

Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus

José D. Méndez*

Recepción versión modificada 7 de septiembre del 2002; aceptación 17 de septiembre del 2002

Resumen

Objetivo: Revisar en la literatura los avances de la investigación científica en el área de diabetes y sus complicaciones con énfasis particular en el papel que juegan los productos finales de la glicación avanzada (AGEs) en la fisiopatología de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.

Materiales: Se hizo una selección de los artículos más relevantes sobre este tema, entre los obtenidos en una búsqueda en la base de datos MEDLINE que comprendió de 1985 al 2000.

Resultados: La hiperglucemia causa complicaciones irreversibles macro y microvasculares entre las que se incluyen retinopatía, nefropatía, aterosclerosis, y enfermedad cerebrovascular. Hay evidencia suficiente de que la glicación conduce a modificaciones químicas de proteínas y otras macromoléculas y que esto contribuye a la patogénesis de las complicaciones diabéticas. Se han identificado varios AGEs y sus receptores correspondientes. La inhibición de la formación de AGEs está bajo intensa investigación a fin de prevenir las complicaciones diabéticas. De todos los inhibidores, las amadorinas parecen tener mayor potencial terapéutico.

Conclusiones: Se sabe que un grupo heterogéneo de AGEs se forma por glicación. El mecanismo de formación se ha dilucidado parcialmente, lo que ha dificultado la identificación del producto o los productos precisos que ocasionan el daño in vivo, y también el desarrollo de inhibidores específicos.

Palabras clave: Diabetes mellitus, glucosa, glicación, productos finales de glicación avanzada, complicaciones crónicas

Summary

Objective: To review the literature on the advanced glycation end products (AGEs) in diabetes, with especial interest on their role in the pathophysiology of the chronic complications of diabetes mellitus.

Materials: Representative papers were selected through a computer MEDLINE search from 1985 to 2000.

Results: Hyperglycemia causes irreversible microvascular and macrovascular complications, including retinopathy, neuropathy, nephropathy, atherosclerosis and cerebrovascular disease. There is evidence that glycation leads to chemical modification of proteins, and other macromolecules and it contributes to the pathogenesis of diabetic complications. Several AGEs and their receptors have been identified. The inhibition of AGE formation is under intensive investigation to prevent diabetic complications. From several inhibitors studied, Amadorins offer great therapeutic potential.

Conclusions: It is known that a heterogeneous group of AGEs is formed by glycation. The mechanism of AGE formation is partially understood, making it difficult to identify the precise chemical products responsible for in vivo damage and also to develop specific inhibitors.

Key words: Diabetes mellitus, glucose, glycation, advanced glycation end products, chronic complications

* Investigador Titular A, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas, 4º. Piso. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional SXXI, IMSS.

Introducción

Los mecanismos celulares y bioquímicos que llevan a las complicaciones a largo plazo de la diabetes mellitus no se han entendido totalmente. Sin embargo, diversos estudios clínicos morfológicos y bioquímicos han proporcionado suficientes evidencias para considerar que la hiperglucemia —que resulta de la deficiencia absoluta o relativa de insulina— es el factor que determina el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.¹ Esto ha conducido al desarrollo tanto de regímenes de tratamiento intensivo para el diabético, como de medidas preventivas. Desafortunadamente, cuando las complicaciones ya se han presentado el mejoramiento del control glucémico por sí solo puede no ser suficiente para evitar el avance de los procesos patológicos. De aquí ha surgido la necesidad de contar con agentes farmacológicos capaces de interferir el avance del daño a los tejidos iniciado por la hiperglucemia. Pero esto no se puede lograr sin el entendimiento de los mecanismos bioquímicos que permiten el progreso de las complicaciones, por lo que este aspecto es motivo de intensas investigaciones.

