

Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus

Dr. Alejandro Gugliucci*

Resumen

La hiperglicemia es considerada en la actualidad como un factor causal clave en el desarrollo de las complicaciones vasculares diabéticas pudiendo producir sus efectos nocivos por múltiples vías. Este hecho fue claramente confirmado por el estudio Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) para la microangiopatía en el caso de la diabetes tipo 1 y corroborado por el United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) publicado a fines de 1998 para el caso de la diabetes tipo 2. Dichos estudios confirmaron lo que en clínica se ha sospechado por largo tiempo: la prevención de las complicaciones diabéticas requiere por lo menos el buen control de la glicemia. En esta revisión resumimos las evidencias actuales en apoyo del rol de la hiperglicemia en las complicaciones vasculares. Después de delinear sucintamente el papel de la vía del poliol, de la proteína kinasa C y del estrés oxidativo, consagramos lo esencial de este trabajo a profundizar en uno de los mecanismos bioquímicos protagónicos en esta enfermedad: la acción deletérea directa de la glucosa y otros monosacáridos sobre las proteínas, conocida como glicación o glicosilación no-enzimática. Incluimos también una breve sinopsis de algunos aspectos de nuestra propia investigación en esta área. Subrayamos por último la evidencia obtenida en estudios en animales y en ensayos clínicos de fase III, en apoyo de que la aminoguanidina, un inhibidor de la glicación, retarda la aparición y modifica el curso de estas complicaciones. Mencionamos por último el vínculo entre la glicación, la bioquímica del envejecimiento y la patogenia de la insuficiencia renal.

Palabras clave: *Diabetes mellitus - complicaciones
Hiperglicemia - prevención y control
Aminoguanidina.*

* Profesor de Bioquímica.
Division of Basic Medical Sciences
Touro University College of Osteopathic Medicine, San Francisco,
California.
Correspondencia: Alejandro Gugliucci, MD, PhD
Touro University College of Osteopathic Medicine, 832 Walnut
Ave, Quarters C, Mar Island, Vallejo, CA 94592
Email: agugliuc@touro.edu
Presentado: 1/7/99
Aceptado: 17/12/99

Abreviaturas:
AGE: productos de glicación avanzada; CML: carboximetil-lisina; DCCT: Diabetes Control and Complications Trial; HDL: lipoproteína de alta densidad; LCAT: lecitina colesterol aciltransferasa; LDL: lipoproteína de baja densidad; HbA 1c: hemoglobina glicosilada; HSPG: heparán sulfato proteoglicano; MBG: membrana basal glomerular; MEC: matriz extracelular; NO: óxido nítrico; UKPDS: United Kingdom Prospective Diabetes Study.

Introducción

La diabetes mellitus, una entidad caracterizada principalmente por una deficiencia cuantitativa en la secreción de insulina o una resistencia a la acción de la misma, se estima que afecta 4%-5% de la población con una carga económica enorme, relacionada en su mayor parte con el manejo de sus complicaciones. La microangiopatía, en tanto trastorno de la microcirculación en la diabetes, incluye retinopatía, nefropatía y neuropatía⁽¹⁻⁵⁾. Los mecanismos exactos por los cuales la microangiopatía diabética se desarrolla no han sido completamente elucidados. Un cierto consenso, sin embargo, permite señalar que la microangiopatía diabética emerge en un terreno de influencias genéticas sobre las cuales se yuxtaponen trastornos metabólicos y hemodinámicos^(6,7). El sello anatómico clásico de la microangiopatía diabética es el espesamiento de las membranas basales capilares que posteriormente induce una angiopatía oclusiva, hipoxia y daño tisular^(8,9). La evolución de estas numerosas complicaciones crónicas de la diabetes mellitus se correlaciona bien, en la mayoría de los casos, con la severidad y duración de la hiperglicemia. Se sabe, por ejemplo, que niveles posprandiales de glucosa superiores a 2 g/L (11 mM) se asocian más frecuentemente con las complicaciones renales, retinianas y neurológicas, que pueden comenzar cinco a diez años después del debut de la enfermedad^(2,4,5,10-12). Es significativo precisar aquí que a la hora del diagnóstico inicial de la diabetes tipo 2, muchos pacientes tienen niveles posprandiales de glucosa superiores a 2 g/L y ya presentan un cierto grado de complicaciones. Esta evidencia sugiere que el manejo actual de la diabetes debería enfatizar el diagnóstico precoz y el control más eficaz de los picos posprandiales de glicemia que pueden influenciar el desarrollo de las complicaciones crónicas. De ahí el consenso actual de la Asociación Americana de Diabetes, que a fines de 1999 preconiza usar valores de glicemia de 1,26 en lugar de los previos de 1,40 g/L para establecer el diagnóstico. Es probable que estos esfuerzos logren, de este modo, retardar la aparición temprana y la progresión de la retinopatía, nefropatía y neuropatía diabéticas. Por otra parte, estudios epidemiológicos recientes han revelado que los pacientes diabéticos con un mal control glicémico tienen un riesgo más alto de enfermedad cardiovascular que aquellos con un buen control⁽¹²⁾. Algunos estudios van aun más lejos y sugieren que la glicemia constituiría un factor de riesgo continuo para la enfermedad cardiovascular y que esta asociación no estaría restringida a la gama diabética⁽¹³⁻¹⁵⁾. En este caso algunos autores han acuñado el término “disglicemia” (es decir, niveles de glucosa superiores a un cierto umbral que permanece indefinido por el momento). El corolario de lo antedicho es que un conocimiento apropiado de los mecanismos bioquímicos intrínsecos de las

complicaciones crónicas facilitaría nuestra comprensión de las bases sobre las cuales descansan las pautas más agresivas del tratamiento y monitoreo de la diabetes. Más aun, permitiría comprender los puntos de ataque de los agentes terapéuticos en estudio, que pueden llegar a estar disponibles en un futuro cercano. El avance rápido de la investigación en este campo hace cualquier revisión obsoleta antes de tener la oportunidad de ser publicada. Es con plena conciencia de este hecho que aquí hacemos la tentativa de resumir las evidencias actuales en apoyo de rol de la hiperglicemia en las complicaciones vasculares. Haremos énfasis principalmente en uno de los mecanismos bioquímicos protagónicos: la acción deletérea directa de la glucosa y de otros monosacáridos sobre las proteínas, conocida con el nombre de glicación o glicosilación no-enzimática.

