la DM, en particular las microvasculares. La evaluación integral del paciente diabético debe considerar la historia de la enfermedad y en particular la presencia de la memoria metabólica que se define como el efecto a largo plazo de un estado hiperglucémico prolongado previo que lleva al desarrollo de las complicaciones vasculares. Estudios aleatorizados a gran escala han demostrado que el control intensivo temprano de la glucemia puede reducir la incidencia y progresión de las complicaciones micro- y macrovasculares en estos pacientes mientras que los períodos de hiperglucemia crónica debido a un mal control, principalmente durante las etapas iniciales de la diabetes, dejan una marca celular que permite el desarrollo y la progresión de las complicaciones vasculares, incluso cuando se alcanza el control euglucémico. Por lo tanto, la memoria metabólica es una condición que puede explicar las complicaciones vasculares en los resultados quirúrgicos a corto y a largo plazo. En esta revisión, ofrecemos al anestesiólogo una visión general del fenómeno describiendo sus posibles mecanismos fisiopatológicos a nivel celular y molecular y discutiendo las implicaciones terapéuticas para el manejo de esta condición.

Palabras clave: Memoria metabólica, diabetes mellitus, estrés oxidativo, glicación, epigenética, inflamación.

SUMMARY

Diabetes mellitus is considered a pandemic at present and is a disease commonly found during anesthesia. It represents an independent risk factor morbidity and mortality in major surgeries. At present the pharmacological tools that we have are not enough to halt and reverse the vascular alterations typical of the DM, including the microvascular ones. The comprehensive evaluation of the diabetic patient should consider the history of the disease and in particular the presence of metabolic memory that is defined as the long-term effect of a previous prolonged hyperglycemic condition that leads to the development of vascular complications. Large randomized studies have shown that intensive control of blood sugar early can reduce the incidence and progression of micro and macrovascular complications in these patients while periods of chronic hyperglycemia due to poor control, especially during the initial stages of diabetes, leaves a cell mark allowing the development and progression of vascular complications, even when the euglycemic control is achieved. Therefore, the metabolic memory is a condition that may explain the vascular complications in surgical results in the short and long term. In this review, we provide the anesthesiologist an overview of the phenomenon

describing the possible pathophysiological mechanisms at the cellular and molecular level and discuss the therapeutic implications for the management of this condition. Therefore, the metabolic memory is a condition that may explain the vascular complications in surgical results in the short and long term. In this review, we provide the anesthesiologist an overview of the phenomenon describing the possible pathophysiological mechanisms at the cellular and molecular level and discuss the therapeutic implications for the management of this condition.

Key words: *Metabolic memory, diabetes mellitus, oxidative stress, glycation, epigenetic, inflammation.*

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es el trastorno metabólico y endocrino más comúnmente encontrado durante la anestesia. Esta situación tiende a aumentar ya que la población de pacientes diabéticos requiere cirugía con más frecuencia que la población no diabética⁽¹⁻³⁾. En la actualidad es muy claro que la DM representa un factor de riesgo independiente de morbilidad en las cirugías mayores. Los pacientes diabéticos tienen más complicaciones perioperatorias que los pacientes no diabéticos y se ha observado que la gravedad de las complicaciones vasculares es directamente proporcional a la duración de la diabetes^(1,3,4). Diversos estudios han demostrado que los pacientes con mal control de la diabetes presentan los peores resultados quirúrgicos⁽³⁻⁵⁾. De esta manera, la DM es un factor que influye importantemente sobre los resultados postoperatorios. Por otra parte, se ha observado que aún cuando se tiene un control estricto de la glucemia, las complicaciones vasculares continúan progresando, en particular las microvasculares, y los medicamentos con los que contamos hasta la fecha no han podido detener o revertir el progreso de dichas complicaciones. En este contexto se ubica el concepto de la «memoria metabólica», el cual se define como el efecto a largo plazo del estado glucémico inicial que conlleva al desarrollo de complicaciones vasculares diabéticas. Muchos ensayos clínicos a gran escala y prospectivos sobre la diabetes tipo 1 y tipo 2 han demostrado que el control intensivo precoz de la glucemia puede reducir la incidencia y progresión de complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía, neuropatía) y macrovasculares (aterosclerosis, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio y la amputación de miembros)⁽⁵⁻¹³⁾. Por otro lado, períodos de hiperglucemia crónica debido a un mal control glucémico durante las etapas iniciales de la diabetes, crean una huella celular que permite el desarrollo y la progresión de las complicaciones vasculares, aun cuando se alcance el control euglucémico. Este concepto de memoria metabólica sugiere la necesidad de un diagnóstico temprano y de un tratamiento agresivo precoz para alcanzar un control metabólico estricto⁽¹³⁾ y evitar las complicaciones de la diabetes. El descubrimiento de la memoria metabólica ha abierto nuevas posibilidades de investigación para el control farmacológico de la persistencia de sus efectos. Actualmente

existen medicamentos (como la metformina, la pioglitazona, la pentoxifilina, los bloqueadores del receptor de angiotensina II-1, inhibidores de la ECA y otros) que son capaces de detener o revertir la persistencia de la inflamación y el estrés oxidativo, incluso después de un manejo no adecuado y prolongado de la diabetes⁽¹⁴⁻²¹⁾. Recientemente se ha propuesto un nuevo grupo de fármacos específicos para tratar la memoria metabólica que actúan sobre las enzimas que modifican la estructura de las histonas (proteínas que modulan la expresión de ADN) afectando la expresión génica⁽²²⁻²⁵⁾ y que aún se encuentran en fase experimental. Este conjunto de fármacos constituyen las herramientas para el tratamiento de la memoria metabólica. Sin embargo, necesitamos entender mejor los mecanismos fisiopatológicos del fenómeno para diseñar un enfoque terapéutico óptimo. El objetivo de esta revisión es ofrecer al anestesiólogo una comprensión amplia de la memoria metabólica, discutir los mecanismos fisiopatológicos a nivel celular y subcelular que se han propuesto para explicar esta condición y finalmente revisar las implicaciones terapéuticas.

EL ORIGEN DEL CONCEPTO

El concepto de memoria metabólica nació a partir de los estudios que demostraron que los cambios en la microcirculación producidos por un período de hiperglucemia son relativamente reversibles si se controla rápidamente la glucosa en sangre. Por el contrario, si se permite que la hiperglucemia se mantenga durante varios meses o años, los cambios vasculares iniciales persisten y pueden aparecer otras alteraciones como daño al metabolismo de lípidos, el estrés oxidativo y alteraciones de la coagulación, lo que puede conducir a cambios estructurales irreversibles en las proteínas funcionales. Existen estudios aleatorizados realizados a gran escala⁽⁷⁻¹¹⁾ que han demostrado que un control temprano e intensivo de la glucemia reduce el riesgo de complicaciones microvasculares de la diabetes. El organismo del paciente se comporta como si el entorno glucémico inicial pudiera ser recordado por los órganos diana (es decir, los ojos, los riñones, el corazón, extremidades, etc.), y por lo tanto, este fenómeno ha sido llamado «memoria metabólica», «memoria hiperglucémica» o «efecto legado» por otros autores^(12,13). En esta sección se describen las evidencias experimentales sobre el origen de

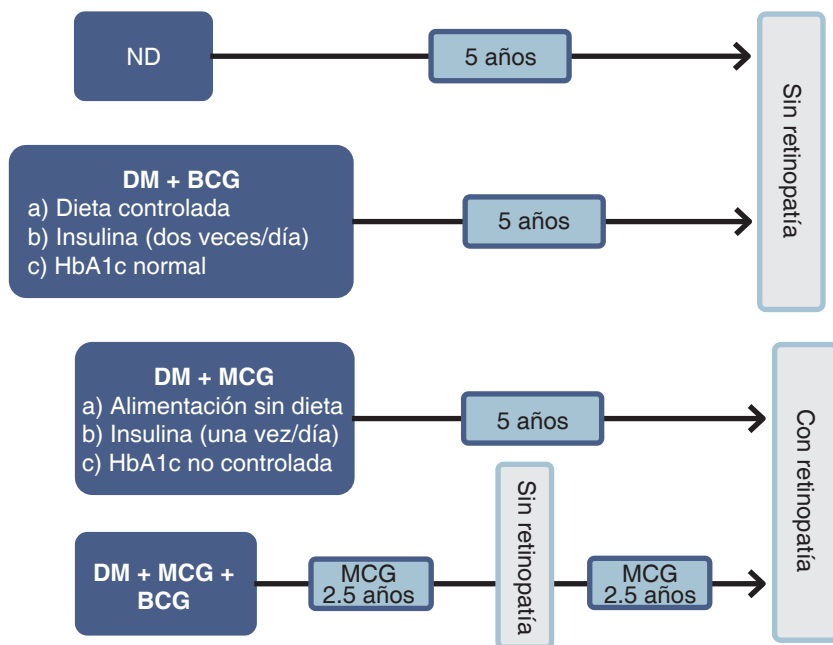


Figura 1.