Desde 1984 se propusieron dos mecanismos que explican de manera general cómo la hiperglucemia conduce al daño tisular irreversible.² Se sabe que por el mayor flujo a través de diferentes rutas metabólicas, la hiperglucemia celular puede dar como resultado niveles alterados de metabolitos y productos de síntesis que afectan de manera negativa la función celular. Este mecanismo explica los cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de glicoproteínas y proteoglicanos de la membrana basal glomerular, las alteraciones bioquímicas en la composición de la mielina de los nervios periféricos y las alteraciones en la secreción de algunas hormonas, como la hormona del crecimiento.³ Un ejemplo que ilustra este mecanismo es la vía de los polioles.⁴ En el cristalino y en los nervios, dos tejidos que no requieren de insulina para el transporte de glucosa, el aumento en la actividad de esta vía de consumo de glucosa ha sido implicado en el desarrollo de la catarata diabética y neuropatía periférica temprana. El incremento en la actividad de la vía de los polioles da como resultado varios cambios metabólicos que incluyen niveles disminuidos de glutatión, mioinositol y de equivalentes reductores como la forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH+H). Estos cambios sin duda influyen en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes.

Otra consecuencia de la hiperglucemia, que se considera la más importante, es la unión excesiva de glucosa a las proteínas, mejor descrita como glucosilación no enzimática de proteínas. Los productos que se forman son estables y se acumulan dentro de las células que no dependen de insulina, pero también se acumulan

fuera de la célula y se unen a proteínas de la membrana plasmática, a proteínas circulantes y a proteínas estructurales. La formación de hemoglobina glucosilada dentro de los eritrocitos es el mejor ejemplo de la glucosilación no enzimática de proteínas y de que ésta ocurre *in vivo*.⁵

En este artículo se describen los principales procesos fisiológicos alterados por glucosilación no enzimática y se considera su posible relación con las complicaciones crónicas de la diabetes desarrolladas a largo plazo. Se discuten los avances de las investigaciones sobre nuevas terapias farmacológicas enfocadas hacia la prevención de las complicaciones de la diabetes mellitus. Otros mecanismos bioquímicos por los cuales la hiperglucemia pudiera contribuir a estas complicaciones no se consideran en esta revisión.

Con la finalidad de aclarar algunos aspectos relacionados con la formación de productos de glucosilación no enzimática, definida como glicación, se hace una descripción breve de algunos aspectos históricos que condujeron al descubrimiento de estos productos que actualmente se conocen con el nombre colectivo de productos finales de glicación avanzada (AGEs).

Antecedentes sobre AGEs y su definición

Las primeras observaciones sobre las reacciones entre carbohidratos y aminoácidos datan de 1912. Fue el francés Louis-Camille Maillard quien describió la formación de productos café-oscuro o amarillo marrón (productos de Maillard) por calentamiento de una mezcla de carbohidratos y aminoácidos.⁶ A través de los años las investigaciones sucesivas sobre la naturaleza química de la reacción de Maillard llevaron a plantear un esquema general que explica las transformaciones que ocurren por la reacción de diversos carbohidratos con aminoácidos, y también con proteínas y con otras biomoléculas.⁷

La formación de productos de Maillard comienza con la reacción de los grupos amino de las proteínas, particularmente los grupos amino de la cadena lateral de lisina, arginina e histidina, con carbohidratos reductores que incluyen a la glucosa, fructosa, triosas y sus correspondientes derivados fosforilados. Esta modificación se denominó "glucosilación no enzimática," "glicación (porque no se requiere la mediación de enzimas)" o "reacción de Maillard," que en el caso de la glucosa conduce en horas a la formación reversible de una base de Schiff (reacción entre el grupo amino de la lisina y el carbonilo de la glucosa). Esta base de Schiff se transforma en un compuesto más estable, una cetoamina o fructosamina conocida como producto de Amadori, lo que ocurre en días. Después, a través de subsecuentes rearrreglos moleculares, que incluyen reacciones de deshidratación, condensación, oxidación y ciclización; procesos

que llevan semanas o meses, se forma un grupo heterogéneo de productos fluorescentes y café obscuro, llamados productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés).

