

Glicación y entrecruzamiento de proteínas en la patogénesis de la diabetes y el envejecimiento

Mario Cárdenas-León,* Eulises Díaz-Díaz,* Rabindranath Argüelles-Medina,*
Patricia Sánchez-Canales,* Vicente Díaz-Sánchez,* Fernando Larrea*

* Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Glycation and protein crosslinking in the diabetes and ageing pathogenesis

ABSTRACT

Long exposition to hyperglycemia is associated with development of vascular diseases in diabetic patients. Many of these effects are mediated by non-enzymatic glycosylation (glycation) of proteins and formation of advanced glycation end-products (AGEs). This phenomenon is accelerated in conditions where glucose concentration is chronically high, as it happens in diabetes mellitus. AGE formation is associated with structure-function alterations of proteins such as collagen, and particularly in tissues where these products are accumulated. A number of studies have demonstrated that AGEs can act as mediators, not only for the development of chronic complications of diabetes, but also in those related to ageing, nephropathy, Alzheimer's disease and erectile dysfunction, among others. In this paper, information generated about formation and accumulation of AGEs, including its biological effects and their participation in the development of complications in diabetes mellitus and other process such as ageing is revised. In addition, therapeutic strategies and a new methodology to measure glycation products are also considered.

Key words. *Advanced glycation end-products (AGEs). Glycation. Non-enzymatic glycosylation. Hyperglycemia. Diabetes. RAGE.*

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónico-degenerativa, caracterizada por concentraciones persistentemente elevadas de glucosa en la sangre. Constituye un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares, incluyendo, la insuficiencia cardíaca y problemas circulatorios y es

RESUMEN

Diversos estudios han establecido que la exposición prolongada a la hiperglucemia es el factor primario asociado con el desarrollo de enfermedades vasculares en pacientes diabéticos. La evidencia sugiere que muchos de estos efectos son mediados por la glucosilación no enzimática (o glicación) de proteínas que lleva a la formación de los llamados productos finales de glucosilación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés). Este proceso se acelera en condiciones en que la concentración de glucosa se mantiene elevada por tiempos prolongados, como ocurre en la diabetes mellitus, alterando la estructura y función de proteínas como la colágena, así como de los tejidos en los cuales estos productos se acumulan. Los resultados experimentales demuestran que los AGEs pueden actuar como mediadores, de la patogénesis de las complicaciones crónicas de la diabetes y de patologías relacionadas con el envejecimiento, tales como nefropatía, Alzheimer y disfunción eréctil. En este artículo se revisa la información que a la fecha se ha generado en relación con la formación y acumulación de AGEs, sus efectos biológicos, su participación en las complicaciones asociadas a la diabetes y al envejecimiento, las estrategias terapéuticas para evitar o corregir los daños causados por estos productos y la estandarización de métodos para medir su concentración.

Palabras clave. Productos finales de glucosilación avanzada (AGEs). Glicación. Glucosilación no enzimática. Hiperglucemia. Diabetes. RAGE.

también causa principal de ceguera y pérdida de la función renal. La incidencia de diabetes, particularmente tipo 2, se ha incrementado de manera alarmante y se estima que para el año 2010 habrá alrededor de 221 millones de personas diabéticas en el mundo, con el consecuente impacto económico y psicosocial.¹ La diabetes es actualmente la primera causa de muerte en la población mexicana. La pato-

génesis de las complicaciones de la diabetes mellitus es a la fecha un aspecto muy importante en la investigación sobre esta enfermedad.

La vejez es una etapa de la vida que abarca una sucesión de cambios en distintos procesos bioquímicos, determinando alteraciones estructurales y funcionales en los diversos tejidos del organismo. El aumento de la expectativa de vida ha originado el envejecimiento de la población humana y por consiguiente un incremento relativo de las enfermedades asociadas a éste.²

Los azúcares, sobre todo la glucosa, reaccionan de manera no enzimática con proteínas, desencadenando una serie de reacciones que finalmente llevan a la formación de AGEs. La tasa de producción de AGEs se incrementa en condiciones en las que como la diabetes, los niveles de glucosa permanecen elevados. Como consecuencia, la glucosilación no enzimática modifica de manera irreversible a las proteínas, principalmente aquéllas de vida media larga como la colágena, las cuales se acumulan modificando a su vez la arquitectura y propiedades funcionales de los tejidos; entre éstos, el de la membrana basal de los vasos sanguíneos. En este sentido, diversos estudios experimentales sugieren que los AGEs tienen un papel muy importante en las complicaciones asociadas a la diabetes y al envejecimiento, como: nefropatía, retinopatía, Alzheimer, disfunción eréctil y testicular, aterosclerosis, neuropatía, disminución de la elasticidad cutánea y fibrosis pulmonar.³⁻¹⁷

ENLACE ENTRE HIPERGLUCEMIA, ENVEJECIMIENTO Y SUS COMPLICACIONES

La fuente de energía celular más importante es la glucosa, ésta se almacena como glucógeno, principalmente en el hígado. El glucógeno se moviliza y se convierte en glucosa por la glucogenólisis, cuando la concentración de glucosa sanguínea es baja. Las células beta del páncreas producen la hormona insulina, en respuesta a niveles altos de glucosa. La insulina favorece la incorporación de glucosa, hacia

el interior de las células, para que éstas la utilicen como combustible, manteniendo a la vez la concentración de glucosa en la circulación, dentro del parámetro normal. En la diabetes tipo 1, el páncreas no produce o produce muy poca insulina, en la diabetes tipo 2, las células no responden normalmente a la insulina que se produce, condición conocida como resistencia a la insulina. En ambos casos se evita o dificulta la entrada de glucosa en las células musculares y adipocitos, que normalmente son las principales consumidoras de glucosa, aumentando sus niveles en la sangre (hiperglucemia). Por el contrario, en el resto de las células, que no requieren de insulina para el ingreso de la glucosa, se produce un incremento en la concentración de glucosa intracelular (hiperglucemia intracelular).

Durante el envejecimiento ocurren cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos, entre otros. Posiblemente, muchos de estos cambios son efectos acumulativos de las lesiones y afectaciones que ha ido sufriendo el individuo a lo largo de la vida, que lo llevan a desarrollar patologías características de la vejez.

Mucho se desconoce acerca de las vías bioquímicas que relacionan la hiperglucemia crónica y el envejecimiento, con el daño a los tejidos y sus alteraciones morfofuncionales. Se han propuesto varios mecanismos como responsables para explicar esta relación. En la hiperglucemia:

- Aumento en la actividad de la vía de los polioles o del sorbitol.
- Hiperactividad de la proteína cinasa C.
- Activación de la vía de las hexosaminas.
- Incremento en la formación y depósito de AGEs.^{18,19}

En el envejecimiento, se ha propuesto el incremento en la formación y depósito de AGEs. Se considera que cada una de estas vías participa en el daño tisular, de manera específica. Asimismo, todas ellas están en estrecha relación con la generación de especies reactivas de oxígeno, por lo que el in-

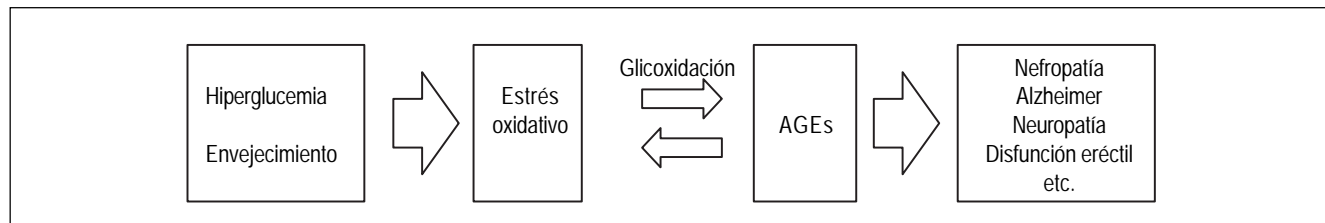


Figura 1. Enlace entre hiperglucemia, envejecimiento y sus complicaciones. El enlace está constituido por el estrés oxidativo y la formación de AGEs, entre otros. Estos dos factores son, a su vez, conducidos recíprocamente por el proceso de glicoxidación.

cremento en el estrés oxidativo, también ha sido propuesto, tanto en la hiperglucemia como en el envejecimiento.^{2,20,21}

De acuerdo con lo anterior y a los conceptos que mencionaremos más adelante, se considera que el enlace entre la hiperglucemia y el envejecimiento, con el daño a los tejidos, está constituido entre otros, por el incremento del estrés oxidativo y la excesiva producción y acumulación de AGEs,²²⁻²⁴ como se describe en la figura 1.

FORMACIÓN DE AGEs

La glucosilación no enzimática es una modificación postraducciona de las proteínas. Fue descubierta por el químico francés Louis-Camille Maillard en 1912,²⁵ estudiando la pérdida de lisina en los alimentos conservados cuando éstos son ricos en proteínas y glúcidos. La glucosilación no enzimática o reacción de Maillard y recientemente llamada glicación, modifica las propiedades fisicoquímicas de las proteínas y consecuentemente su actividad biológica. Se debe a la reacción entre el grupo carbonilo de azúcares reductores como la glucosa, fructosa, galactosa, manosa y ribosa, con los grupos amino libres, principalmente con el amino terminal y con los de lisina y arginina, en ese orden de reactividad y sin la participación de enzimas.²⁶⁻²⁸ El primer producto generado es una aldimina denominada base de Schiff, y se forma en unas cuantas horas. En la base de Schiff ocurre el reacomodo interno de la doble ligadura para formar una cetoamina, llamada producto de Amadori o fructosamina, la cual alcanza el equilibrio en pocos días.²⁹⁻³² Estas dos reacciones son reversibles y consecutivas. La hemoglobina glucosilada (HbA1c) es un producto de Amadori y se utiliza para monitorear el control de la glucemia en pacientes diabéticos.