Diseño experimental y los resultados del estudio de Engerman et al.⁽²⁶⁾ en la memoria metabólica. ND = perros normales; DM = diabetes mellitus; BCG = buen control de la glucemia; MCG = mal control de la glucemia.

este fenómeno. La primera investigación relacionada con la memoria metabólica fue publicada en 1987 por Engerman et al.⁽²⁶⁾ quien evaluó la posibilidad de detener el desarrollo de la retinopatía diabética mediante un buen control de la glucemia. En este estudio, perros normales fueron asignados al azar en cuatro grupos, un grupo no diabético y tres grupos con DM inducida por inyección intravenosa de monohidrato de aloxano. Los grupos de diabéticos fueron clasificados de acuerdo con su control glucémico durante el estudio (Figura 1). Un grupo fue tratado con buen control de la glucemia (BCG) durante cinco años (la insulina fue administrada dos veces al día junto con una dieta controlada, de manera que la hiperglucemia y glucosuria fueron leves y poco frecuentes, la HbA1c era comparable a la de los sujetos control). Un segundo grupo de animales diabéticos se mantuvo con un mal control de la glucosa en sangre (MCG) durante cinco años (dieta no controlada y una sola inyección de insulina diaria sólo para prevenir la hiperglucemia crónica y glucosuria). El tercer grupo fue mantenido con MCG durante 2.5 años y luego fue cambiado a BCG durante 2.5 años. La retinopatía se evaluó por la presencia de aneurismas capilares y otros signos de alteraciones microvasculares intrarretinianas (como un número excesivo de capilares no perfundidos, pérdida generalizada de pericitos intramurales, vasos varicosos, hemorragias, etc.). Después de los cinco años del estudio se compararon todos los grupos. La retinopatía fue claramente inhibida por el buen manejo de la glucosa. Las alteraciones intrarretinianas en el grupo con BCG no fueron significativamente diferentes a las de los perros normales (ND). Por el contrario, los animales que recibieron

inicialmente un control pobre y después recibieron un buen control (DM + MCG + BCG) tuvieron una incidencia de retinopatía similar a la del grupo que fue mantenido con mal control de la glucemia (DM + MCG) durante todo el estudio (Figura 1). En este último grupo la retinopatía estuvo ausente durante los primeros 2.5 años con MCG y la aparición de las consecuencias se retrasó, manifestándose después de que el tratamiento fuera cambiado a BCG. Esto sugiere que algunos eventos que estaban presentes en el período inicial de la hiperglucemia se mantuvieron y pudieron desencadenar el daño microvascular posterior. Después de este primer informe Roy et al. en 1990⁽²⁷⁾, demostró el desarrollo de una «memoria hiperglucémica» que activa la sobreproducción de fibronectina y colágeno IV en células endoteliales aisladas (de corteza renal y de corazón) de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ). En este estudio, la glucosa fue mantenida en niveles altos durante dos semanas, lo que llevó a la sobreproducción de fibronectina y colágeno IV, la cual persistió incluso una semana después de la normalización de la glucosa. Además Hammes⁽²⁸⁾ informó en 1993 en un modelo de rata diabética inducida con sacarosa, que el trasplante de islotes de Langerhans a las seis semanas después de la aparición DM invierte las características de la retinopatía diabética, lo que no sucede si el trasplante se realiza a las 12 semanas. En los seres humanos, el concepto de memoria metabólica surgió de los resultados de un estudio de referencia con pacientes con DM1 publicados en 1993: «The Diabetes Control and Complications Trial» (DCCT)⁽²⁹⁾. En este estudio, los pacientes fueron sometidos a dos tipos de tratamiento para normalizar sus niveles de glucosa en sangre: uno

estándar y el otro llamado intensivo. El estudio fue suspendido prematuramente (en 6.5 años) debido a la disminución evidente en la progresión de las complicaciones vasculares en pacientes con control glucémico intensivo. Desde este punto en adelante, todos los pacientes fueron sometidos a un tratamiento estricto para obtener los mayores beneficios⁽²⁹⁾. En un estudio posterior en 2003 llamado «*Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*» (EDIC) en el que se estudió la misma población de pacientes del estudio DCCT⁽⁷⁾, se encontró que los pacientes que se habían sometido a tratamiento estándar durante el primer estudio DCCT, siguieron teniendo una mayor incidencia de complicaciones microvasculares diabéticas tales como la nefropatía y la retinopatía, en comparación con los que habían recibido el control estricto de la glucemia durante todo el estudio, incluso varios años después de que se cambiara y se implementara el control intensivo de la glucemia. El promedio de los niveles de HbA1c en los grupos permaneció casi equivalente^(7,8). Este último dato demostró que el control glucémico se mantuvo de manera similar en ambos grupos. El seguimiento de estos pacientes durante casi 10 años demostró un efecto beneficioso persistente del control precoz de la glucemia en la progresión de las alteraciones macrovasculares, tales como el grosor de la íntima-media de la arteria carótida, una reducción significativa en el riesgo de infarto al miocardio fulminante, accidente cerebrovascular o muerte por enfermedad cardiovascular^(9,10,30). Estos hallazgos sugieren que un control estricto temprano podría tener efectos beneficiosos en ambas, la micro- y la macrovasculatura. De esta manera la idea de memoria metabólica se extendió a los humanos. Al parecer, la memoria metabólica también se produce en la DM2 como se demuestra en el estudio «*United Kingdom Prospective Diabetes Study*» (UKPDS) que incluyó a 5,102 pacientes con diagnóstico reciente de DM2⁽³¹⁾ y con una mediana de seguimiento de 10 años. Este estudio demostró que las complicaciones a largo plazo en DM2 se pueden prevenir mediante un control intensivo de la glucosa en sangre y de la presión arterial. Los pacientes con DM2 que se sometieron a tratamiento estándar durante el estudio tuvieron una mayor incidencia de complicaciones microvasculares y cardiovasculares en comparación con los grupos que recibieron tratamiento intensivo durante todo el estudio y durante el período de seguimiento de una manera similar a lo que ocurrió con los pacientes con DM1 en el estudio DCCT/EDIC⁽³²⁾. Estos resultados demostraron que un buen control metabólico temprano (desde recién diagnosticada hasta cinco años después del diagnóstico) también tuvo efectos beneficiosos en la DM2. Aun cuando estas evidencias son la base para el concepto de memoria metabólica, los mecanismos de este proceso patológico aún no se entienden completamente hasta la fecha. Por otra parte, se ha descrito una «programación metabólica» durante las primeras etapas de la historia de vida de un indi-

viduo que influirán en el futuro para el desarrollo de complicaciones metabólicas. En animales se ha documentado que en condiciones adversas, tales como la desnutrición durante las primeras etapas de desarrollo, se puede modificar permanentemente la estructura y función del organismo y lo predispone a enfermedades como la obesidad, el síndrome metabólico, la diabetes y la hipertensión en la vida adulta⁽³³⁻³⁵⁾. Estos dos fenómenos, la memoria metabólica y la programación metabólica podrían compartir mecanismos que podrían ser a nivel genético. Hasta hace poco hemos comenzado a comprender la interacción entre los factores ambientales y la regulación de la expresión génica. Consideramos que mientras más conocimiento molecular se obtenga de estos procesos, más posibilidades habrá de desarrollar estrategias terapéuticas y preventivas adecuadas para las complicaciones de la DM.

POSIBLES MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA MEMORIA METABÓLICA

Los mecanismos de la memoria metabólica podrían incluir a todos los activados por la hiperglucemia crónica. En particular para el daño vascular se han propuesto cuatro mecanismos básicos: el estrés oxidativo, la glucosilación no enzimática de las proteínas celulares, los cambios epigenéticos y la inflamación crónica; los que probablemente interactúan entre sí para mantener activada la señalización que conduce a una condición de estrés metabólico y por lo tanto a las complicaciones vasculares de los pacientes diabéticos (Figura 2). Los mismos mecanismos que están implicados en la memoria metabólica parecen participar en el desarrollo de la programación metabólica. Estudios experimentales han demostrado que en los recién nacidos de bajo peso al nacer están metabólicamente programados para tener una mayor predisposición a desarrollar DM, síndrome metabólico y obesidad ya que prenatalmente fueron sometidos a condiciones de estrés oxidativo e inflamación y han experimentado cambios epigenéticos. Por otro lado, el estrés oxidativo y la inflamación crónica ahora se consideran como sucesos iniciadores de aterosclerosis siendo la disfunción de las células endoteliales un primer paso fundamental. Se ha encontrado disfunción endotelial arterial en recién nacidos a término, en niños y en jóvenes adultos con bajo peso al nacer⁽³⁶⁾. La evidencia actual sugiere que la creación de un ambiente intrauterino proinflamatorio y prooxidante es una condicionante importante entre los factores prenatales que tienen un impacto en la vida adulta aumentando el riesgo de padecer obesidad, hipertensión y DM⁽³⁷⁾. Probablemente estamos frente a un fenómeno común: el efecto del medio ambiente sobre la expresión génica, en particular cuando los estímulos son prooxidantes y proinflamatorios en cualquier etapa de la vida siendo mayor el impacto de esta influencia en el desarrollo prenatal o en las primeras etapas de la vida.

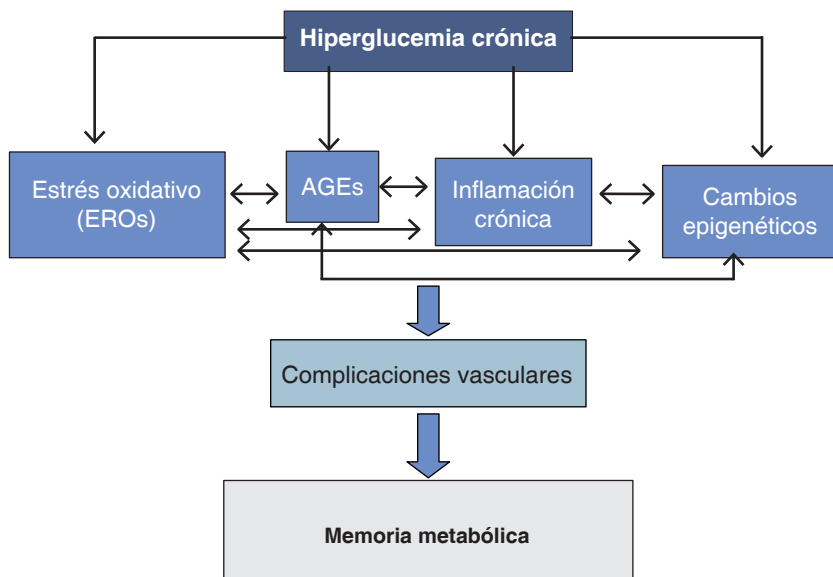


Figura 2.