¿Cuál es la evidencia que apunta a una relación directa entre la hiperglicemia y las complicaciones microvasculares en la diabetes?

Como fue expresado en la introducción, en yuxtaposición con los trastornos hemodinámicos que ocurren en muchos tejidos blanco de complicaciones diabéticas, existe sólida evidencia clínica y epidemiológica que muestra una relación estrecha entre la hiperglicemia y las complicaciones vasculares. En este sentido dos estudios clínicos prospectivos capitales deben ser jerarquizados:

- * El estudio del control y las complicaciones diabéticas (Diabetes Control and Complications Trial, DCCT).
- * El estudio prospectivo de la diabetes del Reino Unido (United Kingdom Prospective Diabetes Study, UKPDS).

El estudio del control y las complicaciones diabéticas (DCCT). El DCCT fue diseñado para obtener una respuesta definitiva al problema de la asociación entre la hiperglicemia y las complicaciones vasculares en una población suficientemente grande y por un tiempo adecuado (diez años), como para permitir extraer conclusiones indiscutibles⁽²⁾. El DCCT evaluó el efecto del tratamiento insulínico intensivo y el automonitoreo de la glicemia. Uno de sus pilares fue el uso de la hemoglobina glicosilada para evaluar el control glicémico durante períodos prolongados⁽¹¹⁾. El DCCT fue conducido en pacientes con diabetes tipo 1 y utilizó criterios bien establecidos para testar la hipótesis glicémica de la génesis de la microangiopatía (retinopatía, nefropatía y neuropatía). Los resultados demostraron que la disminución de la HbA1c desde niveles de 9% hasta 7% redujo la progresión o la aparición, o ambas, de todas las complicaciones microvasculares⁽¹²⁾.

El estudio prospectivo de la diabetes, realizado en el Reino Unido (UKPDS). El UKPDS fue un estudio pros-

pectivo randomizado que estudió, también durante diez años, el efecto del tratamiento intensivo sobre 5.000 diabéticos tipo 2⁽¹³⁻¹⁶⁾. El UKPDS comenzó analizando el valor de diversas estrategias (dieta, varios agentes hipoglicemiantes orales, insulina), para lograr un control estricto de la glicemia, comparándolas luego con un control menos estricto. Los investigadores pronto comprobaron que la hipertensión arterial constituía un factor de riesgo de similar magnitud y el tratamiento de la presión arterial fue incluido por consiguiente en el estudio⁽¹³⁻¹⁵⁾. El estudio UKPDS proporcionó de este manera respuestas a una gama de preguntas importantes que han agobiado a investigadores y diabetólogos durante décadas. El resultado clave es que un control estricto de la glicemia también reducía el riesgo de complicaciones en la diabetes tipo 2. Por ejemplo, una reducción de HbA1c de 10% a 9% produjo una reducción en los indicadores de complicaciones que fue de 35% y las muertes relacionadas con la diabetes se redujeron 25%⁽¹³⁻¹⁵⁾. En lo que respecta a las complicaciones microvasculares, las sulfonilureas y la insulina proporcionaron resultados igualmente buenos. De este modo, la hipótesis por la cual se estima que la glucosa en sí es “tóxica” en la diabetes tipo 2 se confirma, y esto viene a corroborar los resultados previos del DCCT para la diabetes tipo 1: la controversia debe ahora terminar.

¿Cuál es entonces el nexo entre la hiperglicemia y las complicaciones diabéticas? (figura 1)

Es importante precisar que no se ha encontrado un marco consensual que abarque todo lo sabido sobre el vínculo entre la hiperglicemia y las complicaciones. Hay varias hipótesis igualmente defendibles que incluyen entre otras: la hipótesis de la aldosa reductasa⁽¹⁷⁾, la del estrés oxidativo^(18,19), la hipótesis de la glicación o de Maillard⁽²⁰⁻²³⁾, los trastornos de actividad proteína kinasa C y la pseudohipoxia⁽²⁴⁾, el estrés carbonílico⁽²⁵⁾, los trastornos del metabolismo de las lipoproteínas⁽²⁶⁾ y los trastornos de actividad de las citoquinas⁽²⁷⁾. Tres de las ya mencionadas hipótesis merecen especial atención y serán tratadas en esta breve revisión: la teoría del sorbitol, la modificación de la actividad de la proteína kinasa C y la hipótesis de la glicación, que será el objeto principal de esta discusión. Cabe destacar que un cierto estrés oxidativo es generado en todas estas vías.