Una vez formados los productos de Amadori, éstos sufren una serie de reacciones de deshidratación, eliminaciones β -sucesivas, condensación y oxidación,³²⁻³⁴ generándose un grupo heterogéneo de residuos o aductos unidos a proteínas llamados productos finales de glucosilación avanzada (AGEs, por *Advanced Glycosylation End-Products* o *Advanced Glycation End-Products*).³⁵ Este último proceso es irreversible y toma semanas o meses, por lo que ocurre principalmente sobre proteínas de vida media larga como las que forman parte de la matriz extracelular, entre éstas, colágena, elastina, mioglobina, mielina y cristalina.^{30,36,37}

Otras vías derivadas de la reacción de Maillard llevan también a la producción de AGEs, en muchos

casos a través de reacciones de oxidación. Así pues, en el proceso de glicación de proteínas, la formación de muchos de los AGEs incluye reacciones de oxidación, llamadas en conjunto glicoxidación, por lo que el incremento de estrés oxidativo acelera la formación de estos productos. La glicoxidación, a su vez, contribuye al estrés oxidativo.^{2,21-24,38,39}

En las vías alternas para la formación de AGEs, participan la glucosa, los α -hidroxialdehídos (gliceraldehído y glicolaldehído) y los compuestos dicarbonilo intermediarios u oxoaldehídos, altamente reactivos (glioxal [GO], metilglioxal [MGO] y 3-desoxiglucosona), generando seis diferentes clases de estructuras AGEs (AGE-1-AGE-6). Éstos se clasifican en dos grupos, uno de ellos asociado a toxicidad celular que incluye a los AGEs derivados de gliceraldehído (AGE-2) y de glicolaldehído (AGE-3), denominados AGEs tóxicos (TAGE, por *Toxic AGEs*). El otro grupo formado por los AGEs no tóxicos, derivados de glucosa tales como AGE-1, carboximetil lisina (CML), carboxietil lisina (CEL), pentosidina, pirralina y crosslina, así como los derivados a partir de MGO, GO y 3-desoxiglucosona (AGE-4, AGE-5 y AGE-6, respectivamente), llamados hidroimidazolones (Figura 2). Estos últimos, a su vez, forman los correspondientes productos de entrecruzamiento o dímeros de lisina: GOLD, MOLD y DOLD.^{40,41}

La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo y el que más participa en las reacciones de glicación, aunque a una tasa más lenta que otros carbohidratos. En la circulación sanguínea se encuentra mayoritariamente la glucosa, que es en este sentido, el azúcar menos tóxico, lo que representa una ventaja evolutiva para todas las especies.^{42,43} Por otro lado, la glicación ocurre preferentemente en los grupos amino libres de las proteínas, pero también con los de otras biomoléculas como las apolipoproteínas, las lipoproteínas de baja densidad (LDL), los lípidos y los ácidos nucleicos, a este respecto, el daño por glicación del ADN se ha asociado con mutagénesis y carcinogénesis.^{44,45}

Los AGEs modifican las proteínas sobre las cuales se producen. Estas proteínas modificadas, al formarse sobre ellas los AGEs, se denominan proteínas-AGE, específicamente, la albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés), la ribonucleasa y la colágena, se denominan BSA-AGE, RNAsa-AGE y colágena-AGE, respectivamente. Todas ellas han sido sintetizadas *in vitro* y utilizadas en una gran variedad de estudios experimentales.^{4,8,11,46,47}

Los AGEs son de naturaleza y origen endógeno; sin embargo, también se pueden adquirir a partir de fuentes exógenas como por ejemplo: el humo del ta-

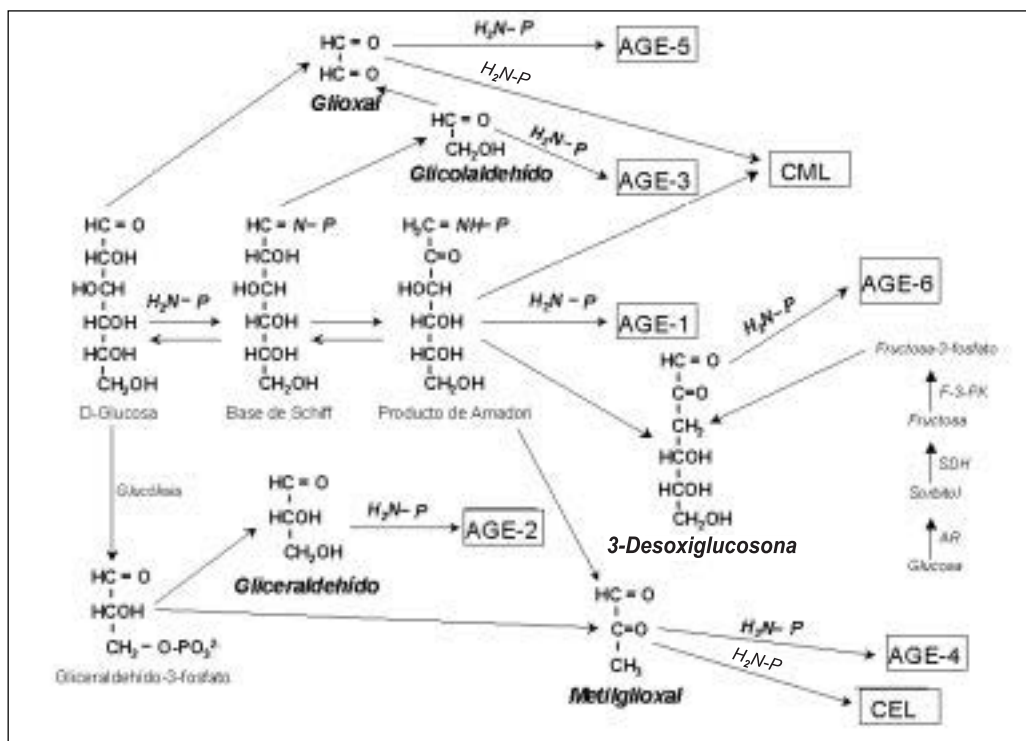


Figura 2. Formación de AGEs. A través de la reacción de Maillard y de vías derivadas de ésta, se producen diferentes tipos de AGEs: a partir de la descomposición del producto de Amadori (AGE-1), del gliceraldehído derivado de la base de Schiff (AGE-3), del metilglicoxal (AGE-4), del glicoxal producido por la autoxidación de glucosa (AGE-5), y rearreglo de 3-desoxiglucosona (AGE-6). Asimismo, carboximetil lisina (CML) y carboxietil lisina (CEL) = residuos amino libres de las proteínas; AR = aldosa reductasa; SDH = sorbitol deshidrogenasa; F-3-PK = fructosa-3-fosfoquinasa.

baço y algunos alimentos y bebidas procesados. A este respecto, Goldberg, et al.⁴⁸ demostraron que la cocción a altas temperaturas (asar, freír, rostizar) incrementa significativamente el contenido de AGEs en los alimentos, mientras que a baja temperatura (hervir, cocinar al vapor), por tiempos cortos y con abundante cantidad de agua, el contenido de AGEs es menor. Estos autores observaron además que la digestión de dichos AGEs exógenos o glicotoxinas, libera a la circulación péptidos-AGE capaces de formar enlaces covalentes con otras proteínas, favoreciendo su acumulación en los tejidos.

ESTRUCTURA DE AGEs

Los AGEs son compuestos estructuralmente heterogéneos, además de inestables y reactivos. Muchos de estos productos son fuertemente pigmentados y algunos de ellos fluorescentes, asimismo, algunos tienen la propiedad de formar entrecruzamientos AGE-AGE.

Entre los diferentes tipos de AGEs (Figura 3), la CML y la pentosidina (productos de glicoxidación),^{34,40,49-52} son los que más comúnmente se forman tanto *in vitro* como *in vivo*,^{17,53,54} ya que han sido detectados en varios tejidos,⁵⁶ particularmente la CML.^{16,55} La CML se forma a partir del producto de Amadori de glucosa o treosa, a través de fragmen-

tación oxidativa catalizada por metales y por autoxidación de la glucosa o ascorbato y también por una vía lipoxidativa.⁵⁶⁻⁵⁸ La pentosidina es un producto de entrecruzamiento entre lisina y arginina, es fluorescente, y se forma a partir de precursores carbohidratos, incluyendo glucosa, ribosa, ácido ascórbico y 3-desoxiglucosona.^{59, 60} Asimismo, un producto AGE denominado arginina-lisina imidazol (ALI), no fluorescente y sensible a ácidos, fue aislado y caracterizado recientemente. Al parecer ALI constituye el AGE más abundante que se forma tanto *in vitro* como *in vivo*.⁶¹

Los estudios realizados a la fecha, sugieren que los AGEs conocidos constituyen sólo una pequeña fracción de aquellos que se producen *in vivo*.⁶² Además, se considera que muchos AGEs patológicamente importantes no son fluorescentes ni pigmentados ni forman entrecruzamientos con otras proteínas, y que únicamente constituyen biomarcadores de AGEs más dañinos que se forman en el organismo.⁵¹ Al respecto Sato, et al.⁴¹ plantean que los TAGEs son en realidad los que tienen un papel importante en los procesos patofisiológicos asociados con la formación de AGEs, entre ellos las complicaciones de la diabetes.