Los mecanismos generales propuestos para explicar la memoria metabólica podrían ser activados por la hiperglucemia crónica. El estrés oxidativo, la glucosilación no enzimática de las proteínas celulares, la inflamación crónica y los cambios epigenéticos son procesos que podrían interactuar entre sí y mantener una condición de estrés metabólico crónico conduciendo a complicaciones vasculares y finalmente al establecimiento de la memoria metabólica.

EL ESTRÉS OXIDATIVO COMO UN DISPARADOR DE LA MEMORIA METABÓLICA

En condiciones normales existe un equilibrio crítico entre la generación de radicales libres por el metabolismo y los niveles de compuestos que los contrarrestan⁽³⁸⁾. En general los radicales libres son moléculas con un electrón no apareado, lo que las hace altamente reactivas. Los más comunes en el organismo son los radicales libres que contienen oxígeno, llamados especies reactivas de oxígeno (EROs) que pueden causar daño oxidativo cuando atacan macromoléculas como lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos⁽³⁹⁾. El estrés oxidativo (EOx) se define como un desequilibrio entre la producción de EROs y la producción de antioxidantes. Hay varios estudios que demuestran que los pacientes con DM1 no sólo tienen aumentados los niveles de EROs y marcadores de daño inducido por radicales libres, sino también presentan niveles reducidos de moléculas antioxidantes⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ y el EOx aparece como parte del daño tisular^(43,44). La alteración metabólica más importante en la DM tipo 1 y 2 es la hiperglucemia crónica y esta condición podría desencadenar EOx. Se ha encontrado que en individuos sanos los aumentos en los niveles de glucemia pueden aumentar el EOx celular⁽⁴⁵⁾. La hiperglucemia por sí misma promueve un desequilibrio entre la generación y eliminación de EROs que conduce a un estado de mayor EOx en pacientes diabéticos. Esta condición podría resultar en daños a organelos y membranas celulares en particular a las células endoteliales, generando así, la disfunción endotelial que puede manifestarse de manera crónica como complicaciones vasculares diabéticas. Clínicamente, existe evidencia de que el EOx juega un papel importante en el desarrollo de la memoria metabólica. Los estudios

realizados en pacientes con DM1 indican que los niveles plasmáticos de marcadores de EOx y el nivel del indicador de daño celular nitrotirosina, se mantienen en niveles elevados junto con la disfunción endotelial cuando se ha mantenido un mal control glucémico (HbA1c > 7%) durante los primeros cinco años de la enfermedad, incluso si se lograron eventualmente períodos de normoglucemia⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. La nitrotirosina es el resultado de la nitración del aminoácido tirosina mediada por el anión peroxinitrito (Figura 3). El peroxinitrito a su vez, resulta de la reacción entre el óxido nítrico y el anión superóxido (O₂⁻) cuando los niveles de este último anión son elevados. El peroxinitrito, aunque no es un radical libre, puede inducir la oxidación de lípidos y proteínas lo que se llama estrés nitrativo. Por lo tanto, la presencia de nitrotirosina en las proteínas del plasma se considera como una prueba indirecta de la producción de peroxinitrito y la sobreproducción de anión O₂⁻ y estrés oxidativo y nitrativo. En general el EOx se considera un posible mecanismo de memoria metabólica debido a que varios marcadores de EOx están elevados en pacientes con DM. En un estudio experimental llevado a cabo con ratas diabéticas inducidas por STZ se midieron los niveles de tres marcadores de EOx y los niveles de nitrotirosina encontrándose que el control temprano de la glucemia resultó en la reversión de las alteraciones y en la inhibición de la elevación de los marcadores de EOx⁽⁴⁹⁾. En este estudio los animales fueron divididos en cuatro grupos: mal control (HbA1c > 11%) durante 13 meses, un buen control (HbA1c < 5.5%) durante 13 meses, un mal control durante dos meses seguido de un buen control durante siete meses, finalmente un grupo con mal control durante seis meses seguido por un buen control durante siete meses. En este último grupo, cuando se aplicó un buen control glucémi-

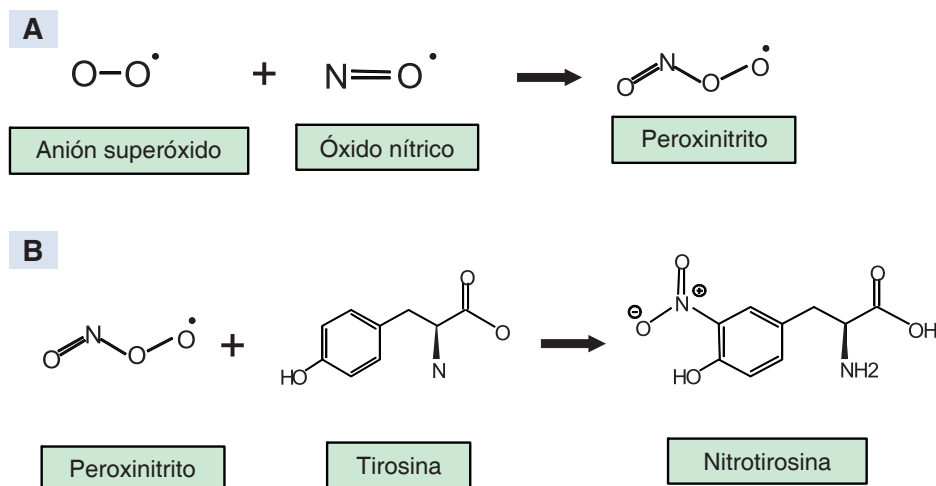


Figura 3. La nitrotirosina es el producto de nitración de tirosina formado en condiciones de estrés oxidativo alto (EOx). Durante el EOx hay una elevada producción de anión superóxido (O_2^{\bullet}) que tiende a reaccionar con el óxido nítrico (NO) que conduce a la formación de peroxinitrito (ONOO). El peroxinitrito no es un radical libre pero es un potente oxidante que produce nitración aniónica de varias moléculas biológicas. Cuando el peroxinitrito reacciona con el aminoácido tirosina genera la nitrotirosina. La nitrotirosina se ha identificado como un marcador de daño celular e inflamación así como un indicador de la producción de óxido nítrico y peroxinitrito, y la sobreproducción de O_2^{\bullet} . El peroxinitrito y el estrés nitrativo podrían participar en la patogénesis de la memoria metabólica.

co durante siete meses después de dos meses de mal control, la elevación de los marcadores de EOx como la enzima peroxidasa lipídica (POL), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y los niveles de óxido nítrico fueron inhibidos en las retinas de estas ratas en comparación con el grupo con mal control durante 13 meses los cuales mostraron altos niveles de estos marcadores. Por otro lado en el grupo de mal control durante seis meses y después un buen control durante siete meses, los niveles de EOx y de estrés nitrativo eran tan elevados como los del grupo con mal control durante 13 meses. En este estudio el restablecimiento de la glucemia normal después de seis meses de mal control glucémico no disminuyó el nivel de EOx. Resultados similares se encontraron en un modelo de ratas galactosémicas inducidas experimentalmente con una dieta de galactosa al 30% durante tres meses⁽⁵⁰⁾. En el grupo de ratas que fueron alimentadas con la dieta de galactosa durante dos meses y una dieta libre de galactosa por un mes adicional, la interrupción de la dieta de la galactosa condujo a una reversión parcial de los niveles de óxido nítrico y POL en la retina en comparación con las ratas del grupo control (alimentados con una dieta normal) y con aquellos del grupo experimental galactosémico (3 meses de dieta con galactosa 30%). Sin embargo, el dismetabolismo retinal continuó progresando después de que el experimento con galactosemia terminara, ya que los niveles de antioxidantes se mantuvieron anormalmente bajos y de que los niveles de nitrotirosina estuvieron elevados durante al menos un mes más⁽⁵⁰⁾. En otro estudio con ratas diabéticas inducidas por

STZ los hallazgos fueron similares a los observados en este estudio⁽⁵¹⁾. Las ratas que se mantuvieron con un control deficiente durante seis meses ($\text{HbA1c} > 12.0\%$) mostraron que la concentración de nitrotirosina en los capilares de la retina no se invirtieron cuando se restauró la normogluceemia⁽⁵¹⁾. En este estudio, también se midieron los niveles de actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en la retina. Esta enzima cataliza la dismutación del superóxido en oxígeno y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y representa uno de los mecanismos antioxidantes más importantes en casi todas las células que utilizan oxígeno (Figura 4). La actividad SOD quedó inhibida en las ratas con mal control durante seis meses y la capacidad antioxidante total fue inferior a la normal aun seis meses después del cese de mal control. Los autores sugirieron que el fracaso en la reversión de la acumulación del peroxinitrito en la microvasculatura de la retina podría ser, en parte, responsable de la resistencia de la retinopatía diabética para revertirse después de la terminación de un mal control proponiendo que la acumulación de peroxinitrito en los capilares de la retina como un evento inicial en el proceso completo⁽⁵¹⁾. Existen experimentos *in vitro* que apoyan el papel del EOx en el desarrollo de la memoria metabólica en células humanas. En particular se han utilizado células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) que han sido ampliamente usadas como modelo de endotelio macrovascular^(52,53) y también células ARPE-19 (*spontaneously arising retinal pigmented epithelium*), una línea celular derivada en 1986 de los ojos normales de un donante masculino de 19 años de edad⁽⁴⁴⁾. El