Teoría del sorbitol

La hipótesis del sorbitol, que fue propuesta hace casi tres décadas⁽¹⁷⁾, establece que el exceso de glucosa en tejidos no insulino-dependientes puede seguir la vía de la aldosa

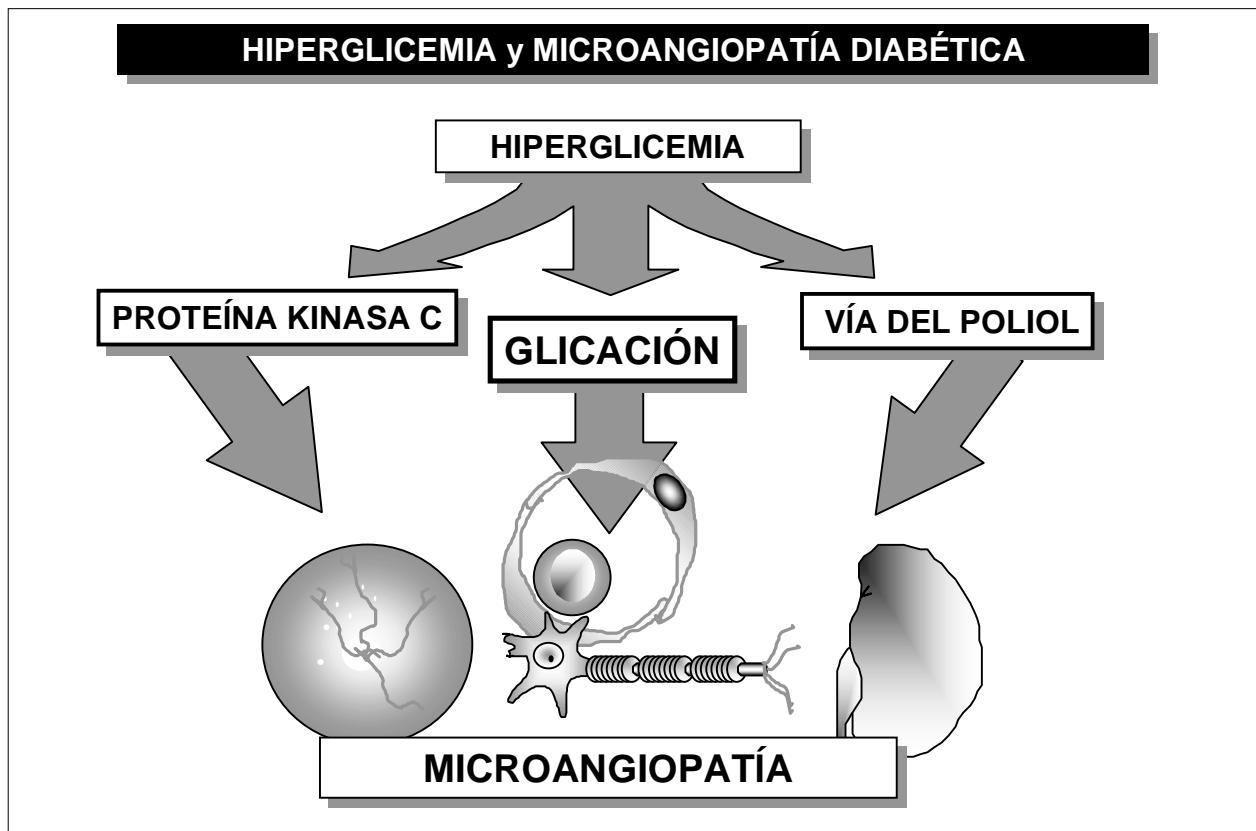


Figura 1. Tres vías principales implicadas en la enfermedad microvascular diabética inducidas por la hiperglicemia.