Los AGEs pueden formarse por medio de reacciones oxidativas y no oxidativas. Las reacciones oxidativas pueden ser aceleradas significativamente por metales de transición como el cobre y el hierro. En esta reacción de glicooxidación además de los AGEs unidos a proteínas, también se forman productos dicarbonílicos y radicales libres de oxígeno muy reactivos. Los metales de transición también pueden oxidar monosacáridos directamente en solución para formar productos dicarbonílicos que después forman enlaces entrecruzados con proteínas a través de un proceso llamado "glicación auto-oxidativa". Entre los carbohidratos relevantes fisiológicamente la glucosa es la menos reactiva lo que se asocia con su selección evolutiva como el principal proveedor de energía.⁸

En tecnología de alimentos, muchos productos aromáticos y saborizantes que se forman durante la preparación de los alimentos son productos de Maillard. Muchas de las estructuras químicas han sido identificadas y correlacionadas con un sabor u olor particular y actualmente se trabaja en el mejoramiento de las propiedades de los alimentos procesados.

Importancia médica de la glicación

Desde el punto de vista médico, se ha implicado a la glicación en varias patologías, específicamente en diabetes mellitus,⁹ y enfermedades neurodegenerativas amiloides como la enfermedad de Alzheimer,¹⁰ pero también en procesos normales de envejecimiento.¹¹

La diabetes mellitus, caracterizada por hiperglucemia, se asocia con complicaciones micro y macrovasculares irreversibles que incluyen retinopatía, neuropatía, nefropatía aterosclerosis y enfermedad cerebrovascular.¹² Entre varios mecanismos propuestos, hay evidencias que indican que la glicación conduce a modificaciones químicas de las proteínas que contribuyen a la patogénesis de las complicaciones diabéticas,^{13,14} aún más se ha reportado una relación inversa entre el control estricto de la hiperglucemia y la severidad de las complicaciones de la diabetes.¹⁵ Esto se asocia con el hecho de que el mayor daño en pacientes diabéticos ocurre en tejidos y órganos ricos en colágena y donde la entrada de glucosa no es regulada por insulina, tal es el caso del riñón, retina y endotelio vascular, esto apoya fuertemente la hipótesis de la glicación. Varios mecanismos han sido propuestos por los cuales la glicación conduce a las complicaciones diabéticas, aunque su relativa contribución está todavía por elucidarse. Se sabe que un grupo

heterogéneo de AGEs se forma por glicación secuencial y por reacciones de glicooxidación.¹⁶ Algunos AGEs como carboximetil-lisina¹⁷ y pentosidina¹⁸ han llegado a ser útiles marcadores de daño glicooxidativo.¹⁹ Otros AGEs aún no identificados parecen inducir estrés oxidativo, y conducir así a citotoxicidad.

Propiedades químicas y biológicas de los AGEs

La glicación ocurre preferentemente con las proteínas, pero también ocurre con otras biomoléculas que presentan grupos funcionales capaces de reaccionar con el grupo aldehído de la glucosa, tal es el caso de los lípidos²⁰ y de los ácidos nucleicos²¹. De aquí, la importancia de analizar las propiedades químicas y biológicas de los AGEs:

Formación de AGEs con proteínas.

In vivo el daño por glucosa puede surgir directamente de la formación de complejos con proteínas.²² Durante el tiempo de vida de las proteínas celulares y plasmáticas los productos tempranos de Amadori están en equilibrio con la glucosa durante períodos de horas a días y no evolucionan a estructuras más complejas que requieren de semanas. En contraste, la formación de estructuras complejas que resultan de la transformación de los productos de Amadori ocurren constante y espontáneamente con proteínas con vida media larga, formándose así los AGEs. Éstos incluyen diversas estructuras, algunas de las cuales ya son entrecruzadas (no reactivas) mientras que otras están en el punto intermedio o en la fase tardía y son capaces de formar entrecruzamientos. Así, diversos aductos que se forman durante la exposición a glucosa de una proteína dada pueden evolucionar a diferentes velocidades para formar AGEs entrecruzados dependiendo de las condiciones microambientales como pH, carga local etc.²³