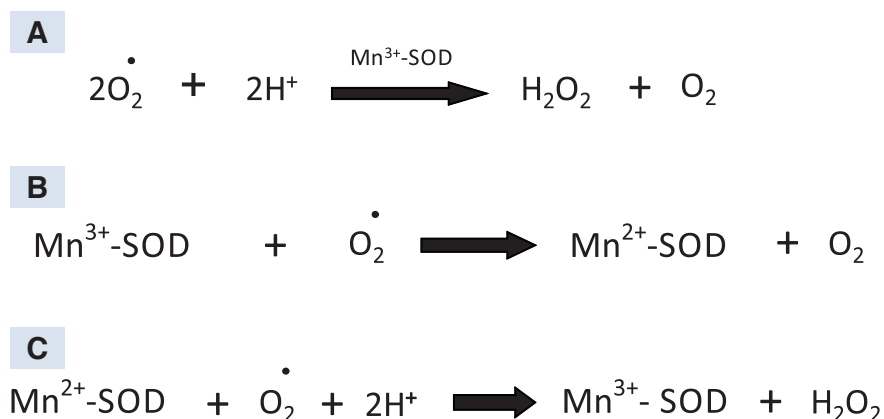


Figura 4. Dismutación del anión superóxido por la superóxido dismutasa (MnSOD) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2). Las superóxido dismutasa (SOD) son, en realidad una familia de enzimas que catalizan la dismutación del superóxido (O_2^-) en O_2 y H_2O_2 . La SOD manganeso mitocondrial se une a este metal como cofactor. La velocidad de esta reacción es 10,000 veces mayor que la velocidad de dismutación espontánea. En **A**) se muestra la reacción global. En **B**) y **C**) la dismutación se describe como dos reacciones medias en las que se da un cambio en el número de oxidación del Mn (2+ y 3+). La reacción de dismutación es una reacción química en la que un único compuesto sirve tanto como un agente oxidante y como un agente reductor (MnSOD) y resultando en un producto oxidante (**B**) y un producto de reducción (**C**).

epitelio pigmentado de la retina juega un papel crítico en el desarrollo y mantenimiento de los fotorreceptores⁽⁵²⁾. Schisano et al.⁽⁵³⁾ incubaron estas células en condiciones de hiperglucemia o con niveles oscilantes de glucosa y se demostró la presencia de memoria metabólica en ambos casos. Las células HUVEC y las ARPE-19 se incubaron en glucosa normal o alta durante tres semanas, o se expusieron a la oscilación de la glucosa (24 horas normal seguido de 24 horas en glucosa alta) durante tres semanas. Otro grupo de células se expuso durante dos semanas a una concentración alta continua de glucosa y otro a niveles oscilantes de glucosa y a continuación se regresaron ambos grupos a niveles normales de glucosa durante una semana. Los altos niveles de varios marcadores de EOX permanecieron aumentados durante una semana aun después de que los niveles de glucosa se habían normalizado apoyando el concepto de memoria metabólica en células humanas. Este informe, además de ser una evidencia a favor de la memoria metabólica, refleja que la oscilación de los niveles de glucemia hace más evidente la memoria metabólica que una alta concentración constante de glucosa en las células endoteliales humanas⁽⁵³⁾.

ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS MITOCONDRIAS Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Uno de los factores clave responsable de complicaciones en la DM es una producción excesiva de EROs y su reacción con varias moléculas de importancia para las células en particular para las células endoteliales⁽⁵³⁻⁶⁰⁾. Las células endoteliales forman una monocapa que recubre la luz interna de los vasos

sanguíneos y producen mediadores que modulan el tono vascular, la adhesión celular, la homeostasis de la coagulación y la fibrinólisis^(54,55,57). Las células endoteliales son especialmente susceptibles a la lesión inducida por la hiperglucemia debido a que su captación de glucosa es en gran medida independiente de la insulina, es decir, no muestran ningún cambio significativo en la tasa de transporte de glucosa cuando la concentración extracelular está elevada. Así cuando se encuentran niveles altos de glucosa en el espacio extracelular, los niveles también están aumentados en las células endoteliales⁽⁵⁴⁻⁵⁸⁾. En condiciones hiperglucémicas estas células metabolizan cantidades más altas de glucosa y como consecuencia, se producen cantidades más grandes de EROs en las mitocondrias. Uno de los radicales libres que se genera en abundancia es el anión superóxido (O_2^-) que está formado por la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTE)⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾. El anión O_2^- es el precursor de H_2O_2 , peroxinitrito y otras especies oxidantes fuertes (Figuras 3 y 4) que cuando se producen en niveles bajos, modulan la expresión génica, las cascadas de transducción de señales y la actividad enzimática pero, cuando sus niveles son altos y/o sostenidos, producen daño oxidativo⁽⁵⁵⁻⁵⁹⁾. Así, en la hiperglucemia crónica la CTE está sobreestimulada para producir O_2^- y EROs en las mitocondrias (Figura 5). Varias evidencias sugieren que esta respuesta mitocondrial juega un papel clave en el daño tisular inducido por la hiperglucemia, especialmente en las células endoteliales⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾. Las EROs generadas por el excesivo metabolismo oxidativo de la glucosa desencadena otros mecanismos de daño⁽⁵⁶⁻⁶¹⁾. Las mitocondrias son la fuente principal de la producción de ATP en las células y su disfunción se considera como un

acontecimiento clave en el desarrollo de complicaciones patológicas de la DM. La síntesis de ATP mitocondrial se lleva a cabo cuando los electrones pasan de moléculas «donantes» de electrones a moléculas «aceptoras» a través de los cuatro complejos de proteínas llamados complejo I, II, III y IV que están presentes en la membrana mitocondrial interna (Figura 5). Cuando la glucosa se incorpora a la célula se metaboliza a través de la glucólisis y luego a través del ciclo de Krebs generándose los donantes de electrones NADH y FADH₂. Durante la fosforilación oxidativa, los electrones son transferidos de estos portadores NADH y FADH₂ a través de los cuatro complejos generando ATP al final del proceso (Figura 5). En condiciones normales el anión O₂⁻ producido se elimina inmediatamente por los mecanismos de defensa naturales (principalmente la SOD). Sin embargo, en la DM existe una generación aumentada de piruvato vía una glucólisis acelerada

en condiciones de hiperglucemia incrementándose la producción de NADH y FADH₂⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾. Por lo tanto, se produce un alto flujo de electrones a los complejos mitocondriales a partir de NADH y FADH₂ y por lo tanto se genera un gradiente de protones mitocondrial excesivo (EΨ). En cierto valor umbral de EΨ la transferencia de electrones dentro del complejo III se bloquea, haciendo que los electrones regresen a la coenzima Q la cual dona electrones al oxígeno molecular^(58,59) y por lo tanto, se genera la formación del anión O₂⁻ (Figura 5). Durante la hiperglucemia crónica se genera el anión -O₂ de forma continua y se establece un aumento de la producción de EROs. La generación de EROs a nivel mitocondrial inducida por la hiperglucemia en las células endoteliales se cree que desempeña un papel central en el EOx⁽⁵⁴⁻⁶⁰⁾. Una cantidad considerable de datos apoya este hecho y se propone como la primera etapa de una cascada de eventos interconectados