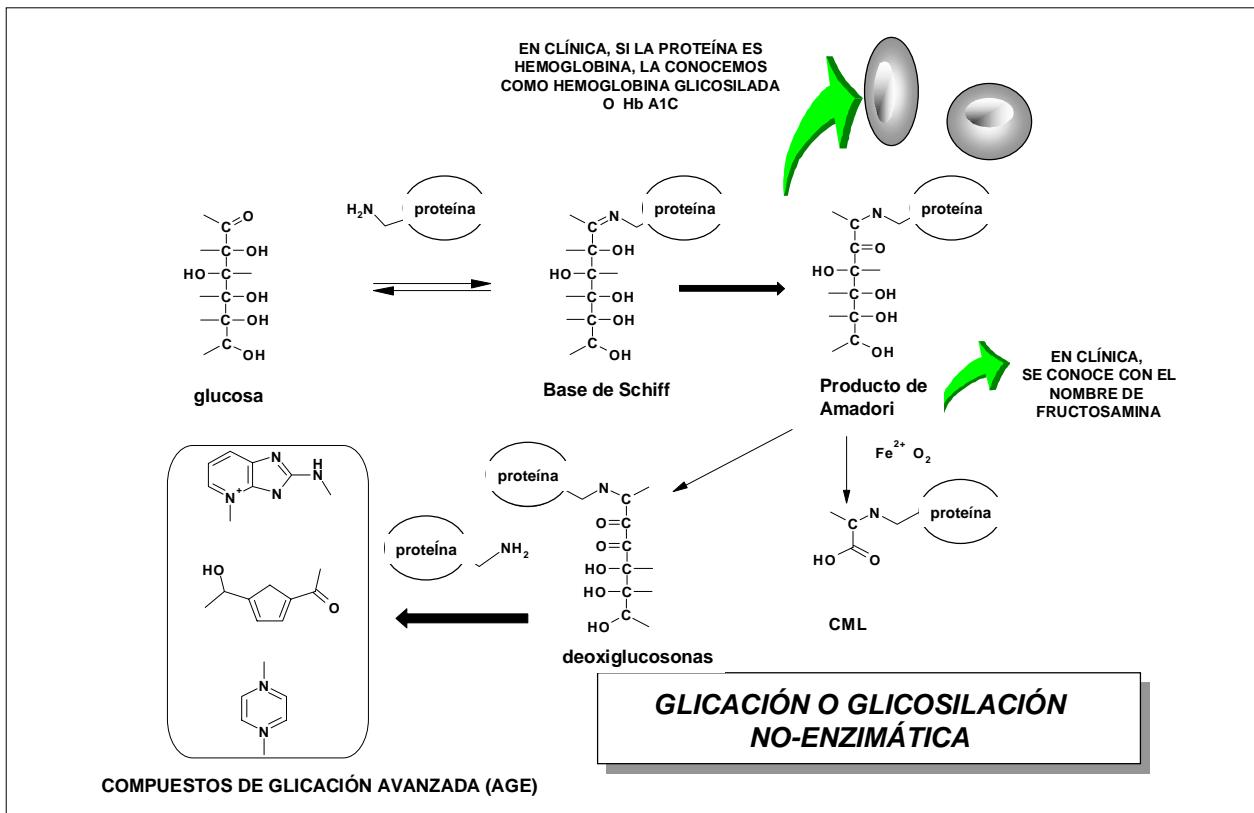


Figura 2. Glicación o glicosilación no-enzimática. La combinación de la glucosa y las proteínas ocurre sin la intervención de enzimas, depende directamente de las concentraciones de glucosa. Bajo la forma de HbA1c (hemoglobina glicosilada) la medida de los productos de esta reacción es utilizada en clínica como índice del control glicémico. La glicación ocupa hoy un papel protagónico en las teorías actuales propuestas para explicar la patogenia de las complicaciones diabéticas. (Véase el texto por más detalles).

reductasa, produciendo sorbitol y fructosa. Puesto que se trata de una enzima de Km elevado, su actividad es mínima cuando las concentraciones de glucosa son normales. En una variedad de modelos animales de diabetes se ha demostrado que los aumentos en sorbitol y fructosa producidos por esta ruta alteran el metabolismo energético celular, la integridad de la membrana y otras funciones. Este sería un mecanismo bioquímico posible por el cual la hiperglucemia podría deteriorar la función y la estructura de las células afectadas por las complicaciones diabéticas^(17,24,28,29). De acuerdo con estos mecanismos supuestos, los inhibidores de la aldosa reductasa se han utilizado en estudios y en manejo clínico por casi dos décadas para tratar complicaciones relacionadas con la hiperglucemia y en particular la neuropatía⁽³⁰⁻³²⁾.

Trastorno en la actividad de la proteína kinasa C (PKC)

Otro mecanismo por el cual la hiperglucemia modifica el sutil balance metabólico a nivel celular parece ser la modificación de la actividad de la proteína kinasa C. Por ejemplo, la hiperactividad de la PKC sensibiliza las células del

músculo liso vascular a los vasoconstrictores y factores del crecimiento, induce la agregación pudiendo así promover la hipertensión y la aterogénesis⁽³³⁻³⁵⁾.

Hipótesis de la glicación

La bioquímica de la reacción de glicación se esquematiza en la figura 2. La reacción de glicación fue descubierta por el químico francés L. Maillard en 1912 estudiando la pérdida de lisina (aminoácido esencial), en los alimentos conservados cuando éstos son ricos en proteínas y en glúcidios. De gran importancia en la industria alimentaria, esta reacción no atrajo a médicos o investigadores en medicina hasta la década del 70. La glicación implica una reacción en la cual los azúcares (glucosa en general, pero no exclusivamente) reaccionan no-enzimáticamente con las proteínas (y en menor grado lípidos y DNA) para formar los productos de glicación precoz, también llamados de Amadori o fructosamina en la jerga de la bioquímica clínica^(20,22). Como es bien conocido, en el hombre este proceso fue primero demostrado para la hemoglobina^(36,37). En clínica, la medida de la fracción glicosilada de la hemoglo-