Proteínas con vida media corta. La glicación comienza en todos los casos con la unión de la glucosa a los grupos amino de las proteínas para formar una base de Schiff, esta base rápidamente alcanza un equilibrio que refleja el nivel de glucosa en ese medio. La velocidad de formación de la base de Schiff es igual a su velocidad de disociación. En un período de semanas ocurre un rearrreglo químico que da como resultado un producto de Amadori, compuesto estable formado entre la glucosa y la proteína (químicamente estos compuestos se llaman aductos).²⁴ Después de que se ha alcanzado el equilibrio, los valores de la concentración de los productos de Amadori se hacen constantes y no se incrementan en función del tiempo. La química de la glicación *in vivo* ha

sido ampliamente estudiada utilizando como modelo la hemoglobina humana.²⁵

Aunque se piensa que la glicación pudiera no ocurrir en un gran número de enzimas porque la mayoría de ellas tienen vidas medias relativamente cortas, las bases de Schiff se forman rápidamente en condiciones fisiológicas y una elevada concentración de estos compuestos *in vivo* podría alterar significativamente la función catalítica de algunas enzimas.

Proteínas con vida media larga. Las proteínas estructurales como la colágena, elastina, las proteínas de la vaina de mielina y las proteínas del cristalino, tienen un tiempo de recambio mucho más lento que la hemoglobina, por eso acumulan productos de glicación que se forman por transformación de los productos de Amadori.²⁶ Estos productos se forman muy lentamente a partir de una serie de transformaciones químicas descritas anteriormente y participan en entrecruzamientos proteína-proteína.²⁷ La estructura de estos compuestos es compleja e irreversible, de modo que se acumulan en proporción con la vida media de la proteína. Uno de los primeros productos de glicación formado en condiciones fisiológicas y del que se determinó su estructura fue el 2-furoil-4(5)-(2-furanil)-1-H-imidazol (FFI),²⁸ que es producto de la condensación de dos productos de Amadori. En la actualidad se conoce la estructura de varios AGEs. Entre ellos se pueden mencionar el 1-alkil-2-formil-3,4-diglucosil pirrol o N¹-carboximetil-lisina, la pirralina y la pentosidina.²⁹ La detección de productos de glicación en diversas macromoléculas biológicas ha sido posible por el uso de técnicas espectroscópicas de fluorescencia, e inmunohistoquímicas.³⁰⁻³²

Tanto *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado la glicación en una gran variedad de proteínas cuya función es bien conocida, entre éstas se pueden mencionar además de la hemoglobina, al fibrinógeno, la fibrina, proteínas de la arteria coronaria, lipoproteínas de baja y alta densidad, albúmina y otras.³

Formación de AGEs con lípidos

Cuando los lípidos como la fosfatidil-etanol-amina se incuban con glucosa, se forman productos liposolubles con propiedades e inmunorreactividad característica de AGEs^{33,34}. Esta formación de AGEs está asociada con la oxidación de ácidos grasos. En contraste, los lípidos que carecen de grupos amino libres como la fosfatidil-colina no reaccionan con la glucosa, y no son capaces de formar productos de oxidación, lo que señala a la glucosa como mediador primario de la oxidación de ácidos grasos *in vivo*.

Otros estudios han demostrado que la glucosa es capaz de formar AGEs tanto con la parte lipídica, como con la parte proteínica de las lipoproteínas.³⁴ Estas

observaciones han sido corroboradas con lipoproteínas de baja densidad (LDL), aisladas de pacientes diabéticos, que revelan la formación de AGEs tanto en la fracción lipídica como en la apoproteína B, componente proteínico de esta lipoproteína.³⁵ Esta información apoya la idea de que las reacciones de glicación juegan un papel importante en la oxidación de lípidos y en la aterogénesis *in vivo*.

Formación de AGEs con ácidos nucleicos

Aunque los grupos amino primarios de los nucleótidos son químicamente menos reactivos hacia los carbohidratos reductores que el grupo amino de la lisina. Se ha observado glicación de las bases nitrogenadas que constituyen a los ácidos nucleicos la cual provoca anomalías en el patrón del DNA.³⁶ Por otro lado, las propiedades espectroscópicas y fluorescentes de derivados AGEs-DNA son similares a las observadas en las proteínas glicadas. La información que existe sobre los efectos de la glicación en los ácidos nucleicos, específicamente en el DNA, proviene de estudios de transfección de material genético viral a *Escherichia coli*, en los que se ha visto una pérdida potencial de transfección atribuida a la glicación del DNA.