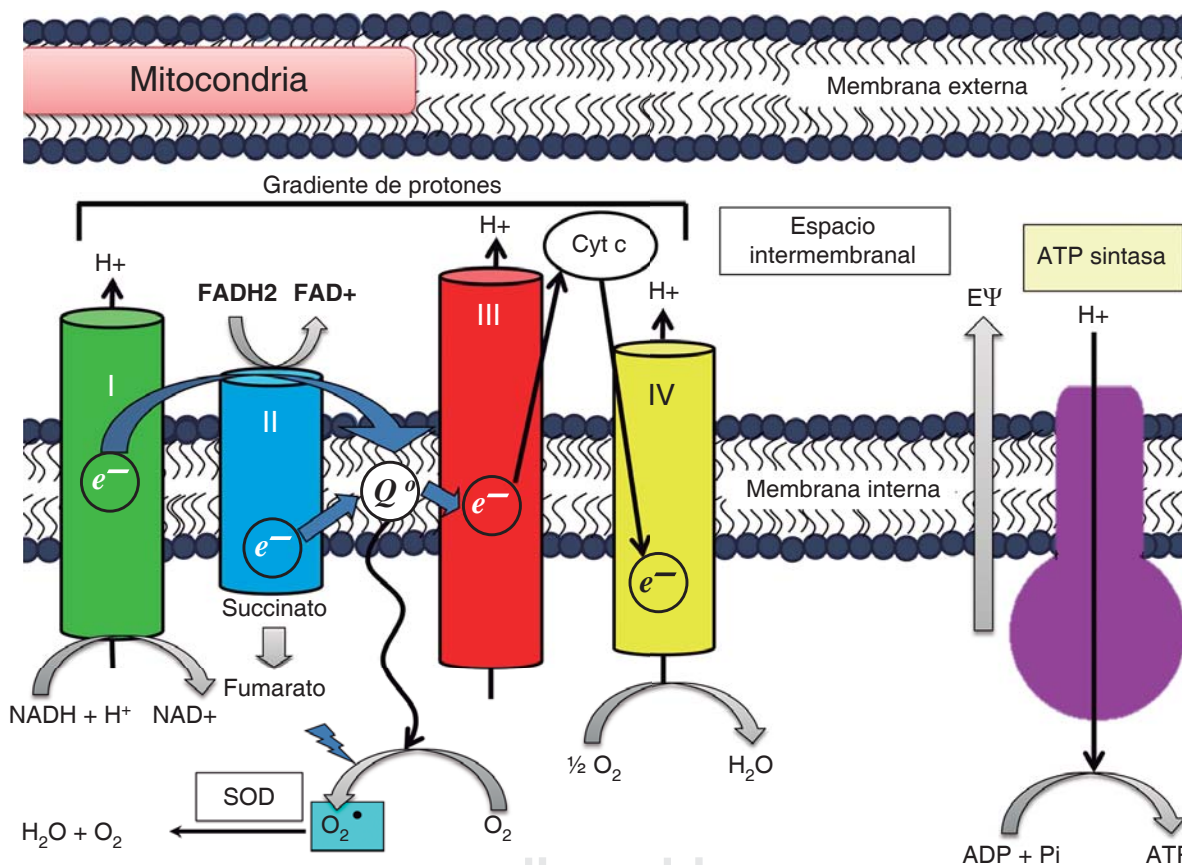


Figura 5. La cadena mitocondrial de transporte de electrones. La CTE contiene cuatro complejos de proteínas llamadas complejo I, II, III y IV que están presentes en la membrana mitocondrial interna. El donador de electrones primario, NADH, contribuye con electrones al complejo I de la cadena. El otro donador de electrones, FADH₂, dona electrones al complejo II (succinato deshidrogenasa). Los electrones de estos dos complejos van hacia la coenzima Q y luego se transfieren al complejo III, el citocromo C. A continuación, los electrones pasan al complejo IV y por último al oxígeno molecular, que es el receptor final de electrones produciendo una molécula de agua. El gradiente de protones generado se disipa por la ATP sintasa que utiliza el flujo de protones para convertir ADP en ATP. Este sistema de transporte de electrones se modula de manera que la síntesis de ATP se puede regular con precisión.

que conducen al desarrollo de las complicaciones crónicas de la DM (Figura 2)⁽⁵⁵⁻⁶⁰⁾. En condiciones normales, la isoforma mitocondrial de la enzima SOD degrada el anión O_2^- a H_2O_2 (Figura 5) el cual a su vez se convierte en O_2 y H_2O por otras enzimas antioxidantes terminando así el potencial nocivo de estas especies. El papel principal del anión O_2^- mitocondrial en el EOX se basa en la observación de que cuando se aumenta la expresión de la SOD se suprime la formación de las EROs y se normalizan las vías de daño hiperglucémico⁽⁵⁵⁻⁶⁰⁾. En general, el EOX es un proceso clave en la aparición y permanencia de las complicaciones vasculares en la DM y aun cuando los detalles precisos del proceso no se conocen completamente, hay evidencias de que el EOX en la mitocondria desempeña un papel importante. Una mejor comprensión de los mecanismos de EOX mitocondrial en las células endoteliales podría dirigir nuevos enfoques terapéuticos para la prevención y tratamiento de la enfermedad cardiovascular diabética^(61,62). Siendo la mitocondria la principal fuente de energía de la célula no debe sorprender que estos organelos podrían ser la causa de las complicaciones e incluso los candidatos para el manejo y prevención de ésta y otras enfermedades en el futuro^(61,62).

Glicosilación no enzimática de proteínas

El segundo mecanismo propuesto para la memoria metabólica es la glicosilación no enzimática de proteínas con la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs). Los AGEs se producen por varias reacciones no enzimáticas que

comienzan con la interacción entre la glucosa de la sangre y los grupos amino libres de las proteínas celulares, cambiando por último su estructura y función (Figura 6)⁽⁶³⁾. Los AGEs se forman durante los períodos de hiperglucemia y pueden persistir durante muchos años. Los AGEs se acumulan lentamente en el curso de la DM y podrían interactuar con el EOX mediando la memoria metabólica (Figura 2).

La reacción de Maillard

La unión de moléculas de glucosa a aminoácidos de péptidos y proteínas de manera espontánea sin la participación de enzimas es llamada «glicación no enzimática» y fue descrita por primera vez por el médico y químico francés Louis-Camille Maillard en 1912⁽⁶⁴⁾. Maillard trató de explicar el color marrón de la comida cuando se cocina y el cambio en el color y en la textura de los alimentos después de un almacenamiento prolongado⁽⁶⁴⁾. La formación de AGEs se estudió inicialmente en los alimentos; sin embargo, Maillard sugirió que estas reacciones pueden tener lugar en el cuerpo y explicar algunas enfermedades⁽⁶⁴⁾. La hemoglobina glucosilada (HbA1c) es un producto de Amadori utilizado para monitorear el control de glicosilación en pacientes diabéticos. Hoy en día se sabe que en condiciones normales en el cuerpo, la reacción de Maillard se inicia por la interacción de un grupo aldehído de un azúcar tal como la glucosa con un grupo amino primario de una proteína produciendo una base de Schiff, la cual se forma en unas pocas horas (Figura 6). Si la hiperglucemia persiste

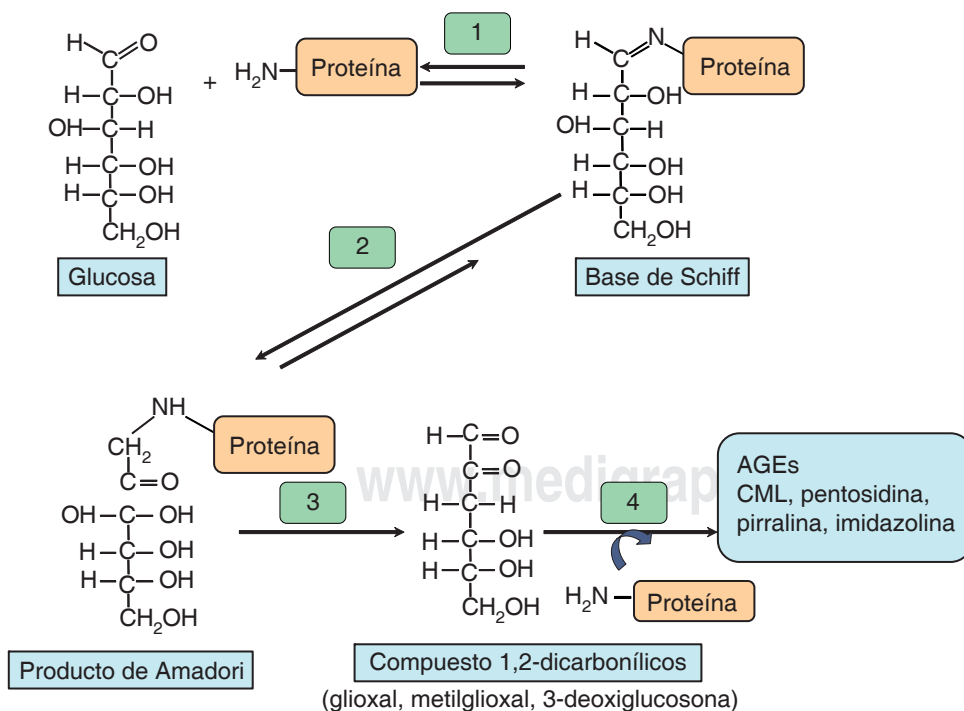


Figura 6.

Formación de AGEs *in vivo*. Se muestran las reacciones no enzimáticas de la formación endógena de AGEs. El primer paso es la interacción de grupo carbonilo reactivo de glucosa con un grupo amino libre de una proteína que conduce a la formación de una base de Schiff. La primera reacción es reversible. La base de Schiff se forma y se estabiliza cuando el producto de Amadori está formado por un enlace covalente. La reacción Amadori sigue siendo reversible. La hiperglucemia crónica induce la formación de AGEs en la reacción irreversible. Los AGEs interactúan entre sí y con proteínas que cambian su estructura y función. (CML = carboximetil lisina).

durante varios días, la base de Schiff se puede reordenar intramolecularmente (el reordenamiento interno se produce en el doble enlace para formar una cetoamina) y lograr una estructura relativamente más estable llamada «producto de Amadori» que todavía es reversible si la normoglucemia se alcanza (Figura 6). Sin embargo, si los niveles de glucosa siguen siendo altos, los productos de Amadori pueden someterse a reacciones intramoleculares espontáneas o interactuar entre sí para unir o separar una molécula de agua, experimentando así una condensación que conduce a la formación de compuestos dicarbonílicos (Figura 6) a partir de los cuales se forman los AGEs. Estas moléculas son muy estables; las reacciones no son reversibles y no pueden ser fácilmente degradados por las enzimas del metabolismo normal. Los AGEs presentan un color marrón y tienen la propiedad de fluorescencia bajo condiciones de luz adecuada⁽⁶⁵⁾. La formación de los AGEs depende de varios factores tales como temperatura, pH, concentración de glucosa y la velocidad de recambio de las proteínas que sufren esta alteración⁽⁶³⁾. En la DM las proteínas que pueden estar afectadas por glicosilación importante son aquellas con una vida media larga (tales como las del cristalino del ojo o el colágeno) porque están expuestas más tiempo a la hiperglucemia. Además, existen otras proteínas tales como proteínas extracelulares o las que se encuentran en la sangre (como la hemoglobina) que también son altamente glicosiladas por nivel de exposición. El papel de los AGEs en la progresión y complicaciones de la DM se ha estudiado ampliamente en los últimos años^(63,66). Los AGEs inducen la reticulación de proteínas formando complejos estables que no son funcionales. Por ejemplo, el colágeno glicosilado tiene una estructura modificada estable que promueve la rigidez vascular lo representa una alteración típica de la DM⁽⁶⁷⁾. Por otra parte, los AGEs formados *in vivo* o sintetizados *in vitro* son reconocidos por sus receptores, los RAGEs los cuales además de AGEs pueden reconocer otros ligandos. Los AGEs actúan mediante la unión a los RAGES en las células epiteliales, en las células endoteliales, en el sistema inmunológico y en el sistema nervioso central. Una vez que se activa el receptor es capaz de generar respuestas proinflamatorias principalmente en las células endoteliales y monocitos. Los niveles elevados de AGEs también se han correlacionado con la migración transendotelial de los monocitos, la producción modificada de factores de crecimiento, el depósito de sustancias aterogénicas en el endotelio por enlaces covalentes y la formación de productos oxidativos^(68,69). La glicosilación de las lipoproteínas puede hacerlas más aterogénicas y promover la internalización endotelial de las LDL por los macrófagos. La glicosilación podría reducir la unión de HDL al receptor y reducir la eficacia de estas lipoproteínas^(70,71). La hiperglucemia induce un gran número de alteraciones en el tejido vascular que potencialmente aceleran el proceso aterosclerótico además de las alteraciones microvasculares⁽⁷¹⁾. La modificación ya

descrita de las proteínas mitocondriales por los AGEs podría ser irreversible y podría dar lugar a la disminución de la función mitocondrial con excesiva formación de especies reactivas que podrían agravar la situación⁽⁷²⁾. El concepto de la memoria metabólica sugiere la necesidad de establecer un tratamiento agresivo temprano dirigido a «normalizar» la glucemia y a un cambio profundo en el estilo de vida. Además es necesario el uso de agentes que reduzcan las especies reactivas con la finalidad de reducir la glicosilación y producir niveles más bajos de AGEs y RAGEs con el fin de minimizar las complicaciones diabéticas a largo plazo.