A pesar de los avances, se desconocen en gran medida, tanto los procesos que llevan a la formación de AGEs *in vivo*, como la estructura de los mismos;

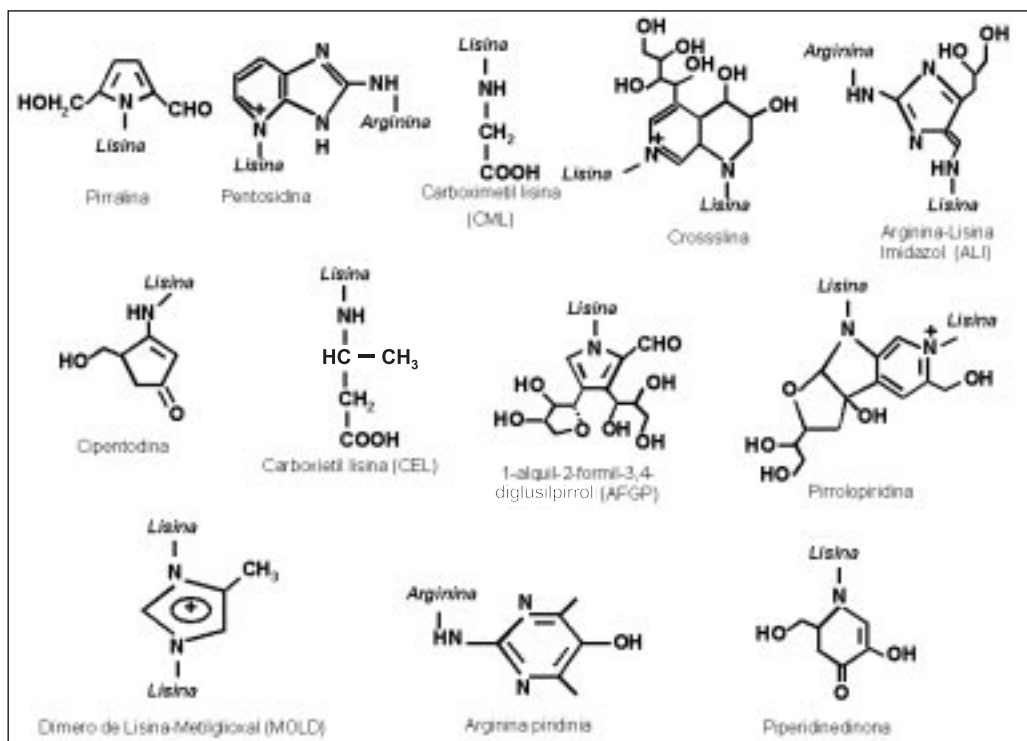


Figura 3. Estructura química de varios AGEs y sus nombres triviales.

sin embargo, se considera que los AGEs obtenidos *in vitro* bajo condiciones similares a las fisiológicas, comparten epítopes y dominios comunes con las proteínas modificadas por AGE *in vivo*.

RECEPTORES DE AGEs

Los receptores para AGEs han sido identificados en la superficie de macrófagos, células endoteliales, células mesangiales, fibroblastos, células del epitelio glomerular (podocitos), y neuronas, entre otras. El papel preciso de los receptores de AGEs, en los eventos patológicos no es claro y actualmente existe controversia de cuales promueven o limitan la disfunción de órganos y tejidos. A la fecha se han descrito dos grupos de receptores: uno representado por RAGE asociado con estrés oxidativo, crecimiento y procesos inflamatorios, a través de vías de señalización intracelular y el otro relacionado con los procesos de degradación y eliminación de AGEs, así como de resíntesis de las proteínas eliminadas por esta vía. Este último grupo incluye al receptor carroñero de macrófagos clase A tipos I y II (MSR-AI, -AII) y clase B tipo I (MSR-BI) y CD36, oligosacaril transferasa-48 (OST-48 o AGE-R1), fosfoproteína 80K-H (AGE-R2), galectina-3 (AGE-R3), FEEL-1 y FEEL-2, lisozima, lactoferrina y lipoproteína de baja densidad semejante a lectina oxidasa-1 (LOX-1).⁶³⁻⁷⁰

RAGE es un receptor transmembranal de 35 kDa, perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas de superficie.^{18,65,71} Consiste de cinco dominios estructurales: el dominio citosólico de 43 aminoácidos, responsable de la transducción de la señal intracelular, el dominio transmembrana que participa en el anclaje del receptor a la membrana, dos dominios constantes y uno variable en el extremo NH₂ responsable de la unión al ligando.^{65,72} Se han identificado numerosas isoformas de RAGE. Una de éstas, pierde el dominio citosólico, pero se mantiene anclado a la membrana, se llama RAGE dominante negativo (DN-RAGE) y es incapaz de activar vías de señalización intracelular, después de unirse al ligando. Otras isoformas de RAGE carecen de los dominios transmembrana e intracelular, éstas constituyen el dominio extracelular soluble del receptor, por lo que se cree que son formas secretadas y se les denomina RAGE soluble (sRAGE), que incluye al RAGE endógenamente secretado (esRAGE) (Figura 4). Estas formas heterogéneas de sRAGE son secretadas a la circulación y participan en la captura de productos de glicación avanzada, funcionando como receptores señuelo, por su capacidad de neutralizar o inhibir los efectos dañinos de los AGEs.⁷³⁻⁷⁵

Varios autores han evaluado la relación entre la concentración sérica de sRAGE, así como específicamente de esRAGE y diversas enfermedades vascu-

lares y metabólicas. La concentración de estas isoformas solubles ha resultado elevada, en algunos padecimientos y baja en otros.⁷⁴ Por lo tanto, la posibilidad de utilizar esta medición como un factor diagnóstico o terapéutico, depende de la enfermedad que se trate.⁷⁶⁻⁷⁸

ACUMULACIÓN DE AGES

La información hasta la fecha indica que bajo condiciones normales, la generación de AGEs tiene un papel importante en la remoción de proteínas y remodelación de los tejidos. Los AGEs se forman a una tasa constante, pero lenta en condiciones fisiológicas, iniciándose en el desarrollo embrionario con acumulación progresiva, por lo que se encuentran en exceso durante las etapas de envejecimiento. En la insuficiencia renal se observa la acumulación plasmática de AGEs, por falla en sus mecanismos de eliminación. En la diabetes en donde las concentraciones de glucosa se mantienen elevadas por tiempos prolongados, la producción y acumulación de AGEs ocurre a una tasa mayor, así como sus efectos deletéreos,^{18,32,40,79} y su asociación con las complicaciones crónicas de esta enfermedad,^{3,8,20,62,80-83} incluyendo la severidad en las mismas.^{4,11,50,84-86}

Las proteínas-AGE se localizan en el plasma, en el interior de macrófagos y células endoteliales, así como en la matriz extracelular.^{20,32,62,72} Su acumulación ocurre preferentemente en la pared arterial, en

nervios periféricos, en el mesangio glomerular y la membrana basal glomerular y de otros capilares. Por el contrario, los productos de Amadori como la hemoglobina glucosilada se comportan de manera diferente y no se acumulan indefinidamente, ya que en ellos participan proteínas de menor vida media, con tasas de degradación y eliminación más rápidas.

Así pues, la formación y depósito de AGEs ocurre en diversos órganos, entre éstos, riñón, cristalino, retina, cerebro, piel, ovario, intestino, pulmón y corazón.^{5,6,20,87,88} Asimismo, en tejido peneano y testicular se observa acumulación de AGEs con elevada expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).⁸⁹⁻⁹¹ Estas observaciones sugieren a la glicación de proteínas como parte de la fisiopatología de la disfunción eréctil que se observa en la diabetes y en el adulto mayor.

PAPEL DE LOS AGES EN LAS COMPLICACIONES DE LA DIABETES Y EL ENVEJECIMIENTO

Como se mencionó previamente, los AGEs y sus consecuencias patogénicas se producen y acumulan en función de la edad; sin embargo, en la diabetes éstos ocurren más rápidamente. Por tales motivos se considera a la diabetes como un proceso de envejecimiento acelerado. De esta manera, muchas de las complicaciones ligadas a la diabetes mellitus (cata-

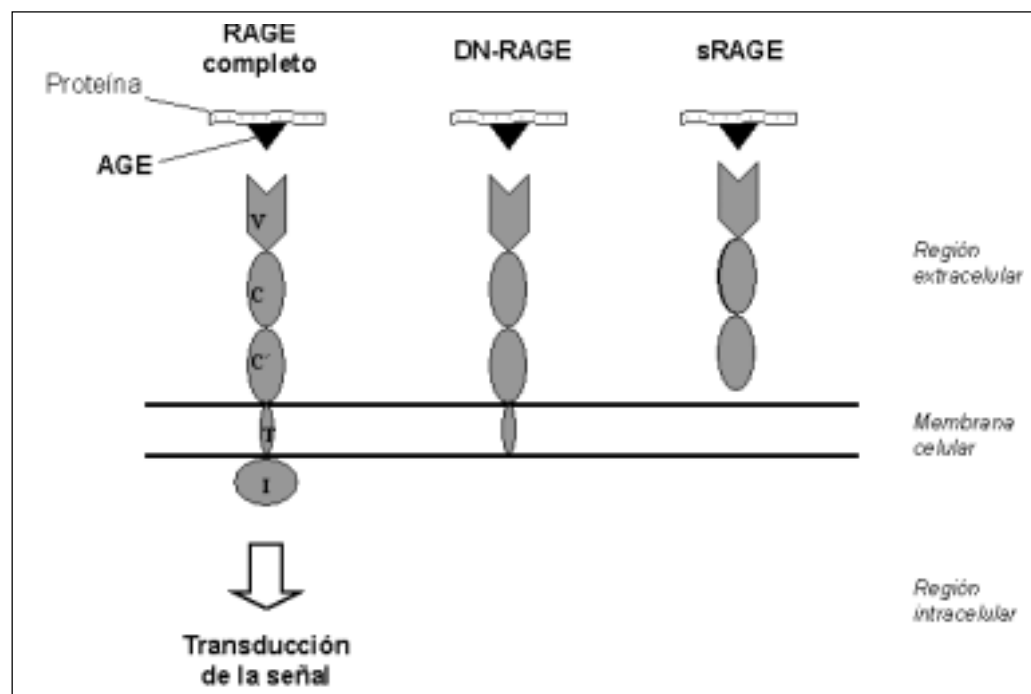


Figura 4. Estructura de RAGE. Se muestran el receptor completo, con sus dominios: citosólico o intracelular (I), transmembrana (T), constantes (C y C') y variable (V). Asimismo, las isoformas DN-RAGE y sRAGE.

ratas, hipertensión, aterosclerosis, disfunción eréctil, insuficiencia renal, artritis, retinopatía, neuropatía y Alzheimer) son prevalentes en sujetos de edad avanzada. Por esta razón, se considera a la glicación de proteínas como uno de los factores asociados al envejecimiento.⁹²

Los precursores en la formación de AGEs *in vivo* y su relevancia fisiológica fueron descubiertos por primera vez a mediados de los años 70s, sobre la hemoglobina.⁹³ Se considera que la HbA1c no se relaciona con daño en los tejidos; sin embargo, Cohen y Ziyadeh⁹⁴ informaron que la albúmina-Amadori se encuentra asociada con el desarrollo de nefropatía en el diabético. En 1981 Monnier y Cerami²⁹ reconocieron el significado de la formación de AGEs, en las complicaciones propias de la diabetes y el envejecimiento. Son estos productos de glicación avanzada y los entrecruzamientos que generan, los que se considera están relacionados con la alteración morfofuncional de los tejidos. De manera similar, los AGEs contribuyen a la eventual disfunción y muerte neuronal como factores importantes en la progresión de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson,^{87,95} sobre todo dada la detección de productos de glicación en el cerebro de estos pacientes.