Por su larga vida media, se piensa que *in vivo* el DNA podría acumular de manera progresiva productos de glicación, específicamente AGEs. Tal acumulación podría ser responsable de los cambios dependientes de la edad en el material genético que incluyen aberraciones cromosómicas, ruptura de cadenas del DNA y una declinación en los procesos de reparación, replicación, y transcripción.³⁷ En condiciones de hiperglucemia estos procesos pueden acelerarse y dar como resultado un "envejecimiento celular" temprano. La glicación de los ácidos nucleicos puede también ser responsable del aumento en la frecuencia de anomalías congénitas en niños de madres diabéticas. La exposición del embrión a altas concentraciones de glucosa podría conducir a una mayor reacción de la glucosa con el DNA, en etapas críticas del desarrollo, que causaría ruptura cromosómica y mutagénesis. Sin embargo, aunque las malformaciones congénitas son 2 a 3 veces más frecuentes en infantes de madres con diabetes, todavía no se propone un mecanismo definitivo que explique este hecho.

Receptores de AGEs (RAGEs)

La degradación de proteínas extracelulares modificadas por AGEs requiere que éstos sean reconocidos por receptores específicos (RAGEs),³⁸ que se internalice el complejo AGE-RAGE y que ocurra el procesamiento proteolítico

del AGE-ligando. Inicialmente los AGEs fueron vistos como una "señal específica" para el reconocimiento de moléculas senescentes.³⁹ Investigaciones subsecuentes han demostrado que las proteínas modificadas por AGEs también son estímulos para la activación celular asociada con un aumento en la expresión de proteínas de la matriz extracelular, moléculas de adhesión vascular, citocinas y factores de crecimiento.^{40,41} Dependiendo del tipo de célula y señal concurrente este producto AGE-proteína, se asocia con quimiotaxis, angiogénesis, estrés oxidativo y proliferación celular, o muerte celular programada.⁴² Se piensa que estos procesos contribuyen a los mecanismos de la enfermedad relacionados con las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus: retinopatía, neuropatía, y nefropatía,⁴³ cataratas⁴⁴, enfermedad macrovascular⁴⁵ e insuficiencia renal.⁴⁶

Se conocen varios RAGEs y proteínas que unen AGEs. Dos proteínas que unen AGEs con pesos moleculares de 35 y 80 kD, fueron aisladas de pulmón de bovino. La proteína de 80 kD es idéntica a la lactoferrina y se le llamó proteína-parecida a la lactoferrina (LF-L)⁴⁷. La proteína de 35 kD es un fragmento proteolítico de una proteína de 42 kD que junto con una cadena de oligosacáridos tiene un peso de 45 kD. Esta proteína de 45 kD fue descrita como el receptor para los AGEs (RAGE) y es un nuevo miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas.⁴⁸

El RAGE del humano tiene un dominio extracelular en forma de V, de 320 aminoácidos con dos oligosacáridos unidos, una región transmembranal de 21 aminoácidos y un dominio citoplásmico corto de 41 aminoácidos. Estas proteínas receptoras se expresan en células endoteliales, células de músculo liso vascular, miocitos cardiacos, monocitos, migroglía y neuronas. En la mayoría de los tejidos se han detectado por técnicas inmunológicas dos RAGEs, uno de 35 kD y otro de 45 kD, en el cerebro se encuentran dos isoformas; una de 23 kD y otra de 48 kD. Se cree que las isoformas surgen de distintos procesamientos postraduccionales.⁴⁹

Actualmente se investiga el fragmento proteolítico de 35 kD del dominio extracelular, al que se denominó RAGE soluble (sRAGE) que se ha usado como un ligando para proteínas modificadas por AGEs y como un agente farmacológico para prevenir efectos vasculares de la diabetes experimental *in vivo*.⁵⁰

Inhibición de la formación de AGEs

Aminoguanidina

Las consecuencias patológicas de la formación de puentes intercatenarios de los AGEs pueden prevenirse si se bloquean los productos iniciales de glicación. Sin embar-

go, el desarrollo de inhibidores específicos para la formación de AGEs se ha visto imposibilitado por la complejidad de las reacciones involucradas en su formación y la diversidad de productos formados.