Los cambios epigenéticos en el desarrollo de la memoria metabólica

El tercer mecanismo es el cambio en la expresión génica inducida por factores ambientales en particular ante un entorno metabólicamente adverso como lo es la hiperglucemia crónica. Un fenómeno como la memoria metabólica podría explicarse en términos de un mecanismo que implica un cambio en la expresión génica y de esta manera podría explicar los efectos a largo plazo incluyendo las consecuencias irreversibles. El término «epigenética» fue utilizado por primera vez en 1942 por el embriólogo británico Conrad Waddington para describir la interacción causal entre los genes y sus productos que dirigen el desarrollo y que están directamente involucrados con el fenotipo⁽⁷³⁾. Hoy en día, la epigenética se refiere al estudio de los rasgos heredables de la expresión génica y a los subsecuentes cambios fenotípicos sin alteraciones en la secuencia de ADN^(74,75). Estos cambios implican modificaciones postraduccionales de proteínas conocidas como histonas, la metilación del DNA y la regulación del microRNA (Figura 7). El nucleosoma es la estructura básica de la organización del DNA genómico y está formado por DNA y un octámero de cuatro dímeros de las siguientes histonas H2A, H2B, H3 y H4. En este octámero el DNA genómico se envuelve dos veces por cada 146 pares de bases. La expresión génica se ve afectada por cambios químicos en la estructura de la cromatina y uno de estos cambios postraduccionales es la modificación en las histonas. El extremo amino de las histonas se puede modificar por acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y la sumoilación (Figura 7). Es frecuente la acetilación y la metilación de residuos de lisina en el extremo amino de las histonas 3 y 4.

Recientemente se ha propuesto que la hiperglucemia crónica induce modificaciones epigenéticas y este tipo de eventos podría subyacer a la disfunción endotelial y al desarrollo de la memoria metabólica^(76,77). La hiperglucemia transitoria puede inducir cambios persistentes en la expresión de genes en las células endoteliales *in vitro* e *in vivo* de ratones no diabéticos⁽⁷⁸⁾. Estos cambios genéticos dependen de modificaciones de histonas y persisten después del retorno a la

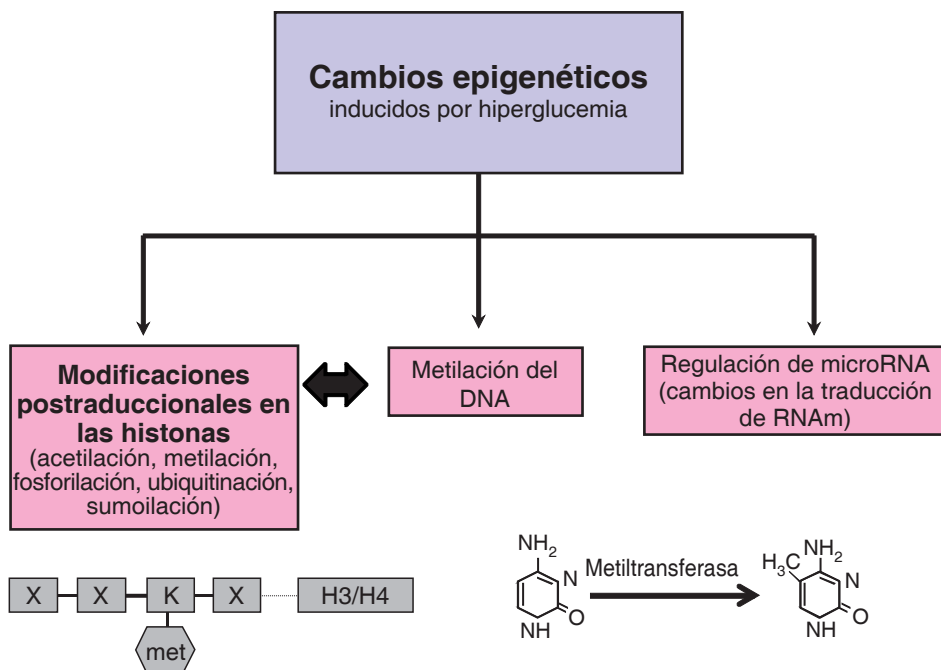


Figura 7.

La hiperglucemia es la condición clave para desencadenar los eventos que cambian la estructura de la cromatina que llevan a cambios en los niveles de expresión génica. Los tres tipos de cambios principales que se dan en los mecanismos epigenéticos son las modificaciones postraduccionales de las histonas, la metilación del DNA y la regulación en los microRNAs. Un ejemplo de una modificación importante (metilación) situado en N terminal de la histona H3 o H4. (X = residuo de aminoácido).

normoglucemia⁽⁷⁸⁾. En los mamíferos, la acetilación produce el desdoblamiento y apertura de la cadena de DNA y el acceso a factores de transcripción. Por lo que altos niveles de acetilación de histonas están asociados con la activación de genes⁽⁷⁹⁾. Las histonas acetil-transferasas (HAT) son las enzimas responsables de la unión de grupos acetilo a varios residuos de lisina en la histonas 3 y 4. Por otro lado, las enzimas histonas desacetilasas (HDAC) eliminan grupos acetilo e inhiben el acceso de los factores de transcripción a la estructura del DNA y por tanto, a la transcripción de genes⁽⁸⁰⁾. Por otro lado, la metilación de las histonas está asociada tanto con la activación de genes como con la inactivación y el resultado final sobre la transcripción es un proceso cooperativo y acumulativo con el reclutamiento de factores de transcripción positivos o negativos adicionales^(69,71,72). En resumen las HAT, las HDAC, las metilasas, las fosforilasas y las ubiquitininasas son enzimas determinantes en las modificaciones del DNA que causan cambios epigenéticos persistentes^(77,79,80) que a su vez, representan un componente importante de la regulación sensible a los factores ambientales. Las modificaciones postraduccionales de las histonas podrían explicar el por qué elevaciones transitorias de glucosa a menudo conducen a complicaciones vasculares diabéticas progresivas. Un tipo común de cambios involucrados en la epigenética es la metilación del ADN (Figura 7). Esta reacción consiste en la metilación del carbono 5 de la citosina generando 5-metilcitosina y es catalizada por enzimas de la familia DNA metiltransferasas⁽⁸¹⁾. La metilación de citosina se ha relacionado con el desarrollo normal y la diferenciación celular⁽⁸²⁾. En los mamíferos la

metilación del DNA se produce en sitios CpG que son regiones de ADN en las que estos dos nucleótidos están unidos por un grupo fosfato en la secuencia lineal de bases a lo largo de su longitud. La notación «CpG» se utiliza para distinguir que estos dos nucleótidos se encuentran en secuencia lineal y para diferenciarlos del apareamiento de bases de la citosina y guanina en la doble cadena de ADN (CG). Los dinucleótidos CpG son poco frecuentes en el genoma, sin embargo, las denominadas «islas CpG» son regiones con una alta frecuencia de sitios CpG y a menudo se encuentran cerca de las regiones promotoras y reguladoras⁽⁸¹⁾. Las islas CpG están relacionadas con la activación de genes de mantenimiento (que son esenciales para las funciones celulares vitales) u otros genes normalmente expresados en una célula. En estas regiones las islas CpG no están metiladas. Por otro lado, en los genes inactivos estas secuencias están generalmente metiladas lo que representa una señal para suprimir su expresión⁽⁸¹⁾. La metilación del DNA de sitios CpG en la región promotora se considera como una marca para inhibir la expresión génica. Sin embargo, un proceso aberrante de metilación del DNA está involucrado en el cáncer y otras enfermedades. Recientemente se ha sugerido la contribución de la metilación del DNA a la etiología de DM1^(83,84). Se han identificado los cambios de metilación específicos para la DM1 en gemelos afectados y no afectados mediante el análisis de metilación en el genoma completo realizado en el DNA de los linfocitos de gemelos monocigotos discordantes y concordantes para la DM1⁽⁸⁴⁾. Otro estudio similar examinó las diferencias en la metilación del DNA global en los principales tejidos implica-