Entre los mecanismos a través de los cuales los AGEs producen daño a órganos y tejidos, se encuentran los siguientes:

1. Modificación de proteínas estructurales extracelulares y formación de entrecruzamientos.

2. Generación de procesos de señalización intracelulares a través de la unión a receptores de membrana.
3. Modificación de proteínas intracelulares.

Modificación de proteínas estructurales extracelulares y formación de entrecruzamientos

Uno de los mecanismos por los cuales los AGEs afectan a los tejidos, se relaciona con cambios en la estructura y función de la matriz extracelular. Una de las causas es que, como se observó al incubar tendón de cola de rata con ribosa, la glicación de colágena disminuye su capacidad de asociación con otras moléculas del mismo tipo, asimismo, provoca expansión del empaquetamiento molecular, lo cual interfiere con el correcto ensamblaje de los tejidos.⁹⁶ La glicación de la colágena o cualquier otra proteína de la matriz extracelular favorece, a su vez, la generación de entrecruzamientos AGE-AGE, a través de enlaces covalentes, formando estructuras dicarbonilo. Los entrecruzamientos se producen entre diferentes zonas de la misma proteína, o bien entre diferentes proteínas. Éstos no sólo se forman entre proteínas de la matriz extracelular, sino también con proteínas del plasma, que bajo condiciones normales son de vida media corta (albúmina, inmunoglobulinas y lipoproteínas de baja densidad). Estos productos de entrecruzamiento forman aglomerados insolubles y resistentes a proteasas, produciendo engrosamiento de la membrana basal e hipertrofia de la matriz

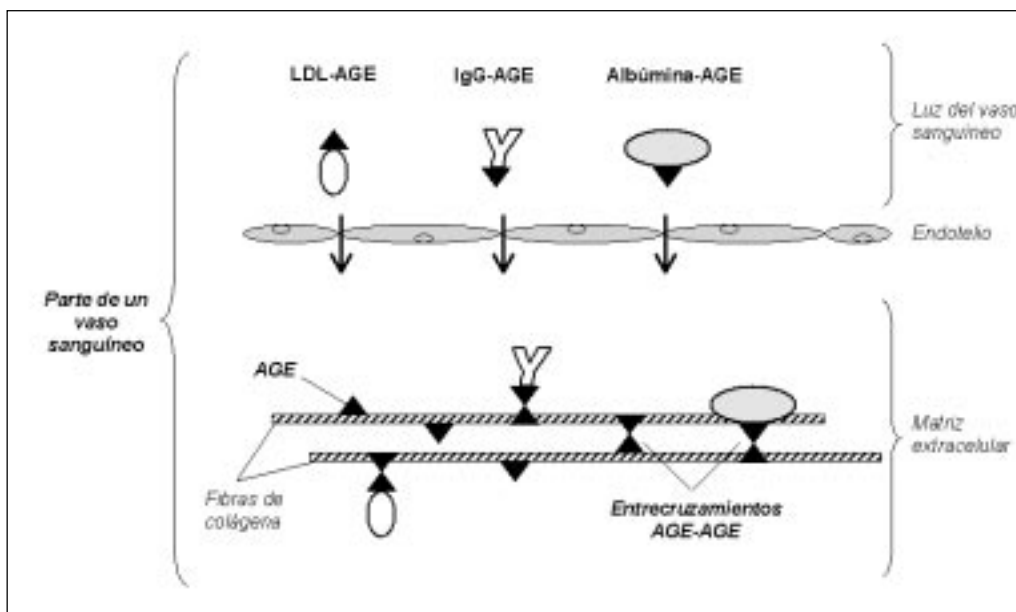


Figura 5. Formación y acumulación de AGEs sobre proteínas de la matriz extracelular. Proteínas como la colágena pueden ser glicadas y formar entrecruzamientos entre ellas y con proteínas circulantes, quedando éstas últimas atrapadas. Se forman aglomerados resistentes a la degradación, propiciando la hipertrofia de la matriz extracelular.

extracelular, en los vasos sanguíneos, entre otros^{31,44,97,98} (Figura 5).

En condiciones de hiperglucemia, la capacidad de las proteínas-AGE para unirse a otras proteínas puede continuar aún después de que la concentración de glucosa regrese a los valores de referencia. Esta observación sugiere que la corrección del estado hiperglucémico no detiene el daño tisular e indica que el aumento en las concentraciones de glucosa ejerce un impacto fisiológico a largo plazo, a través de sus efectos sobre la glicación y entrecruzamiento de proteínas.^{28,99}

En los capilares sanguíneos, el engrosamiento de la membrana basal es característica de las alteraciones microvasculares de la retina y el glomérulo, entre otros, en la diabetes, lo cual trae como consecuencia aumento de la permeabilidad y reducción de la luz y la flexibilidad vasculares, estado protrombótico y disminución del flujo sanguíneo.^{17,97} Asimismo, los AGEs promueven padecimientos macrovasculares. Al respecto, niveles elevados de AGEs se asocian con el incremento de enfermedad arterial coronaria en sujetos con diabetes tipo 2,^{47,100} aterosclerosis y glomerulosclerosis.¹⁰ En el daño macrovascular, la formación de AGEs provoca defectos en la respuesta vasodilatatoria e incremento de la permeabilidad.³²

Se postula que en el riñón del paciente diabético, la acumulación de AGEs en la matriz extracelular glomerular contribuye a la nefropatía diabética.⁶⁰ Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que en el caso de la nefropatía diabética, la formación de AGEs en la colágena tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos heparán sulfato, proteínas que forman parte de la membrana basal glomerular, altera la estructura de ésta.^{18,101} Dichas moléculas, a su vez, son las que aportan la carga negativa a la membrana basal que evita el paso de proteínas. Estos cambios traen como consecuencia la pérdida de las propiedades de filtración selectiva de la membrana basal glomerular y, por lo tanto, la incapacidad del glomérulo por retener proteínas, lo cual resulta en proteinuria. Así, pues, se considera que el riñón normal elimina eficientemente los AGEs circulantes, pero que en la disfunción renal, y particularmente en asociación con la diabetes, estos productos se acumulan en el suero.⁴ Por lo tanto, en la nefropatía diabética ocurre una alta tasa de producción de AGEs y éstos, a su vez, no son eliminados adecuadamente por el riñón, lo cual exacerba el daño.

La participación de los AGEs en la progresión de la nefropatía diabética se ha demostrado al administrar estos productos de manera prolongada a ratas y ratones no diabéticos y observar que desarrollaron

cambios morfofisiológicos similares a dicha enfermedad, entre ellos proteinuria.^{102,103}

Generación de procesos de señalización intracelulares a través de la unión a receptores de membrana

Se considera que muchos de los efectos patológicos de los AGEs se generan a través de su unión a los receptores específicos.

Como se ha estudiado en células endoteliales, la interacción de AGE con RAGE, en particular con los TAGEs,⁴¹ activan vías de señalización intracelular, que incluyen la proteína cinasa C y las MAP cinasas, entre otras. Éstas inducen la generación de especies reactivas de oxígeno, vía activación de la NADPH oxidasa, disfunción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y depleción de glutatión reducido (GSH) y vitamina C.¹⁰⁴⁻¹⁰⁸ Estas señales, aunadas al incremento de estrés oxidativo, llevan a la activación del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B, el cual, a su vez, después de translocarse al núcleo, incrementa la transcripción entre otras, de interleucina-1 α e interleucina-6 (IL-1 α , IL-6), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), endotelina-1, selectina-E, las moléculas de adhesión, vascular-1 (VCAM-1) e intercelular-1 (ICAM-1) y el propio RAGE. Asimismo, la unión de AGE con RAGE disminuye la producción de óxido nítrico (NO), al reducir la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).^{72,106,109,110}

El incremento del estrés oxidativo, a través de estos procesos, favorece la ocurrencia de cambios potencialmente dañinos en la expresión génica, misma que modifica la función celular por la inducción de respuestas inflamatorias, vasoconstricción y expresión de genes protrombóticos, eventos relacionados con disfunción endotelial y aterosclerosis.^{10,32,64,79,111,112}

Estas observaciones sugieren fuertemente la participación del complejo AGE-RAGE en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes.¹¹³

La unión de AGEs con receptores del tipo carroñero en macrófagos, asociada al proceso de captura y degradación de proteínas-AGE, estimula la producción y liberación de citocinas y factores de crecimiento, tales como IL-1, TNF- α , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Éstos, a su vez, inducen la proliferación celular y la síntesis de proteínas, que podrían favorecer el reemplazo de las proteínas afectadas por AGEs y la reparación de los tejidos^{66,97,114} (Figura 6).