Varios compuestos se encuentran en estudio. Desde principios de siglo, Maillard propuso la administración terapéutica de aminoácidos tales como la alanina, para que al reaccionar con la glucosa contrarrestara las consecuencias potencialmente deletéreas de la hiperglucemia.

La aminoguanidina fue introducida como un reactivo de hidrazina para atrapar grupos carbonilo reactivos formados durante la reacción de Maillard, especialmente los productos de Amadori, evitando así su conversión a AGEs.

La aminoguanidina ha mostrado ser químicamente más reactiva que el grupo épsilon-amino de la lisina de las proteínas, debido a esto, existe la hipótesis de que así podrían obtenerse productos tempranos de glicación avanzada no reactivos, y que de esta manera se impediría la formación de AGEs.

Los experimentos iniciales *in vitro*, han demostrado que la aminoguanidina inhibe efectivamente la formación de AGEs, ya que bloquea los grupos carbonilo reactivos de los compuestos de Amadori y de sus derivados (3-desoxiglucosona y glucoaldehído), evitando así la formación de puentes intercatenarios entre las proteínas solubles del plasma y la colágena, de la colágena con ella misma y de puentes que inducen a la formación de enlaces entre proteoglicanos y colágena, fibroconectina y membrana basal.

Por otra parte, la aminoguanidina tiene baja acción tóxica ($DL_{50}=1800$ mg/kg) al menos en roedores y no interfiere con la formación normal de uniones o puentes producidos por acción enzimática.

Experimentalmente se ha demostrado también que tanto la formación de AGEs con fosfolípidos, como la oxidación de ácidos grasos que ocurre simultáneamente es inhibida por aminoguanidina.³⁴ La aminoguanidina también inhibe la oxidación de ácidos grasos que ocurre vía malondialdehído, esto se observó al incubar LDL con cobre en lugar de glucosa, en presencia de aminoguanidina.³⁵

La aminoguanidina y otras sustancias similares han mostrado efectos positivos en la inhibición de la formación de AGEs, pero también tienen potencial de toxicidad o efectos colaterales adversos, ya que pueden reaccionar con otros grupos carbonilo como los del fosfato de piridoxal, forma activa de la vitamina B₆.

Amadorinas

Recientemente se describió una serie de inhibidores capaces de impedir la conversión de los productos de Amadori a AGEs.⁵¹ Estas sustancias se denominaron

“Amadorinas,” de las cuales la piridoxamina (piridonina) fue elegida como el primer miembro de esta clase de inhibidores, se está investigando su potencial terapéutico y por ahora ha dado mejores resultados que la aminoguanidina en diferentes modelos animales.

Conclusiones

Cada vez son mayores las evidencias respecto al papel que desempeñan los AGEs consecutivos a la hiperglucemia crónica en la génesis de las complicaciones de la diabetes mellitus.

Se sabe que la hiperglucemia es una de las principales causas del desarrollo de las complicaciones, pero aún no se conocen los mecanismos precisos.

En la actualidad se conocen numerosos compuestos conocidos como AGEs, tal es el caso de la pentosidina, pirralina, y desoxiozonas. A través de la interacción con sus receptores (RAGEs) se están estudiando sus acciones.

Por el momento podemos decir que para prevenir la aparición de complicaciones es deseable evitar la glicación mediante una terapia capaz de lograr valores de euglucemia o próximos a ella, y que esto se realice a partir del diagnóstico oportuno de la diabetes.