dos en el metabolismo de la glucosa en gemelos monocigotos discordantes de DM2⁽⁸⁵⁾. En este trabajo los autores sugieren que los cambios de metilación de DNA adquiridos en genes promotores en el músculo esquelético o tejido adiposo son cuantitativamente pequeños entre gemelos con y sin DM2. Sin embargo, destacaron los cambios de metilación en el gen PPARGC1A (coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas) en el músculo esquelético y los cambios en el HNF4A (factor nuclear de hepatocitos 4, alfa), en el tejido adiposo⁽⁸⁵⁾. La proteína codificada por PPARGC1A es clave en el control transcripcional de la biogénesis mitocondrial⁽⁸⁶⁾ y la proteína codificada para HNF4A es un factor de transcripción nuclear que controla la expresión de varios genes incluyendo el factor nuclear de hepatocitos 1 alfa, que, a su vez, regula la expresión de varios genes hepáticos. Los autores sugieren que estos genes deben ser estudiados en muestras más grandes ya que se encuentra incrementada su metilación en individuos con DM2⁽⁸⁵⁾. Por lo tanto, la modificación de las histonas por acetilación y metilación pueden ser los principales mecanismos epigenéticos para producir memoria metabólica y deben ser estudiados con más detalle. La epigenética jugó un rol central en el proceso de la evolución actuando como conductor molecular de mutaciones. Los cambios epigenéticos continúan hoy en día ya que los factores ambientales de nuestra vida cotidiana como la dieta y estilo de vida son factores que inducen alteraciones importantes en la expresión genética. La memoria metabólica puede ser la manifestación de aberraciones epigenéticas. Por otra parte, las condiciones como la obesidad, la diabetes gestacional y la desnutrición durante el desarrollo podrían representar otro factor de estrés que influye en la cromatina del feto produciendo «programación metabólica» y que conducen a una mayor incidencia de enfermedad en el adulto a través de cambios epigenéticos. Ambos fenómenos, la memoria metabólica y programación metabólica podrían compartir los mismos mecanismos a nivel epigenético.

Inflamación crónica

La inflamación desempeña un papel clave en la diabetes y sus complicaciones vasculares constituyendo el cuarto mecanismo que conduce a la memoria metabólica. Los mecanismos epigenéticos pueden regular la expresión de genes inflamatorios y la susceptibilidad a la enfermedad cardiovascular incluso en estados no diabéticos. Estos mecanismos pueden acentuarse por las condiciones diabéticas y contribuir a complicaciones aceleradas y finalmente a la memoria metabólica. Todos los factores ambientales que promueven el desarrollo y la progresión de la DM2 desencadenan las siguientes respuestas: una respuesta inflamatoria, promoción de la resistencia a la insulina mediada por inflamación y a la disfunción endotelial. Está bien establecido el papel del factor de necrosis

kappa B (NF- κ B) en la mediación de la expresión de genes inflamatorios. Las condiciones diabéticas pueden promover la expresión de genes inflamatorios a través de la activación de NF- κ B y aumentar la unión de los monocitos a las células musculares lisas vasculares y endoteliales y posteriormente promover la diferenciación de monocitos a macrófagos⁽⁸⁷⁾. La activación de NF- κ B induce la expresión de citosinas proinflamatorias implicadas en la inflamación vascular que estimulan la expresión y presentación de moléculas de adhesión en el endotelio además de otros mediadores que pueden entrar en la circulación en forma soluble⁽⁸⁸⁾. La señalización de los receptores tipo «Toll» (TLR) se ha convertido en un eslabón clave entre la inflamación y el estrés oxidativo y representa un colaborador patogénico que participa en la génesis de la hipertensión arterial, en la resistencia a la insulina y en la obesidad tanto en pacientes humanos y como en modelos animales. Por lo tanto, la activación de TLRs y la desregulación de sus componentes de señalización tienen un papel central en los trastornos vasculares⁽⁸⁹⁾. Se han descrito mecanismos epigenéticos en la expresión de genes proinflamatorios en células de músculo liso vascular, monocitos y en células endoteliales donde se asoció la activación de genes por agentes proinflamatorios con el aumento de acetilación de la lisina de histonas de DNA de estas células mientras que la inhibición de las HDACs aumentó la expresión de genes inflamatorios⁽⁸⁷⁾.

IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

Con estas evidencias ahora es claro que incluso las hiperglucemias relativamente transitorias pueden producir efectos duraderos en el desarrollo y progresión de las complicaciones vasculares de la DM. Parece difícil borrar los cambios inducidos por un ambiente hiperglucémico previo. Las intervenciones tempranas como el cambio de estilo de vida podrían disminuir la producción de EROs en particular en las mitocondrias de las células endoteliales y prevenir la activación de procesos potencialmente dañinos. Las EROs modifican la estructura y función de las proteínas, ácidos nucleicos y las lipoproteínas por modificación covalente, que en última instancia puede explicar el deterioro irreversible. Sin embargo, la DM2 es precedida por un largo período de prediabetes que suele durar unos pocos años. Durante esta fase asintomática los cambios pueden ocurrir sin ser detectados. Con el paso del tiempo, la glucosa alta en sangre puede facilitar de forma pasiva el transporte intracelular insulino-independiente de mayores cantidades de glucosa, especialmente en el endotelio, el sistema inmunológico, y en las células del sistema nervioso central y periférico, produciendo cambios que podrían tener efectos a largo plazo, ya que desencadenan la memoria metabólica. Por lo tanto, el diagnóstico en los primeros años de la DM podría permitir intervenciones, en particular la adopción de un buen control de la glucosa y los cambios en el estilo de

vida que podrían tener un impacto positivo en el proceso de la memoria metabólica; evitando así la disfunción endotelial y las complicaciones vasculares. En este sentido Niter et al. en 2012 reportaron el impacto de una intervención de ejercicio en la metilación del DNA del músculo esquelético de los familiares en primer grado de pacientes con DM2⁽⁹⁰⁾.

La memoria metabólica se caracteriza por varios procesos celulares afectados incluyendo el nivel de EOX, los niveles de AGEs, la programación epigenética y la presencia de un estado inflamatorio. Los medicamentos utilizados para tratar la DM2 son agentes principalmente hipoglucemiantes que regulan la glucosa sanguínea a través de diferentes mecanismos y no previenen o revierten las complicaciones vasculares. Por lo tanto se debe buscar el desarrollo de nuevos fármacos que puedan complementar o potenciar el tratamiento estándar. En la actualidad, la epigenética se considera como un área de estudio^(78,91-94) y se han propuesto fármacos que tienen la capacidad para modular la maquinaria epigenética y podrían ser útiles para el tratamiento de la memoria metabólica^(22-25,95-98). Estos fármacos modulan la actividad de las enzimas que modifican a las histonas, las cuales se encuentran metiladas y por lo tanto podrían rescatar la estructura conformacional normal de la cromatina y revertir los cambios inducidos por la hiperglucemia crónica. Existe la posibilidad que podrían enlentecer, detener o incluso revertir las complicaciones vasculares a largo plazo. Este grupo de medicamentos incluyen a los inhibidores de las HDAC, los inhibidores y activadores de las HAT que representan la terapia más prometedora y actualmente se encuentran en experimentación.

CONCLUSIÓN

La memoria metabólica representa la manifestación de cambios en la expresión genética en una condición inflamatoria crónica y de EOX que se podrían disparar por períodos de hiperglucemia crónica. La hiperglucemia podría afectar simultáneamente la estructura y función de las proteínas celulares produciendo AGEs que inducen la inflamación crónica y el EOX. El orden de los eventos inducidos por la hiperglucemia aún no es entendido totalmente; sin embargo, todos ellos se producen durante períodos críticos de hiperglucemia. El efecto final es la alteración de la expresión génica que explica las alteraciones permanentes que subyacen a las complicaciones de la red vascular y en particular en los vasos de la retina, el riñón y el sistema nervioso. La comprensión del curso temporal de la memoria metabólica representa un tema importante en el área de la diabetes, ya que representa un punto de intervención que podría cambiar las etapas finales de la enfermedad. La memoria metabólica podría explicar muchas observaciones clínicas relacionadas con la DM y su manejo, incluyendo la falta de beneficios en muchos estudios a corto y medio plazo además de la importancia del control intensivo temprano de la glucemia. Si logramos obtener una mayor comprensión de las bases moleculares de la memoria metabólica en la diabetes sin duda tendremos nuevos blancos para la intervención con nuevos fármacos que alteren la regulación de las histonas. Afortunadamente el campo de la terapia epigenética también se está expandiendo y esperamos que nuevos tratamientos para la memoria metabólica emerjan pronto.

REFERENCIAS

1. Sudhakaran S, Surani SR. Guidelines for perioperative management of the diabetic patient. *Surg Res Pract.* 2015;2015:284063. doi: 10.1155/2015/284063.
2. World Health Organization. Noncommunicable diseases country profiles 2014. WHO global report. Available in: <http://www.who.int/nmh/countries/en/>
3. Duncan AE. Hyperglycemia and perioperative glucose management. *Curr Pharm Des.* 2015;18:6195-6203.
4. Stevanovic K, Sabljak V, Toskovic A, et al. Anaesthesia and the patient with diabetes. *Diabetes Metab Syndr.* 2015;9:177-179.
5. Subramaniam B, Pomposelli F, Talmor D, et al. Perioperative and long-term morbidity and mortality after above-knee and below-knee amputations in diabetics and nondiabetics. *Anesth Analg.* 2005;100:1241-1247.
6. Cook G, Gall I. Anaesthetic management of the patient with diabetes. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine.* 2011;12:438-441.
7. Writing Team for the Diabetes Control and Complications/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA.* 2002;287:2563-2569.
8. Writing Team for the Diabetes Control and Complications/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA.* 2003;290:2159-2167.
9. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, et al; Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005;353:2643-2653.
10. Nathan DM, Lachin J, Cleary PA, et al; Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2003;348:2294-2303.
11. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;359:1565-1576.
12. Wright AD. Metabolic memory in type 1 diabetes. *Br J Diabetes Vasc Dis.* 2009;9:254-257.
13. Ceriello A, Ihnat MA, Thorpe JE. The "metabolic memory" - is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:410-415.
14. Rahbar S, Natarajan R, Yerneni K, et al. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. *Clin Chim Acta.* 2000;301:65-77.
15. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Ueda Y, et al. Angiotensin II receptor antagonists and angiotensin-converting enzyme inhibitors lower *in vitro* the formation of advanced glycation end products: biochemical mechanisms. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2478-2487.