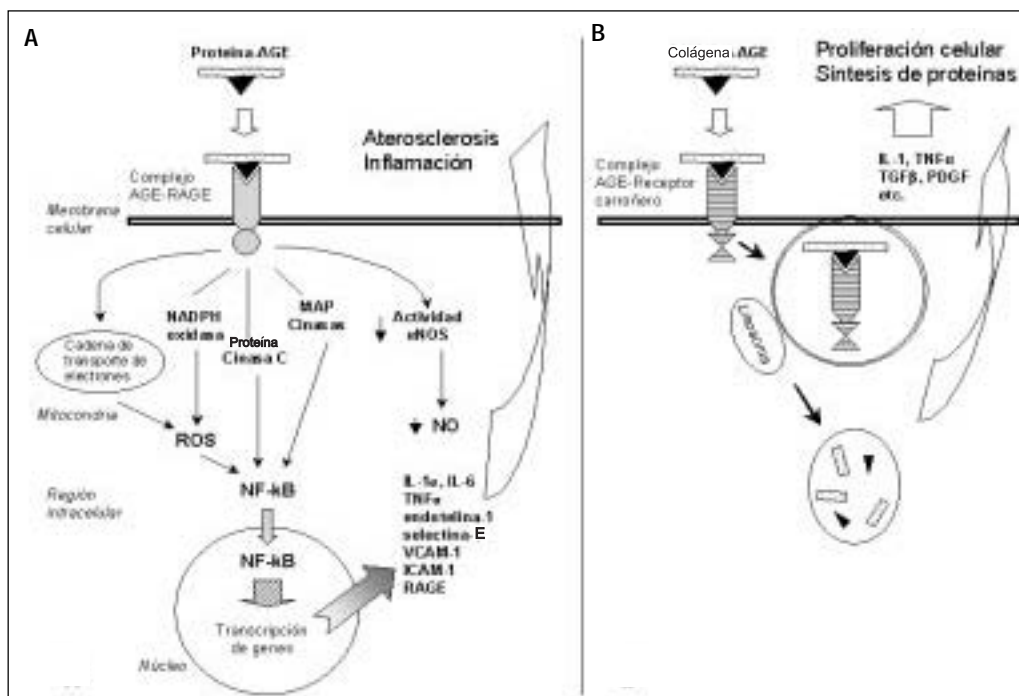


Figura 6. Efectos de AGEs a través de receptores de membrana. **A.** La interacción AGE-RAGE activa vías de señalización intracelular que llevan entre otras, a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), disminución del óxido nítrico (NO), activación de NF- κ B y transcripción de citocinas, moléculas de adhesión celular y RAGE. La combinación de estos procesos lleva a reacciones de inflamación y aterosclerosis. **B.** Los AGEs son fagocitados y degradados, vía unión al receptor carroñero. Este proceso se asocia con la producción y liberación de citocinas y factores de crecimiento, los cuales inducen la proliferación celular y la síntesis de proteínas.

Sin embargo, en muchos casos la respuesta puede ser anormal y llevar a alteraciones en la dinámica del crecimiento celular con acumulación de matriz extracelular y activación de los procesos de muerte celular.¹⁸

Modificación de proteínas intracelulares

Hasta fecha reciente, se consideraba que los AGEs se formaban solamente en macromoléculas extracelulares, pero se ha demostrado que éstos también se forman dentro de las células, como consecuencia de la hiperglucemia intracelular. El proceso de glicación intracelular se lleva a cabo con la participación de azúcares como glucosa-6-fosfato, gliceraldehído-3-fosfato y fructosa, esta última derivada de la vía de los polioles, a una tasa mayor que cuando ocurre con glucosa, es decir, extracelularmente. El factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), en células endoteliales,⁴² además de las proteínas histonas de hepatocitos, en diabetes experimental¹¹⁵ y en células beta de islotes de Langerhans,¹¹⁶ son ejemplos de proteínas intracelulares modificadas por AGEs.^{117, 118} Asimismo, se ha detectado insulina glicada dentro de células beta pancreáticas y en plasma, con niveles elevados, en ratones y sujetos, diabéticos. La glicación afecta la actividad biológica de esta hormona y podría contribuir a la resistencia a la insulina, en la diabetes mellitus tipo 2.^{119,120}

Acerca del papel de los AGEs, nuestro grupo ha evaluado el efecto de BSA-AGE sobre la reactividad vascular de aortas de ratas macho con síndrome metabólico (SM). La vasoconstricción de las aortas no se afectó significativamente por la albúmina glicada y sin glicar. Sin embargo, tanto la BSA como la BSA-AGE disminuyeron la relajación vascular en las aortas de ratas control en un 35%, mientras que en las aortas de ratas con SM no tuvieron efecto significativo, aunque en estas últimas hubo incremento de RAGE, lo cual sugiere que el posible efecto de AGE-BSA sobre la función vascular, no es mediada por el receptor. Se concluyó que la BSA y la BSA-AGE inhiben la relajación vascular mediada por NO en anillos aórticos control. En ratas con SM este efecto no es evidente debido a posibles alteraciones en las células endoteliales como consecuencia de la enfermedad.¹²¹

DEGRADACIÓN Y ELIMINACIÓN DE AGES

Bajo condiciones fisiológicas, la generación de AGEs ocurre de manera constante y en equilibrio, por mecanismos de degradación y eliminación de los mismos. Este proceso ocurre a través de un mecanismo de endocitosis mediada por receptores como el carroñero de macrófagos y previene contra los efectos deletéreos secundarios a la acumulación de dichos productos.^{65,66,70,72,122-125} Alteraciones en la eliminación de los AGEs conduce a la acumulación

de los mismos. Éstas son debidas en parte a la resistencia de las proteínas glicadas a su degradación, así como a su limitada capacidad de eliminación, particularmente en la hiperglucemia y en la falla renal.^{18,57}

La proteólisis de AGEs produce péptidos-AGE y aductos-AGE libres (aductos de AGE unidos a uno o dos aminoácidos), los cuales son liberados a la circulación. Los aductos-AGE son eliminados directamente por vía renal, mientras que los péptidos-AGE son retomados por endocitosis en el túbulo proximal del riñón y degradados en aductos-AGE, aunque muchos péptidos-AGE regresan a la circulación.^{126,127} Estos péptidos-AGE se unen covalentemente a otras proteínas como colágena, LDL plasmática y fosfolípidos, por lo que se considera constituyen una segunda generación de AGEs más reactivos y agresivos que los AGEs de los cuales derivan^{10,36,44} (Figura 7). Estos AGEs más reactivos, se incrementan en situaciones de daño renal, más aún asociado a diabetes mellitus, por lo que probablemente contribuyen a acelerar el daño vascular extrarrenal en estos pacientes.^{4,126}

Estudios *in vitro* sugieren que la insulina acelera la captura endocítica de proteínas-AGE mediada por el receptor carroñero de macrófagos.^{128,129} Asimismo, recientemente se ha informado la presencia de autoanticuerpos contra AGEs en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y en ratas diabéticas. El papel

biológico de estos anticuerpos no es claro, pero se considera que podrían constituir un mecanismo de depuración de productos de glicación avanzada, favoreciendo su captura y fagocitosis, o bien que por el contrario, reaccionen contra los propios órganos y de esa manera contribuyan a las complicaciones crónicas de la diabetes.^{123,130}

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Se han llevado a cabo diversos estudios con el objetivo de buscar agentes terapéuticos que contrarresten la formación de AGEs, así como sus efectos dañinos sobre los tejidos. El desarrollo de estos fármacos ha seguido dos vías: la primera, a través de inhibir la formación de AGEs, por agentes como la aminoguanidina y la segunda, a través de la ruptura de los entrecruzamientos AGE-AGE, por medio de compuestos como el alagebrium.

La aminoguanidina (pimagedina) es una hidracina que previene la formación de AGEs *in vitro* y su subsecuente entrecruzamiento con otras proteínas.¹³¹ Además inhibe el desarrollo de complicaciones de la diabetes en modelos animales, así como en humanos.^{26,132,133} Su mecanismo de acción es el bloqueo de intermediarios dicarbonilo, que se forman durante las primeras etapas de la glicación, evitando el avance de la reacción una vez formada la base de Schiff.¹³⁴⁻¹³⁶ Se han descrito una serie de moléculas

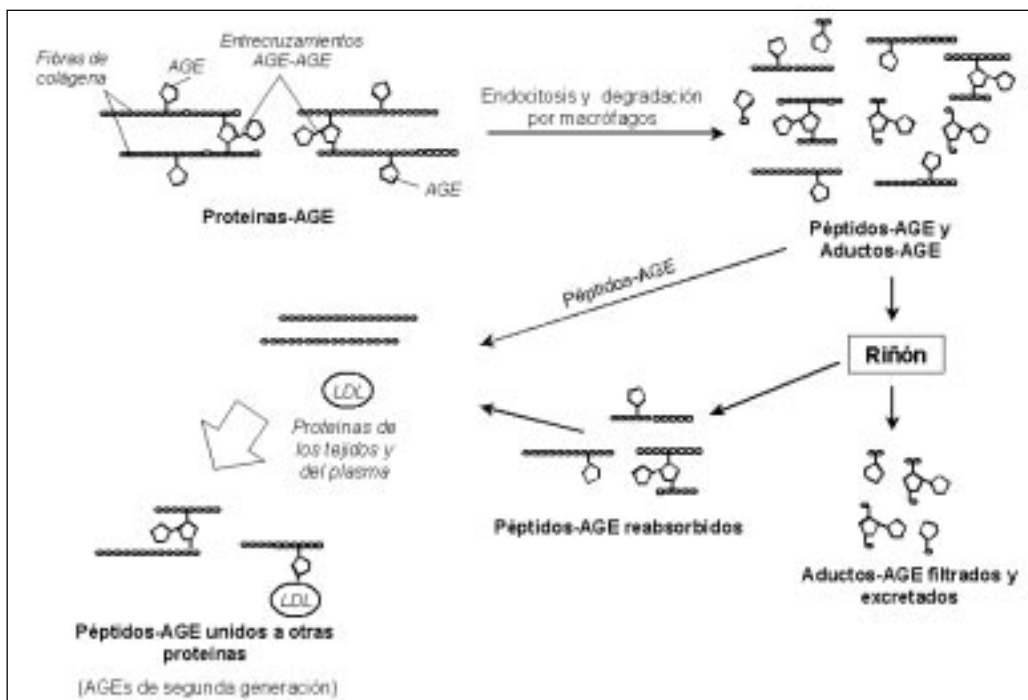


Figura 7. Degradación y eliminación de AGEs. Los AGEs son fagocitados y degradados por macrófagos, resultando en péptidos-AGE y aductos-AGE. En los riñones, los aductos-AGE son eliminados y los péptidos-AGE son reabsorbidos y degradados a aductos-AGE, pero muchos péptidos-AGE regresan a la circulación y se unen a otras proteínas de los tejidos como la colágena y del plasma como LDL, formando AGEs de segunda generación.

capaces de bloquear la conversión de productos de Amadori en AGEs, denominadas amadorinas, la más potente de éstas es la piridonina.^{137,138} Asimismo, se han evaluado otros inhibidores de la glicación avanzada como OPB-9195 [(±)-2-isopropilidenoimidazolidino-4-oxotiazolidino-5-ilacetanidido], piridoxamina y ALT-946 [hidrocloruro de N-(2-Acetamidoetil) hidrocincarcboximidamida].¹³⁹⁻¹⁴¹