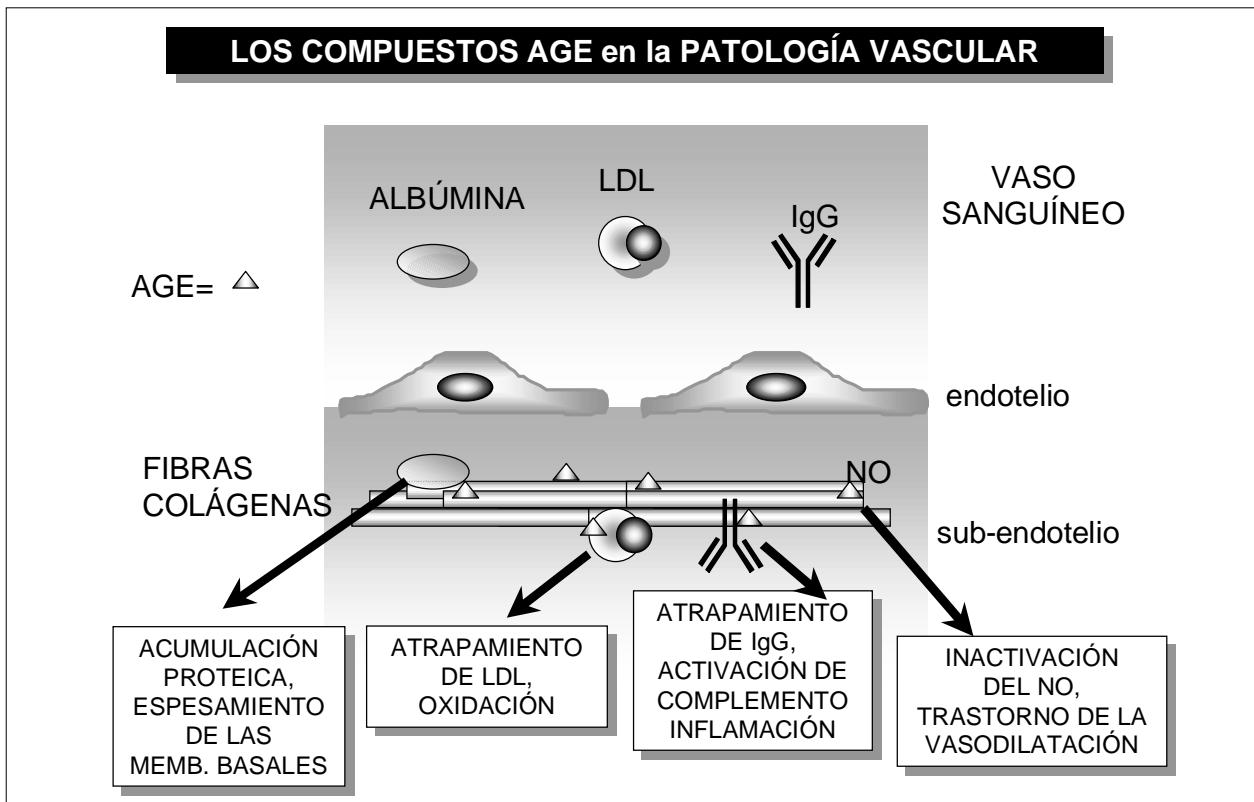


Figura 3. Productos de glicación avanzada en patología vascular. Este diagrama representa algunos de los puntos clave discutidos en el texto en lo que respecta al papel de los productos de la AGE en la microangiopatía así como en la macroangiopatía.

bina, llamada HbA1c, ha revolucionado el monitoreo y el estudio de pacientes diabéticos, proporcionando una estimación promedial de las glicemias en los 2-3 meses previos. La medida de las proteínas plasmáticas glicadas (generalmente llamadas "fructosamina") se utiliza como herramienta para supervisar el control glicémico (figura 2) obtenido durante un período de tres semanas⁽³⁷⁾. En nuestros trabajos hemos propuesto la IgM y el fibrinógeno glicosados como indicadores promediales de períodos más breves (cinco días), lo cual puede ser de utilidad en estudios clínicos de ajuste al tratamiento^(38,39).

Deseamos destacar nuevamente que las reacciones antedichas se consideran "glicación precoz" y de ninguna manera constituyen el fin de la cascada reacional. Es así que en una segunda fase de la ruta de la glicación (que ahora en sí es independiente de la glicemia), una serie compleja de reordenamientos intramoleculares y reacciones oxidativas conduce a la formación de compuestos múltiples, muy reactivos, colectivamente conocidos como "productos de glicación avanzada" y que llamaremos compuestos AGE o AGEs en lo que sigue⁽²¹⁾. Estas reacciones son virtualmente irreversibles, la modificación sólo desaparece con la proteína. Algunos de los AGEs se conocen en detalle, tal y como se demuestra en la figura 2, pero en

su mayoría las estructuras no han sido aún elucidadas. Una reacción similar, aunque más completa y producida bajo condiciones más radicales, es la que ocurre entre los azúcares y las proteínas en muchos alimentos y el resultado final es lo que vemos en el dulce de leche, para citar un ejemplo bien gráfico. En este caso, la lactosa y la glucosa de la leche reaccionan con la caseína y la lactalbúmina para dar complejas estructuras, de color amarronado, que son precisamente AGEs. La reacción de Maillard (como también se conoce a la glicación) juega un rol en la generación de otros pigmentos amarronados, tan apreciados en repostería y en bebidas, tales como la cerveza y las bebidas cola.

Los AGEs se pueden producir por la oxidación del producto de Amadori formando intermediarios dicarbonilo muy reactivos tales como la 3-deoxiglucosona^(22,40), como se muestra en la figura 2. Los compuestos dicarbonilo pueden también formarse directamente por autooxidación de los azúcares catalizada por metales⁽⁴¹⁻⁴⁶⁾. Algunos de ellos se transforman en carboximetil lisina (CML en la figura).

Los AGEs son capaces de producir agregación de proteínas y se ha demostrado que exhiben diversas actividades biológicas deletéreas que detallaremos más adelante⁽⁴²⁻⁴⁶⁾. Las proteínas modificadas por los AGEs pueden