Referencias

- Brownlee M, Cerami A.** The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem.* 1981; 50:385-432.
- Brownlee M, Vlassara H, Cerami A.** Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Int Med.* 1984;101(4):527-537.
- Green DA.** Metabolic abnormalities in diabetic peripheral nerve: relation to impaired function. *Metabolism* 1983;32: 118-123.
- Clements RS Jr.** The role of abnormal polyol metabolism in diabetic complications. En: Brodoff BN, Bleicher SJ. *Diabetes Mellitus and Obesity.* Baltimore Williams and Wilkins USA, 1982, pp 117-128.
- Koenig RJ, Cerami A.** Hemoglobin A_{1c} and diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 1980; 31:29-34.
- Monier VM.** Toward a Maillard reaction theory of aging. In: *The Maillard reaction in aging, Diabetes, and Nutrition.* Baynes JW, Monier VM. Eds. *Progress in Clinical and Biological Research* Vol. 34 Alan R. Liss, Inc. New York. 1989. Pp 1-22.
- Miller JA, Gravallesse E, Bunn HF.** Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins: relevance to diabetes. *J Clin Invest* 1980;65:896-901.
- Munch G, Colaco C.** Towards a new age of the chemistry and pathophysiology of the Maillard reaction. *Cell Mol Biol.* 1998; 44(7):ix-x.
- Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lions TJ, McCance DR, Baynes JW.** Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1993;91:2463-2469.
- Vitek MP, Bhattyacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A.** Advanced glycation endproducts contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4766-4770.
- Frie EB, Dehenhart TP, Thorpe SR, Baynes JW.** Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. *J Biol Chem.* 1998;273(30):18714-18919.
- Hanssen KF, Dahl-Jorgensen K, Lauritzen T.** Diabetic control and microvascular complications: The near normoglycemic experience. *Diabetología* 1986; 29:677-684.
- Brownlee M, Cerami AJ, Vlassara H.** Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1988;318:1315-1321.
- Baynes JW.** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991;40:405-412.
- Portero-Otin M, Pamplona R, Bellmunt MJ, Bergua M, Prat J.** Glycaemic control and *in vivo* non oxidative Maillard reaction: urinary excretion of pyrraline in diabetes patients. *Eur J Clin Invest.* 1997;27:767-773.
- Fu MX, Wells-Knecht KJ, Blackledge JA, Lions TJ, Thorpe SR, Baynes JW.** Glycation glycooxidation and crosslinking of collagen by glucose: kinetics, mechanisms and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes* 1994;43:676-683.
- Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baynes JW.** Oxidation of glycated proteins: age dependent accumulation of N-(carboxymethyl) lysine in lens proteins. *Biochemistry* 1990;28:9464-9468.
- Grandhee SK, Monnier VM.** Mechanism of formation of the Maillard protein crosslink pentosidine. Glucose, fructose and ascorbate as pentosidine precursors. *J Biol Chem* 1991; 266:11649-11653.
- Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW.** Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine *in vivo.* *J Biol Chem.* 1991;266:11654-11660.
- Bucala R, Makita Z, Koschinski T, Cerami A, Vlassara H.** Lipid advanced glycosylation. Pathway for lipid oxidation *in vivo.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6434-6438.
- Petes TD, Farber RA, Tarrant GM, Holliday R.** Altered rate of DNA replication in aging human fibroblast cultures. *Nature* 1974;251:434-436.
- Monier VM, Cerami A.** Nonenzymatic glycosylation and browning of proteins *in vivo.* En: *Maillard reaction in foods and nutrition.* American Chemical Society Symposium Series No. 215 Washington DC, The American Chemical Society 1983. pp 431-439.
- Dier DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bilie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW.** Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1993;91:2463-2469.
- Monier VM, Cerami A.** Nonenzymatic glycosylation and browning of proteins *in vivo.* In: *The Maillard reaction in foods and nutrition.* Waller GR, Feather MS (Eds.) American Chemical Society Symposium Series No. 215. The American Chemical Society. Washington DC. 1983, pp 431-439.
- Higgins PJ, Bunn HF.** Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem.* 1981;256:5204-5208.
- Reser KM.** Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Exp Biol Med.* 1991;196(1):17-29.
- Sell DR, Monier UV.** End-stage renal disease and diabetes catalyzed deformation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *J Clin Invest.* 1990;75:380-384.
- Vlassara H.** Recent progress on the biologic and clinical significance of advanced glycosylation end products. *J Lab Clin Med.* 1994;19-30.