Los resultados obtenidos a la fecha indican que la utilización de estas moléculas podría ser efectiva en el tratamiento y prevención de las complicaciones que se presentan en la diabetes. Los efectos adversos de la aminoguanidina y de las amadorinas en humanos, han limitado su uso, pero algunos de estos compuestos como la piridoxamina, se están utilizando en investigación clínica con resultados altamente promisorios.^{72,138}

Recientemente se ha descubierto la potente actividad inhibitoria de la formación de AGEs en agentes anti-hipertensivos, como olmesartán y losartán (bloqueadores del receptor de angiotensina II), asimismo, temocaprilat (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina). El efecto de estos fármacos se basa en que, en la hiperglucemia se observa un incremento en la producción de angiotensina II (Ang II) y ésta, a su vez, incrementa el estrés oxidativo, ya que al actuar la Ang II vía su receptor tipo 1 (AT₁), genera radicales libres de oxígeno. Es probable que este estrés oxidativo contribuya a la formación de AGEs, ya que el empleo de olmesartán, losartán y temocaprilat, reducen la formación de estos productos de glicación, al limitar la generación de las especies reactivas de oxígeno. A su vez los AGEs favorecen la síntesis de Ang II.^{60,142-145} También se han probado compuestos que disminuyen la glucosa (biguanidas, glitazonas), estatinas como la edaravona (droga usada para tratar infarto cerebral), algunos antibióticos y un inhibidor de anhidrasa carbónica.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Asimismo, por los efectos sobre el estrés oxidativo de los AGEs, se ha evaluado el uso de antioxidantes para la prevención de la glicación de proteínas.¹⁴⁹⁻¹⁵²

La segunda alternativa ha sido el uso de fármacos que rompen los entrecruzamientos o enlaces AGE-AGE, que mantienen unidos a los AGEs con proteínas tisulares. A este respecto, el empleo de compuestos como el DPTC (cloruro de 4,5-dimetil-3-fenaciltiazolium) y ALT-711 o alagebrium (cloruro de 3-fenacil-4,5-dimetiltiazolium), ha mostrado resultados promisorios en varias condiciones clínicas.^{153,154}

En este sentido, se han utilizado también las sales de tiazolium. Este tipo de compuestos se han evaluado recientemente tanto en modelos experimentales

como en pacientes y de acuerdo con los resultados, éstos representan una alternativa anti-AGE,¹⁵⁵ sobre todo alagebrium parece ser el agente terapéutico más seguro y efectivo.^{156,157} Por otro lado, diversos compuestos como benfotiamina, PARP [Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa], aldosa reductasa, LR-90 [ácido 4-4'-(2-clorofenilureido fenoxiisobutírico)], pioglitazona, metformina y pentoxifilina, han demostrado disminuir los niveles de AGEs y mejorar la nefropatía y neuropatía diabéticas.^{146,158-162}

Por último, se está llevando a cabo el análisis de preparaciones que interfieren con la interacción de los AGEs con sus receptores. A este respecto, las estrategias incluyen la obtención de sRAGE, RAGE recombinante o anticuerpos anti-RAGE, con la finalidad de bloquear la interacción AGE-RAGE y prevenir o disminuir los efectos derivados de la misma.^{32,73,74,77}

De acuerdo con lo anterior, tanto los agentes que limitan la formación de AGEs, como los que incrementan su catabolismo, o los que rompen sus entrecruzamientos o bien los que antagonizan su unión al receptor, podrían representar alternativas para la prevención o el tratamiento de las alteraciones micro y macrovasculares producidas por los productos de glicación avanzada.

DETERMINACIÓN DE AGEs

El desarrollo de metodología para la cuantificación de los AGEs se ha visto limitada debido a la falta de preparaciones estándares, así como de anticuerpos específicos. Dentro de las causas se encuentra la heterogeneidad estructural de los AGEs y la baja densidad de epítopes, entre otras. Con el uso de técnicas de hiperinmunización, que suprimen la respuesta del hospedero a epítopes comunes, se ha logrado obtener respuestas inmunológicas adecuadas^{62,163} y con ellas el desarrollo de ELISAs para medir la concentración de AGEs.⁶² El empleo de estos métodos ha demostrado que los AGE-epítopes formados durante la reacción de glucosa con proteínas *in vitro*, son muchas veces inmunológicamente distintos a los que se forman *in vivo*. Estos resultados indican la necesidad de disponer de sistemas capaces de identificar a los AGEs que circulan en el organismo, así como los que se depositan en los órganos. Éste y otros sistemas de inmunoenálisis específicos y de análisis de radioreceptores,⁴ desarrollados por diferentes autores se han utilizado para medir la concentración de AGEs en suero, orina y en extractos de diversos tejidos,^{11,46,164,165} asimismo, se han medido también por

fluorescencia, espectrofluorometría, HPLC sensible y espectrometría de masa.^{3,23,166}

Por otro lado, la presencia y abundancia de los mismos AGEs se ha medido *in situ*, en diferentes órganos, utilizando técnicas de inmunohistoquímica.^{8,47,49-83} Con el empleo de estos métodos se ha intentado determinar si a través de la medición de los niveles de AGEs, es posible establecer valores pronóstico en las complicaciones de la diabetes.

CONCLUSIÓN

La evidencia demuestra que la glucosa constituye no solamente la principal fuente de energía, sino que también contribuye a la patogénesis de las complicaciones crónicas de la diabetes y de la vejez, al participar en los procesos de glicación y entrecruzamiento de proteínas, con sus consecuentes efectos deletéreos sobre las células y los tejidos de diversos órganos. Muchos de los efectos patológicos de los AGEs se ejercen a través de su unión a receptores específicos, por lo que se han utilizado a los sRAGE con la finalidad de prevenir la formación de complejos AGE-RAGE. Asimismo, se han evaluado diversas estrategias terapéuticas contra AGEs, mediante el empleo de compuestos como la aminoguanidina, DPTC y alagebrium, con lo cual se intenta prevenir o corregir los daños causados por estos productos, por lo que se espera disponer en el futuro de agentes anti-AGEs de uso clínico. Es conveniente además disponer de un método específico, estandarizado para establecer las concentraciones de este tipo de productos en suero y orina, lo cual permitirá disminuir o predecir la ocurrencia de las complicaciones crónicas de la diabetes y con ello, complementar el manejo clínico de dichos pacientes. La investigación sobre la glicación de proteínas ha permitido avanzar en el conocimiento sobre la participación de estos productos en la patogénesis de las complicaciones asociadas a la diabetes mellitus y al envejecimiento, además de ampliar los conocimientos sobre la estructura de los AGEs predominantes y su relación con diversas patologías.

REFERENCIAS

1. Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 1997; 14 (Suppl. 5): S1-S85
2. Rodríguez CK, Céspedes ME. Estrés oxidativo y envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999; 18: 67-76.
3. Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot P, Kohn RR. Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Engl J Med* 1986; 314: 403-8.
4. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1991; 325: 836-42.
5. Nakayama H, Mitsuhashi T, Kuwajima S, Aoki S, Kuroda Y, Itoh T, et al. Immunochemical detection of advanced glycation end products in lens crystallins from streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1993; 42: 345-50.
6. Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, Moore LL, Jean S, Brinck-Johnsen T, et al. Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes* 1995; 44: 824-9.
7. Shikata K, Makino H, Sugimoto H, Kushiro M, Ota K, Akiyama K, et al. Localization of advanced glycation endproducts in the kidney of experimental diabetic rats. *J Diabetes Complications* 1995; 9: 269-71.
8. Nishino T, Horii Y, Shiiki H, Yamamoto H, Makita Z, Bucala R, et al. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products within the vascular lesions and glomeruli in diabetic nephropathy. *Hum Pathol* 1995; 26: 308-13.
9. Sakai H, Jinde K, Suzuki D, Yagame M, Nomoto Y. Localization of glycosylated proteins in the glomeruli of patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11 (Suppl. 5): 66-71.
10. Vlassara H. Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Ann Med* 1996; 28: 419-26.
11. Berg TJ, Bangstad HJ, Torjesen PA, Osterby R, Bucala R, Hanssen KF. Advanced glycation end products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1997; 46: 661-5.
12. Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, Miyazaki T, Ishizaki Y, Hayase F, et al. Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. *J Clin Invest* 1997; 99: 1272-80.
13. Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, Ueda T, Fusegawa T, Kuwajima S, et al. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism* 1998; 47: 1348-53.
14. Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism* 2000; 49: 9-13.
15. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, et al. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res* 2003; 92: 785-92.
16. Nakamura S, Tachikawa T, Tobita K, Aoyama I, Takayama F, Enomoto A, et al. An inhibitor of advanced glycation end product formation reduces N epsilon-(carboxymethyl)lysine accumulation in glomeruli of diabetic rats. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: S68-S71.
17. Miura J, Yamagishi S, Uchigata Y, Takeuchi M, Yamamoto H, Makita Z, et al. Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation endproducts are correlated to severity of microvascular complications in patients with Type 1 diabetes. *J Diabetes Complications* 2003; 17: 16-21.
18. Wautier JL, Guillausseau PJ. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab* 2001; 27: 535-42.
19. Brownlee M. The pathology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615-25.
20. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997; 99: 457-68.
21. Díaz AD. Hiperglicemia y estrés oxidativo en el paciente diabético. *Rev Cubana Invest Biomed* 2006; 25: 1-10.
22. Ceriello A. Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes, Nutrition & Metabolism* 1999; 12: 42-6.