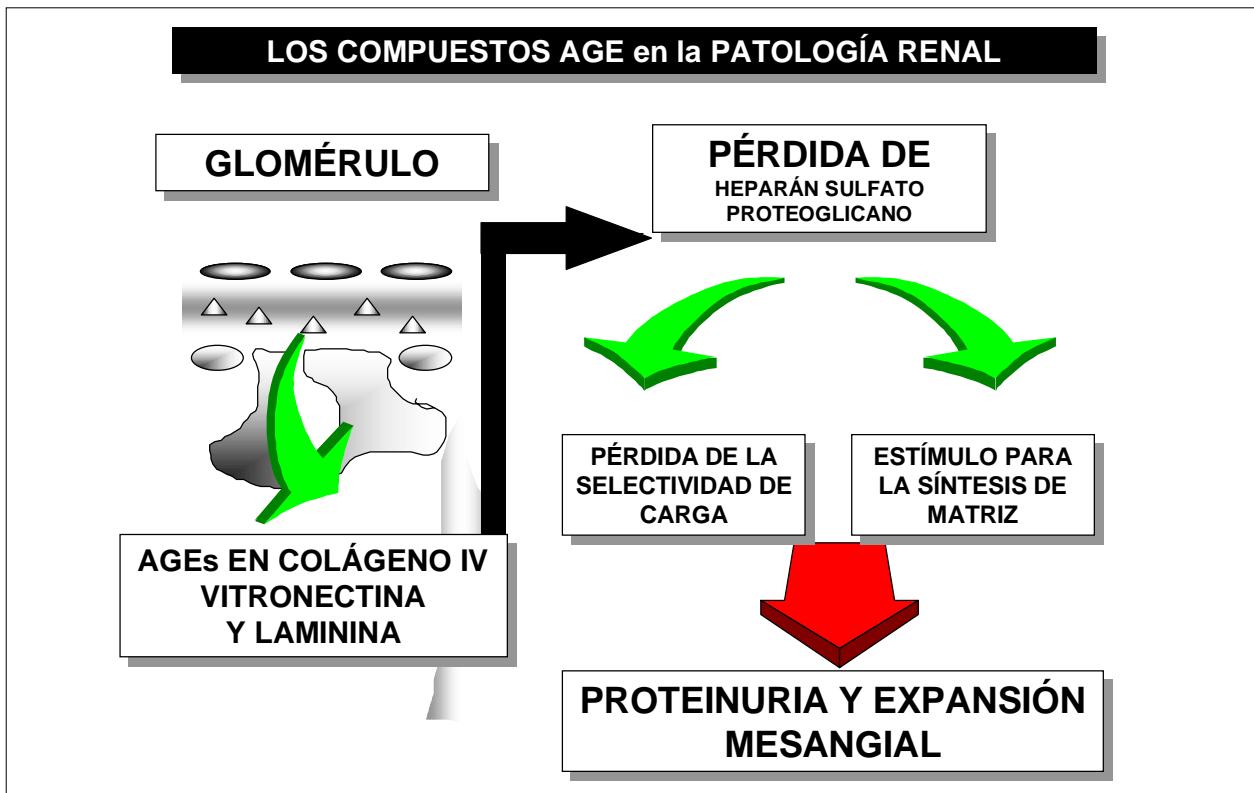


Figura 4. Productos de glicación avanzada en nefropatía. Este diagrama delinea algunos de los aspectos discutidos en el texto en lo que respecta al papel de los AGEs en la nefropatía.

encontrarse en el plasma, en el compartimiento intracelular así como en la matriz extracelular. Los AGEs se acumulan de preferencia en pared arterial, mesangio glomerular, membranas basales glomerulares y de otros capilares. La acumulación de AGEs se hace de preferencia en proteínas de larga vida; notables ejemplos los constituyen algunos tipos de colágeno y las cristalinas. Los AGEs contribuyen a la coloración marrón, al aumento en la fluorescencia y a la escasa solubilidad de las cristalinas así como a la agregación y a la disminución graduales de la elasticidad del colágeno tisular, cambios típicos que ocurren en el envejecimiento.

En una palabra, la glicación es un fenómeno importante en el desgaste tisular y junto con el estrés oxidativo forman la base de las teorías estocásticas del envejecimiento. Estos procesos están incrementados en pacientes diabéticos. La relación cualitativa entre el nivel de glicemia, la acumulación tisular de AGEs y los diferentes matices de la patología microvascular diabética han sido objeto de extensos estudios en modelos animales. Una primera constatación, en apariencia paradójica, es que la formación de AGEs aumenta en un grado mucho mayor que el aumento de la glicemia; este hecho sugiere que incluso elevaciones moderadas en la glicemia en los diabéticos resultarían en aumentos sustanciales, no lineares,

en la acumulación de AGEs⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾.

¿De qué manera la acumulación de AGEs afecta la microcirculación?

Una vasta literatura a este respecto se ha estado acumulando durante los últimos años; seleccionaremos y proporcionaremos un resumen de lo que consideramos lo más significativo clínicamente, que podríamos dividir en dos grandes líneas: I) Los efectos directos de los AGEs sobre las proteínas y II) los efectos mediados a través de receptores específicos.

Efectos directos de AGEs sobre las proteínas.

AGEs en la matriz extracelular (figura 3). La presencia de AGEs modifica las características funcionales de diversas moléculas clave de la matriz extracelular (MEC). El colágeno fue la primera de dichas proteínas en las que se demostró la existencia de enlaces intermoleculares covalentes producidos por los AGEs. En el colágeno tipo I, la agregación molecular resultante induce una cierta distorsión del edificio molecular de la fibrilla^(48,49). Según lo representado en la figura 3, el estrechamiento luminal, una característica importante en los vasos diabéticos, puede deberse en parte a la acumulación en el subendotelio de proteínas del plas-