29. **Westwood ME, Thornalley PJ.** Glycation and advanced glycation endproducts. In: *The Glycation Hypothesis of Atherosclerosis*. Colaco C (Ed.) Landes Bioscience and Chapman & Hall. New York, USA 1997, pp 57-87.
30. **Brinkmann EB, Dehenhard TP, Thorpe SR, Baynes JW.** Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. *J Biol Chem* 1998;273(30):18714-18719.
31. **Pongor S, Ulrich PC, Bencsath A, Cerami A.** Aging of proteins: Isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Biochemistry* 1984;81: 2684-2688.
32. **Miyata HK, Yasuda T, Takeda A, Yasuda Y, Maeda K, Sobue G, Kurokawa K.** Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236:327-332.
33. **Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H.** Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9441-9445.
34. **Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cherami A, Vlassara H.** Lipid advanced glycosylation. Pathway for lipid oxidation *in vivo*. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1993;90:6434-6438.
35. **Picard S, Parthasathy S, Fruebis J, Witztum JL.** Aminoguanidine inhibits oxidative modification of low density lipoprotein and the subsequent increase in uptake by macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1991; 89:6876-6880.
36. **Bucala R, Model P, Cerami A.** Modifications of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:105-109.
37. **Price GB, Modak SP, Makinodan T.** Age-associated changes in the DNA of mouse tissue. *Science* 1971;171:917-920.
38. **Thornalley PJ.** Cell activation by glycated proteins. Age receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol* 1998;44(7):1013-1023.
39. **Vlassara H, Brownlee M, Cerami A.** High-affinity receptor-mediated uptake and degradation of glucose modified proteins: A potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1985; 82:5588-5592.
40. **Schmidt A-M, Hori M, Chen JX, Li JF, Carndall J, Zjang J, Cao R, Yan DS, Brett J, Stern D.** Advanced glycation end products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) in cultured human endothelial cells in mice. *J Clin Invest* 1995; 96:1395-1403.
41. **Abordo EA, Westwood ME, Thornalley PJ.** Synthesis and secretion of macrophage colony stimulating factor by mature human monocytes and human serum albumin derivatives modified with methyl glyoxal and glucose-derived advanced glucose endproducts. *Immunol Lett* 1996; 53:7-13.
42. **Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H.** Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of PDGF: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9010-9014.
43. **McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Baiue KE, Thorpe SR, Baynes JW, Lyons TJ.** Maillard reactions products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993;91:2470-2478.
44. **Lyons TJ, Silvestri G, Dunn DG, Baynes JW.** Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and non-diabetic senile cataracts. *Diabetes* 1991;40:1010-105.
45. **Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A, Bucala R.** Exogenous advanced glycosylation endproducts induce complex vascular dysfunction in normal animals: A model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:12043-12047.
46. **Miyata T, Oda O, Inagi R, Lida Y, Araki N, Yamada N, Horiuchi S, Taniguchi N, Maeda K.** b2-Microglobulin modified with advanced glycation endproducts is a major component of haemodialysis-associated amyloidosis. *J Clin Invest* 1993;92:1242-1252.
47. **Schmidt A-M, Mora R, Cao R, Yan S-D, Brett J, Ramakrishnan R, Tsang TE, Simionescu M, Stern D.** The endothelial binding site for advanced glycation endproducts consist of a complex: An integral membrane protein and a lactoferrin-like polipeptide. *J Biol Chem* 1994;269:9882-9888.
48. **Neper M, Schmidt A-M, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan Y-CE, Elliston K, Stern D, Shaw A.** Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation endproducts of proteins. *J Biol Chem* 1992;267:14998-15004.
49. **Brett J, Schmidt A-M, Yann SD, Zou S, Weideman E, Pinsky D, Nowygrod R, Neeper M, Przysiecki C, Shaw A, Migheli A, Stern D.** Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation endproducts in tissues. *Am J Pathol* 1993;143:1699-1712.
50. **Renard C, Cappey O, Wautier MP, Nagashima M, Lundh ER, Morser J, Zhao L, Schmid A-M, Schermann J-M, Wautier JL.** Recombinant advanced glycation endproduct receptor pharmacokinetics in normal and diabetic rats. *Mol Pharmacol* 1997;52:54-62.
51. **Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG.** Amadorins: Novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:251-258.