23. Kalousova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51: 597-604.
24. Actis DS, Rebolledo OR. La glicación y glicoxidación de las lipoproteínas su importancia en la diabetes mellitus. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 645-56.
25. Maillard LC. Action des acides amines sur les sucres: formation des malaniodines par voie methodique. *C R Acad Sci* 1912; 154: 66-8.
26. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 1984; 101: 527-37.
27. Monnier VM, Cerami A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 1981; 211: 491-3.
28. Eble AS, Thorpe SR, Baynes JW. Nonenzymatic glucosylation and glucose-dependent cross-linking of protein. *J Biol Chem* 1983; 258: 9406-12.
29. Monnier VM, Stevens VJ, Cerami A. Maillard reactions involving proteins and carbohydrates in vivo: relevance to diabetes mellitus and aging. *Prog Food Nutr Sci* 1981; 5: 315-27.
30. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988; 318: 1315-21.
31. Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, Yamagishi S, Makita Z, Sasaki N, et al. Glycation: a sweet tempter for neuronal death. *Brain Res Rev* 2003; 41: 306-23.
32. Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* 2004; 95: 233-8.
33. Booth AA, Khalifah RG, Todd P, Hudson BG. In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). Novel inhibition of post-Amadori glycation pathways. *J Biol Chem* 1997; 272: 5430-7.
34. Ahmed N, Thornalley PJ. Quantitative screening of protein biomarkers of early glycation, advanced glycation, oxidation and nitrosation in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry multiple reaction monitoring. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1417-22.
35. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Accumulation of diabetic rat peripheral nerve myelin by macrophages increases with the presence of advanced glycosylation endproducts. *J Exp Med* 1984; 160: 197-207.
36. Vlassara H, Bucala R. Recent progress in advanced glycation and diabetic vascular disease: role of advanced glycation end product receptors. *Diabetes* 1996; 45(Suppl. 3): S65-S66.
37. Ahmed N. Advanced glycation endproducts: role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 67: 3-21.
38. Baynes WJ, Thorpe RS. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
39. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 339-52.
40. Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babei-Jadidi R, et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J* 2003; 375: 581-92.
41. Sato T, Shimogaito N, Wu X, Kikuchi S, Yamagishi S, Takeuchi M. Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2006; 21: 197-208.
42. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest* 1994; 94: 110-7.
43. Bunn HF, Higgins PJ. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 1981; 213: 222-24.
44. Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, et al. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9441-5.
45. Cervantes-Laurean D, Jacobson EL, Jacobson MK. Glycation and glycooxidation of histones by ADP-ribose. *J Biol Chem* 1996; 271: 10461-9.
46. Mitsuhashi T, Nakayama H, Itoh T, Kuwajima S, Aoki S, Atsumi T, et al. Immunochemical detection of advanced glycation end products in renal cortex from STZ-induced diabetic rat. *Diabetes* 1993; 42: 826-32.
47. Nakamura Y, Horii Y, Nishino T, Shiiki H, Sakaguchi Y, Kagoshima T, et al. Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *Am J Pathol* 1993; 143: 1649-56.
48. Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, et al. Advanced glycooxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 2004; 104: 1287-91.
49. Miyata S, Monnier V. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline. *J Clin Invest* 1992; 89: 1102-12.
50. Sell DR, Lapolla A, Odetti P, Fogarty J, Monnier VM. Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes* 1992; 41: 1286-92.
51. Al-Abed Y, Kapurniotu A, Bucala R. Advanced glycation end products: detection and reversal. *Methods Enzymol* 1999; 309: 152-72.
52. Gomes R, Sousa Silva M, Quintas A, Cordeiro C, Freire A, Pereira P, et al. Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product in familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem J* 2005; 385: 339-45.
53. Shibayama R, Araki N, Nagai R, Horiuchi S. Autoantibody against N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine: an advanced glycation end product of the Maillard reaction. *Diabetes* 1999; 48: 1842-9.
54. Price DL, Rhett PM, Thorpe SR, Baynes JW. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J Biol Chem* 2001; 276: 48967-72.
55. Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry* 1995; 34: 10872-8.
56. Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 1986; 261: 4889-94.
57. Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baynes JW. Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry* 1989; 28: 9464-8.
58. Glomb MA, Monnier VM. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem* 1995; 270: 10017-26.
59. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *The Endocrine Society* 2001: 1-21.
60. Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F645-F659.
61. Al-Abed Y, Bucala R. Structure of a synthetic glucose derived advanced glycation end product that is immunologically cross-reactive with its naturally occurring counterparts. *Bioconjug Chem* 2000; 11: 39-45.
62. Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem* 1992; 267: 5133-8.
63. Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 1997; 272: 16498-506.
64. Basta G, Lazzarini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for am-

- plification of inflammatory responses. *Circulation* 2002; 105: 816-22.
65. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992; 267: 14998-5004.
 66. Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 1988; 240: 1546-8.
 67. Miyazaki A, Nakayama H, Horiuchi S. Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 258-62.
 68. Lu C, He JC, Cai W, Liu H, Zhu L, Vlassara H. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11767-72.
 69. Stitt AW, He C, Vlassara H. Characterization of the advanced glycation end-product receptor complex in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 549-56.
 70. Tamura Y, Adachi H, Osuga J, Ohashi K, Yahagi N, Sekiya M, et al. FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2003; 278: 12613-7.
 71. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 1999; 274: 31740-9.
 72. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006; 114: 597-605.
 73. Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 1996; 97: 238-43.
 74. Koyama H, Yamamoto H, Nishizawa Y. RAGE and soluble RAGE: potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Mol Med* 2007; 13: 625-35.
 75. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001; 108: 949-55.
 76. Sakurai S, Yamamoto Y, Tamei H, Matsuki H, Obata K, Hui L, et al. Development of an ELISA for eRAGE and its application to type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 73: 158-65.
 77. Koyama Y, Takeishi Y, Niizeki T, Suzuki S, Kitahara T, Sasaki T, et al. Soluble Receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a prognostic factor for heart failure. *J Card Fail* 2008; 14: 133-9.
 78. Grossin N, Wautier MP, Meas T, Guillausseau PJ, Massin P, Wautier JL. Severity of diabetic microvascular complications is associated with a low soluble RAGE level. *Diabetes Metab* 2008; 34: 392-5.
 79. Bucala R, Vlassara H. Advanced glycosylation endproducts in diabetic renal disease: clinical measurement, pathophysiological significance, and prospects for pharmacological inhibition. *Blood Purif* 1995; 13: 160-70.
 80. Ono Y, Aoki S, Ohnishi K, Yasuda T, Kawano K, Tsukada Y. Increased serum levels of advanced glycation end-products and diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 1998; 41: 131-7.
 81. Miyata T, Sugiyama S, Suzuki D, Inagi R, Kurokawa K. Increased carbonyl modification by lipids and carbohydrates in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 1999; 71: S54-S56.
 82. Raj DS, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M. Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 365-80.
 83. Ling X, Nagai R, Sakashita N, Takeya M, Horiuchi S, Takahashi K. Immunohistochemical distribution and quantitative biochemical detection of advanced glycation end products in fetal to adult rats and in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Lab Invest* 2001; 81: 845-61.
 84. Sugiyama S, Miyata T, Ueda Y, Tanaka H, Maeda K, Kawashima S, et al. Plasma levels of pentosidine in diabetic patients: an advanced glycation end product. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1681-8.
 85. Kanauchi M, Nishioka H, Dohi K. Serum levels of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. *Nephron* 2001; 89: 228-30.
 86. Thomas MC, Baynes JW, Thorpe SR, Cooper ME. The role of AGEs and AGE inhibitors in diabetic cardiovascular disease. *Curr Drug Targets* 2005; 6: 453-74.
 87. Sasaki N, Fukatsu R, Tsuzuki K, Hayashi Y, Yoshida T, Fujii N, et al. Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Am J Pathol* 1998; 153: 1149-55.
 88. Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Patsouris E, Korkolopoulou P, Panidis D, Pawelczyk L, et al. Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochem Cell Biol* 2007; 127: 581-9.
 89. Jiaan DB, Seftel AD, Fogarty J, Hampel N, Cruz W, Pomerantz J, et al. Age-related increase in an advanced glycation end product in penile tissue. *World J Urol* 1995; 13: 369-75.
 90. Usta MF, Tuncer M, Baykal A, Ciftcioglu MA, Erdogru T, Koksali IT, et al. Impact of chronic renal failure and peritoneal dialysis fluids on advanced glycation end product and iNOS levels in penile tissue: an experimental study. *Urology* 2002; 59: 953-7.
 91. Koksali IT, Usta MF, Akkoyunlu G, Toptas B, Gulkesen KH, Erdogru T, et al. The potential role of advanced glycation end product and iNOS in chronic renal failure-related testicular dysfunction. An experimental study. *Am J Nephrol* 2003; 23: 361-8.
 92. Suji G, Sivakami S. Glucose, glycation and aging. *Biogerontology* 2004; 5: 365-73.
 93. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1976; 295: 417-20.
 94. Cohen MP, Ziyadeh FN. Role of Amadori-modified nonenzymatically glycosylated serum proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 183-90.
 95. Castellani R, Smith MA, Richey PL, Perry G. Glycoxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain Res* 1996; 737: 195-200.
 96. Tanaka S, Avigad G, Brodsky B, Eikenberry EF. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol* 1988; 203: 495-505.
 97. Vlassara H, Palace MR. Glycoxidation: the menace of diabetes and aging. *Mt Sinai J Med* 2003; 70: 232-41.
 98. Monnier VM, Glomb M, Elgawish A, Sell DR. The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution. *Diabetes* 1996; 45 (Suppl. 3): S67-72.
 99. Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 583-7.
 100. Kilhovd BK, Berg TJ, Birkeland KI, Thorsby P, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care* 1999; 22: 1543-8.
 101. Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem* 1992; 267: 12404-7.
 102. Cohen MP, Ziyadeh FN, Hong SW, Shearman CW, Hud E, Lautenslager GT, et al. Inhibiting albumin glycation in vivo ameliorates glomerular overexpression of TGF-beta1. *Kidney Int* 2002; 61: 2025-32.