16. Yoshida T, Yamagishi S, Nakamura K, et al. Telmisartan inhibits AGE-induced C-reactive protein production through down regulation of the receptor for AGE via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Diabetología*. 2006;49:3094-3099.
17. Ceriello A, Assaloni R, Da Ros R, et al. Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients. *Circulation*. 2005;111:2518-2524.
18. Ceriello A, Piconi L, Esposito K, et al. Telmisartan shows an equivalent effect of vitamin C in further improving endothelial dysfunction after glycemia normalization in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30:1694-1698.
19. Corgnali M, Piconi L, Ihnat M, et al. Evaluation of gliclazide ability to attenuate the hyperglycaemic "memory" induced by high glucose in isolated human endothelial cells. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;24:301-309.
20. Hammes HP, Du X, Edelstein D, et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med*. 2003;9:294-299.
21. Du X, Edelstein D, Brownlee M. Oral benfotiamine plus alpha-lipoic acid normalises complication-causing pathways in type 1 diabetes. *Diabetología*. 2008;51:1930-1932.
22. Takigawa-Imamura H, Sekine T, Murata M, et al. Stimulation of glucose uptake in muscle cells by prolonged treatment with scriptide, a histone deacetylase inhibitor. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003;67:1499-1506.
23. Galmozzi A, Mitro N, Ferrari A, et al. Inhibition of class I histone deacetylases unveils a mitochondrial signature and enhances oxidative metabolism in skeletal muscle and adipose tissue. *Diabetes*. 2013;62:732-742.
24. Crosson CE, Mani SK, Husain S, et al. Inhibition of histone deacetylase protects the retina from ischemic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:3639-3645.
25. Lenoir O, Flosseau K, Ma FX, et al. Specific control of pancreatic endocrine beta- and delta-cell mass by class IIa histone deacetylases HDAC4, HDAC5, and HDAC9. *Diabetes*. 2011;60:2861-2871.
26. Engerman RL, Kern TS. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. *Diabetes*. 1987;36:808-812.
27. Roy S, Sala R, Cagliero E, et al. Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:404-407.
28. Hammes HP, Klinzing I, Wiegand S, et al. Islet transplantation inhibits diabetic retinopathy in the sucrose-fed diabetic rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:2092-2096.
29. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329:977-986.
30. Ceriello A, Esposito K, Ihnat M, et al. Long-term glycemic control influences the long-lasting effect of hyperglycemia on endothelial function in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:2751-2756.
31. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48:643-648.
32. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;359:1565-1576.
33. Lucas A. Programming by early nutrition. An experimental approach. *J Nutr*. 1998;28:401S-406S.
34. Aalinkel R, Srinivasan M, Kalhan SC, et al. A dietary intervention (high carbohydrate) during the neonatal period causes islet dysfunction in rats. *Am J Physiol*. 1999;277:E1061-E1069.
35. Srinivasan M, Aalinkel R, Song F, et al. Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290:E129-E134.
36. Leduc L, Levy E, Bouity-Voubou M, et al. Fetal programming of atherosclerosis: possible role of the mitochondria. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;149:127-130.
37. Thompson JA, Webb RC. Potential role of Toll-like receptors in programming of vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. 2013;125:19-25.
38. Sies H. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. New York: Academic Press; 1991.
39. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142:231-255.
40. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, et al. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med*. 2003;34:1563-1574.
41. Varvarovska J, Racek J, Stozicky F, et al. Parameters of oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus and their relatives. *J Diabetes Complications*. 2003;17:7-10.
42. VanderJagt DJ, Harrison JM, Ratliff DM, et al. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clin Biochem*. 2001;34:265-270.
43. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 2006;52:601-623.
44. Wold LE, Ceylan-Isik AF, Ren J. Oxidative stress and stress signaling: menace of diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;26:908-917.
45. Mohanty P, Hamouda W, Gang R, et al. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2970-2973.
46. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 1997;416:15-18.
47. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, et al. Detection of nitrotyrosine on the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetología*. 2001;4:834-838.
48. Ceriello A, Esposito K, Ihnat M, et al. Long-term glycemic control influences the long-lasting effect of hyperglycemia on endothelial function in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:2751-2756.
49. Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes*. 2003;52:818-823.
50. Kowluru RA, Koppolu P. Termination of experimental galactosemia in rats, and progression of retinal metabolic abnormalities. *Invest Ophthalmol Visc Sci*. 2002;43:3287-3291.
51. Kowluru RA, Kanwar M, Kennedy A. Metabolic memory phenomenon and accumulation of peroxynitrite in retinal capillaries. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007:21976.
52. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, et al. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*. 1996;62:155-169.
53. Schisano B, Tripathi G, McGee K, et al. Glucose oscillations, more than constant high glucose, induce p53 activation and a metabolic memory in human endothelial cells. *Diabetologia*. 2011;54:1219-1226.
54. Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest*. 1991;87:1643-1648.
55. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54:1615-1625.
56. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813-820.
57. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287:R1014-R1030.
58. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107:1058-1070.
59. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404:787-790.
60. Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:1175-1212.

61. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 2004;53:S110-S118.
62. Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antiox Redox Signal*. 2010;12:537-577.
63. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end-products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114:597-605.
64. Maillard LC. Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. *Compt Rend*. 1912;54:66-68.
65. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PH, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation end product accumulation. *Diabetologia*. 2004;47:1324-1330.
66. Stirban A, Gawlowski T, Roden M. Vascular effects of advanced glycation end products: clinical effects and molecular mechanisms. *Molecular Metabolism*. 2014;3:94-108.
67. Monnier VM, Bautista O, Kenny D, et al. Skin collagen glycation, glycooxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c as markers of diabetic complications. DCCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. *Diabetes Control and Complications Trial*. *Diabetes*. 199;48:870-880.
68. Schmidt AM, Hori O, Brett J, et al. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1521-1528.
69. Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2001;11:244-245.
70. Semenkovich CF, Heinecke JW. The mystery of diabetes and atherosclerosis. *Diabetes*. 1997;46:327-344.
71. Aronson D, Rayfield EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol*. 2002;1:1.
72. Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, et al. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol*. 2005;289:F420-F430.
73. Waddington CH. Der epigenotypus. *Endeavour*. 1942;1:18-20.
74. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987;238:63-170.
75. Meagher RB, Müssar JK. The influence of DNA sequence on epigenome induced pathologies. *Epigenetics & Chromatin*. 2012;5:11. doi: 10.1186/1756-8935-5-11.
76. Keating S, El-Osta A. Epigenetic changes in diabetes. *Clin Genet*. 2013;84:1-10.
77. Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, et al. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. *Diabetes*. 2009;58:1229-1236.
78. El Osta A, Brasacchio D, Yao D, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med*. 2008;205:2409-2417.
79. Siebel AL, Fernandez AZ, El-Osta A. Glycemic memory associated epigenetic changes. *Biochem Pharmacol*. 2010;80:1853-1859.
80. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:838-849.
81. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res*. 1980;8:1499-1504.
82. Meissner A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol*. 2010;28:1079-1088.
83. Macfarlane AJ, Strom A, Scott FW. Epigenetics: deciphering how environmental factors may modify autoimmune type 1 diabetes. *Mamm Genome*. 2009;20:624-632.
84. Stefan M, Zhang W, Concepcion E, et al. DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology. *J Autoimmun*. 2014;50:33-37.
85. Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation differences in muscle and fat from monozygotic twins discordant for type 2 diabetes. *PLoS One*. 2012;7:e51302. doi: 10.1371/journal.pone.0051302
86. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res*. 2008;79:208-217.
87. Reddy MA, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. *Cardiovasc Res*. 2011;90:421-429. doi: 10.1093/cvr/cvr024.
88. Guarner V, Rubio-Ruiz ME. Low-grade systemic inflammation connects aging, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Interdiscip Top Gerontol*. 2015;40:99-106.
89. Thompson JA, Webb RC. Potential role of Toll-like receptors in programming of vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. 2013;125:19-25.
90. Nitert MD, Dayeh T, Volkov P, et al. Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012;61:3322-3332.
91. Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, et al. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. *Diabetes*. 2009;58:1229-1236.
92. Pirola L, Balcerczyk A, Tothill RW, Haviv I, Kaspi A, Lunke S, et al. Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells. *Genome Res*. 2011;21:1601-1615.
93. Takizawa F, Mizutani S, Ogawa Y, et al. Glucose-independent persistence of PAI-1 gene expression and H3K4 tri-methylation in type 1 diabetic mouse endothelium: implication in metabolic memory. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;433:66-72.
94. Vecellio M, Spallotta F, Nanni S, et al. The histone acetylase activator pentadecylidenemalonate 1b rescues proliferation and differentiation in human cardiac mesenchymal cells of type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2014;63:2132-2147. doi: 10.2337/db13-0731.
95. Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, et al. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int J Mol Sci*. 2013;14:17643-17663.
96. Lewis EC, Blaabjerg L, Storling J, et al. The oral histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces cytokines and protects islet beta cells *in vivo* and *in vitro*. *Mol Med*. 2011;17:369-377.
97. Tedong L, Madiraju P, Martineau LC, et al. Hydro-ethanolic extract of cashew tree (*Anacardium occidentale*) nut and its principal compound, anacardic acid, stimulate glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54:1753-1762.
98. Halili MA, Andrews MR, Labzin LI, Schroder K, Matthias G, Cao C, et al. Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J Leukoc Biol*. 2010;87:1103-1114.