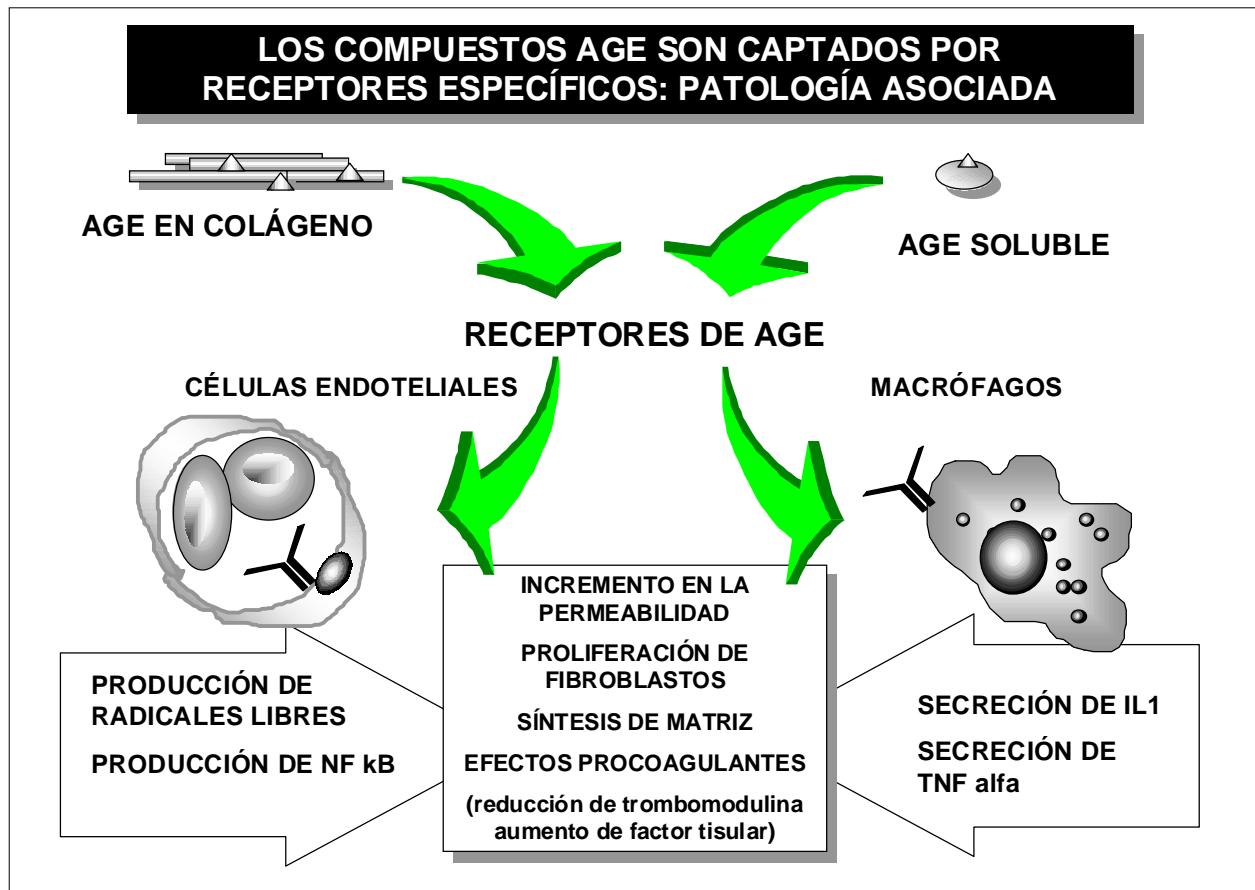


Figura 5. Productos de glicación avanzada: rol de los receptores. Muchas células poseen receptores de membrana que reconocen los AGEs. Este diagrama muestra algunos de los efectos de esta interacción en lo que respecta a la microangiopatía. (Véase el texto por más detalles).

ma tales como albúmina, lipoproteína de baja densidad (LDL) e inmunoglobulina G (IgG). Dichas moléculas pueden quedar atrapadas por los AGEs en el colágeno de las membranas basales por agregación covalente^(50,51). Por otra parte, la formación de AGEs en el colágeno de tipo IV de la membrana basal dificulta la asociación lateral de estas moléculas en una estructura tridimensional sutil y compleja y tiende a la reticulación de las fibras en forma anárquica, todo lo cual redundaría en aumentos de permeabilidad^(48,52,53).

Es bien conocido, por ejemplo, que las características principales de la glomerulopatía diabética son: la proteinuria, la expansión mesangial y la esclerosis focal. ¿Cómo contribuirían los AGEs en la génesis de estos fenómenos? En yuxtaposición con lo antedicho, la formación de AGEs en la laminina (una proteína estructural dominante de la MEC), causa también trastornos en el autoensamblaje de la membrana basal glomerular (MBG). Esto, a su vez, compromete la integración en esta superestructura de los otros componentes principales del andamiaje molecular que la componen, a saber, el colágeno tipo IV y los proteoglicanos tales como el heparán sulfato^(54,55). Es importante

destacar aquí que el heparán sulfato proteoglicano (HSPG) es precisamente la molécula clave que proporciona la carga negativa de la MBG; su pérdida es, por sí misma, el factor dominante que facilita el filtrado de las proteínas del plasma y la proteinuria resultante⁽⁵⁶⁾. Dicha secuencia es la que ilustramos en la figura 4. En pocas palabras, la modificación por AGEs de las proteínas de la membrana basal glomerular⁽⁵⁴⁾ podría explicar la disminución observada de HSPG en los glomérulos del diabético, que no sólo resulta en proteinuria, sino que se ha mostrado que estimula la superproducción compensatoria de otros componentes de la matriz en la pared del vaso. Esto proporciona elegante sustento molecular a la patogenia de la clásica nefropatía diabética de Kimmelstiel-Wilson⁽⁵⁶⁾. Por otra parte, estas alteraciones inducidas por AGEs en la matriz extracelular de la microcirculación renal no se ven restringidas solamente a estos capilares, sino que estarían implicadas además en los trastornos a nivel del capilar retiniano. Incluso se cree que dichos trastornos estarían vinculados indirectamente con la pérdida de los pericitos en esos vasos, que da sello anatómico la retinopatía diabética⁽⁵⁷⁾.