103. Peppas M, Uribarri J, Vlassara H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. *Clin Diabetes* 2003; 21: 186-7.
104. Wautier JL, Guillausseau PJ. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab (Paris)* 2001; 27: 535-42.
105. Bierhaus A, Hofmann AM, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular Research* 1998; 37: 586-600.
106. Basta G, Lazzarini G, Del Turco S, Ratto GM, Schmidt AM, De Caterina R. At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1401-07.
107. Scivittaro V, Ganz MB, Weiss MF. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta(II) in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F676-F683.
108. Simm A, Munch G, Seif F, Schenk O, Heidland A, Richter H, et al. Advanced glycation endproducts stimulate the MAP-kinase pathway in tubulus cell line LLC-PK1. *FEBS Lett* 1997; 410: 481-4.
109. Cohen MP, Shea E, Chen S, Shearman CW. Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF-(kappa)B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor-(beta) 1 production in macrophage RAW cells. *J Lab Clin Med* 2003; 141: 242-49.
110. Rojas A, Romay S, Gonzalez D, Herrera B, Delgado R, Otero K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products. *Circ Res* 2000; 86: E50-E54.
111. Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, et al. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7742-6.
112. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 567-74.
113. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Watanabe T, Yamamoto H. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *J Pharmacol Sci* 2005; 97: 305-11.
114. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 84: 489-97.
115. Gugliucci A, Bendayan M. Histones from diabetic rats contain increased levels of advanced glycation end products. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212: 56-62.
116. Kaneto H, Fujii J, Myint T, Miyazawa N, Islam KN, Kawasaki Y, et al. Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J* 1996; 320 (Pt 3): 855-63.
117. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 1422-8.
118. Nagai R, Fujiwara Y, Mera K, Otagiri M. Investigation of pathways of advanced glycation end-products accumulation in macrophages. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 462-7.
119. Abdel-Wahab YH, O'Harte FP, Ratcliff H, McClenaghan NH, Barnett CR, Flatt PR. Glycation of insulin in the islets of Langerhans of normal and diabetic animals. *Diabetes* 1996; 45: 1489-96.
120. Lindsay JR, McKillop AM, NgMooney M, O'Harte FP, Bell PM, Flatt PR. Demonstration of increased concentrations of circulating glycosylated insulin in human type 2 diabetes using a novel and specific radioimmunoassay. *Diabetologia* 2003; 46: 475-78.
121. Rubio-Ruiz ME, Díaz-Díaz E, Cárdenas-León M, Arguelles-Medina R, Sánchez-Canales P, Larrea-Gallo F, et al. Glycation does not modify bovine serum albumin (BSA)-induced reduction of rat aortic relaxation: the response to glycosylated and nonglycosylated BSA is lost in metabolic syndrome. *Glycobiology* 2008; 18: 517-25.
122. Takata K, Horiuchi S, Araki N, Shiga M, Saitoh M, Morino Y. Endocytic uptake of nonenzymatically glycosylated proteins is mediated by a scavenger receptor for aldehyde-modified proteins. *J Biol Chem* 1988; 263: 14819-25.
123. Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, et al. Macrophage Scavenger Receptor Mediates the Endocytic Uptake and Degradation of Advanced Glycation End Products of the Maillard Reaction. *European J Biochem* 2004; 230: 408-15.
124. Horiuchi S, Higashi T, Ikeda K, Saishoji T, Jinnouchi Y, Sano H, et al. Advanced glycation end products and their recognition by macrophage and macrophage-derived cells. *Diabetes* 1996; 45(Suppl.) 3: S73-S76.
125. Svistounov D, Smedsrod B. Hepatic clearance of advanced glycation end products (AGEs): myth or truth? *J Hepatol* 2004; 41: 1038-40.
126. Lapolla A, Fedele D, Seraglia R, Traldi P. The role of mass spectrometry in the study of non-enzymatic protein glycation in diabetes: an update. *Mass Spectrom Rev* 2006; 25: 775-97.
127. Gugliucci A, Mehlhaff K, Kinugasa E, Ogata H, Hermo R, Schulze J, et al. Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: correlation with low molecular AGE adduct clearance. *Clin Chim Acta* 2007; 377: 213-20.
128. Sano H, Higashi T, Matsumoto K, Melkko J, Jinnouchi Y, Ikeda K, et al. Insulin enhances macrophage scavenger receptor-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 1998; 273: 8630-7.
129. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001; 44: 129-46.
130. Gonzalez M, Paquien C, Asenjo S, Gleisner A, Kirsten L, Bustamante M. [Autoantibodies against advanced glycation products in patients with type 1 diabetes mellitus]. *Rev Med Chil* 2001; 129: 141-8.
131. Brownlee M. Pharmacological modulation of the advanced glycosylation reaction. *Prog Clin Biol Res* 1989; 304: 235-48.
132. Kochakian M, Manjula BN, Egan JJ. Chronic dosing with aminoguanidine and novel advanced glycosylation end product-formation inhibitors ameliorates cross-linking of tail tendon collagen in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes* 1996; 45: 1694-700.
133. Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, Adler SG, Appel GB, Cartwright K, et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2004; 24: 32-40.
134. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986; 232: 1629-32.
135. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 11555-8.
136. Zimmerman GA, Meistrell M, 3rd, Bloom O, Cockcroft KM, Bianchi M, Risucci D, et al. Neurotoxicity of advanced glycation endproducts during focal stroke and neuroprotective effects of aminoguanidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 3744-8.
137. Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG. Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 251-8.
138. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, et al. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int* 2002; 61: 939-50.

139. Nakamura S, Makita Z, Ishikawa S, Yasumura K, Fujii W, Yanagisawa K, et al. Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes* 1997; 46: 895-9.
140. Wilkinson-Berka JL, Kelly DJ, Koerner SM, Jaworski K, Davis B, Thallas V, et al. ALT-946 and aminoguanidine, inhibitors of advanced glycation, improve severe nephropathy in the diabetic transgenic (mREN-2)27 rat. *Diabetes* 2002; 51: 3283-9.
141. Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, et al. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 2826-32.
142. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Ueda Y, Ichimori K, Inagi R, Onogi H, 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: 2478-87.
143. Yamagishi S, Takeuchi M, Matsui T, Nakamura K, Imaizumi T, Inoue H. Angiotensin II augments advanced glycation end product-induced pericyte apoptosis through RAGE overexpression. *FEBS* 2005; 579: 4265-70.
144. Lavrentyev EN, Estes AM, Malik KU. Mechanism of high glucose-induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circulation Res* 2007; 101: 455-61.
145. Koka V, Wang W, Huang XR, Kim-Mitsuyama S, Truong LD, Lan HY. Advanced glycation end products activate a chymase-dependent angiotensin II-generating pathway in diabetic complications. *Circulation* 2006; 113: 1353-60.
146. Rahbar S, Natarajan R, Yerneni K, Scott S, Gonzales N, Nadler JL. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. *Clin Chim Acta* 2000; 301: 65-77.
147. Izuohara Y, Nangaku M, Inagi R, Tominaga N, Aizawa T, Kurokawa K, et al. Renoprotective properties of angiotensin receptor blockers beyond blood pressure lowering. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3631-41.
148. Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Sato T, Takeuchi M. Potential utility of statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in diabetic retinopathy. *Med Hypotheses* 2006; 66: 1019-21.
149. Ahmad MS, Ahmed N. Antiglycation properties of aged garlic extract: possible role in prevention of diabetic complications. *J Nutr* 2006; 136: 796S-799S.
150. Babu PV, Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2006; 162: 114-20.
151. Cervantes-Laurean D, Schramm DD, Jacobson EL, Halaweish I, Bruckner GG, Boissonneault GA. Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 531-40.
152. Zhang J, Slevin M, Duraisamy Y, Gaffney J, C AS, Ahmed N. Comparison of protective effects of aspirin, D-penicillamine and vitamin E against high glucose-mediated toxicity in cultured endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 551-7.
153. Wolfenbutter BH, Boulanger CM, Crijns FR, Huijberts MS, Poitevin P, Swennen GN, et al. Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4630-4.
154. Usta MF, Kendirci M, Gur S, Foxwell NA, Bivalacqua TJ, Celtek S, et al. The breakdown of preformed advanced glycation end products reverses erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: preventive versus curative treatment. *J Sex Med* 2006; 3: 242-50; discussion 250-2.
155. Cooper ME, Thallas V, Forbes J, Scalbert E, Sastra S, Darby I, et al. The cross-link breaker, N-phenacylthiazolium bromide prevents vascular advanced glycation end-product accumulation. *Diabetologia* 2000; 43: 660-4.
156. Coughlan MT, Thallas-Bonke V, Pete J, Long DM, Gasser A, Tong DC, et al. Combination therapy with the advanced glycation end product cross-link breaker, alagebrium, and angiotensin converting enzyme inhibitors in diabetes: synergy or redundancy? *Endocrinology* 2007; 148: 886-95.
157. Vasan S, Foiles P, Founds H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch Biochem Biophys* 2003; 419: 89-96.
158. Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N, Battah S, Thornalley PJ. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes* 2003; 52: 2110-20.
159. Li F, Drel VR, Szabo C, Stevens MJ, Obrosova IG. Low-dose poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy. *Diabetes* 2005; 54: 1514-22.
160. Okamoto H, Nomura M, Nakaya Y, Uehara K, Saito K, Kimura M, et al. Effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic neuropathy and gastroparesis. *Intern Med* 2003; 42: 655-64.
161. Figarola JL, Scott S, Loera S, Tessler C, Chu P, Weiss L, et al. LR-90 a new advanced glycation endproduct inhibitor prevents progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 2003; 46: 1140-52.
162. Haupt E, Ledermann H, Kopcke W. Benfotiamine in the treatment of diabetic polyneuropathy—a three-week randomized, controlled pilot study (BEDIP study). *Int J Clin Pharmacol Ther* 2005; 43: 71-7.
163. Bucala R, Cerami A. Characterization of antisera to the addition product formed by the nonenzymatic reaction of 16 alpha-hydroxyestrone with albumin. *Mol Immunol* 1983; 20: 1289-92.
164. Izuohara Y, Miyata T, Ueda Y, Suzuki D, Asahi K, Inagi R, et al. A sensitive and specific ELISA for plasma pentosidine. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 576-80.
165. Papanastasiou P, Grass L, Rodela H, Patrikarea A, Oreopoulos D, Diamandis EP. Immunological quantification of advanced glycosylation end-products in the serum of patients on hemodialysis or CAPD. *Kidney Int* 1994; 46: 216-22.
166. Jakus V, Baynes JW. Chromatographic methods for assaying glycation, advanced glycation and glycoxidation In: Proceedings of 11th International Symposium: Advances and Applications of Chromatography in Industry. Bratislava; 2001, 27-31.

Reimpresos:

Dr. Eulises Díaz-Díaz

Departamento de Biología de la Reproducción,
 Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
 Salvador Zubirán.
 Vasco de Quiroga No. 15,
 Col. Sección XVI, Tlalpan,
 14080, México, D.F.,
 Tel.: 5487-0900, Ext.: 2417, Fax: 5655-9859
 Correo electrónico: eulisesd@yahoo.com

*Recibido el 24 de noviembre de 2008.
 Aceptado el 11 de septiembre de 2009.*