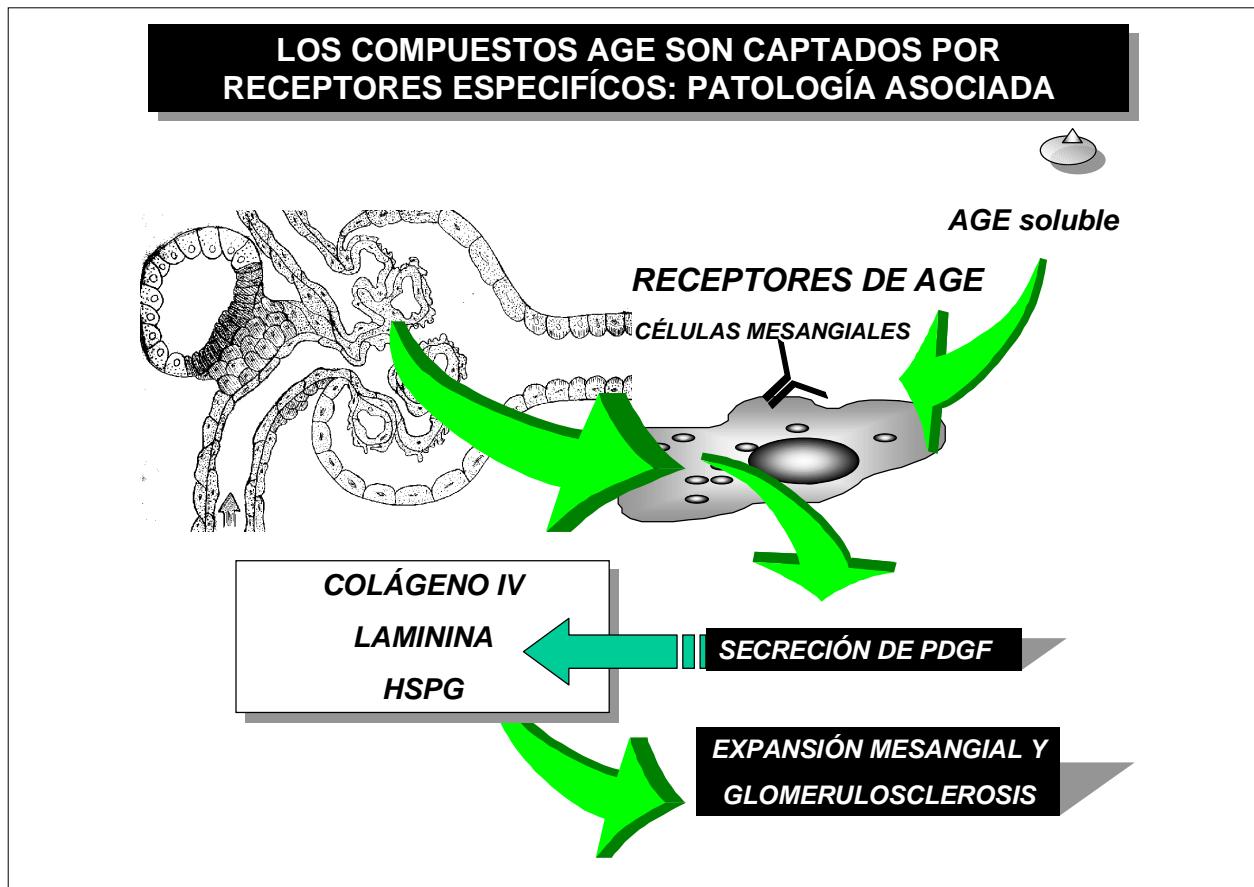


Figura 6. Receptores para los productos de glicación avanzada en el riñón. Las células mesangiales poseen receptores de membrana que reconocen los AGEs. Este diagrama representa esquemáticamente el conocimiento actual sobre los efectos de esta interacción en lo que atañe a la nefropatía. (Véase el texto por más detalles).

En lo que atañe a los vasos de mayor calibre, en ratas diabéticas, por ejemplo, se ha demostrado que los AGEs provocan la disminución de la elasticidad en arterias y arteriolas. Además, los AGEs tienen un efecto dosis-dependiente de inactivación del óxido nítrico (NO), el más potente vasodilatador fisiológico. En animales diabéticos, los trastornos en la respuesta vasodilatadora al NO (véase la figura 3) se correlacionan bien con el nivel de AGEs acumulados en los vasos⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾.

Efectos mediados por receptores.

Receptores de AGEs han sido descritos en numerosas células (figura 5). La lista creciente de los receptores capaces de ligar los AGEs incluye: los receptores “scavenger” I y II; el receptor de AGEs (R-AGE); el oligosacárid transfrasa-48 (OST-48, AGE-R1); la fosfoproteína 80K-H (AGE-R2) y la galectina-3 (AGE-R3)^(60,61). Los receptores de AGEs se encuentran en monocitos, macrófagos, células endoteliales, células mesangiales, pericitos, podocitos, astrocitos y microglía⁽⁶²⁻⁶⁸⁾. A título de ejemplo, esbozaremos brevemente el rol de la activación del receptor AGE en sólo tres

tipos clave de células: macrófagos, células endoteliales y células mesangiales.

Como se ilustra en la figura 5, las proteínas AGE que se ligan a estos receptores⁽⁶⁹⁾ estimulan la producción por los macrófagos de la interleuquina-1, el factor de crecimiento I, el factor de necrosis tumoral alfa y el factor estimulante de colonias de granulocitos. Dicha estimulación alcanza los niveles que se ha demostrado aumentan la síntesis glomerular del colágeno tipo IV y la proliferación de macrófagos y células de músculo liso arterial^(60,61). Además de R-AGE, otra clase de receptores de AGE existe en las células endoteliales. Como se muestra en forma de diagrama a la izquierda de la figura 5, este último receptor de AGE parece mediar la transducción de la señal a través de la generación de radicales libres del oxígeno (ROS). Estos radicales luego activan el factor de transcripción NFkB, siendo éste un gran coordinador multifacético de numerosos genes de “respuesta-a-lesión”^(66,67). En dichas células endoteliales estos cambios acumulativos son procoagulantes⁽⁷⁰⁾. Uno de ellos, la disminución rápida de la actividad de la trombomodulina impide la activación de la

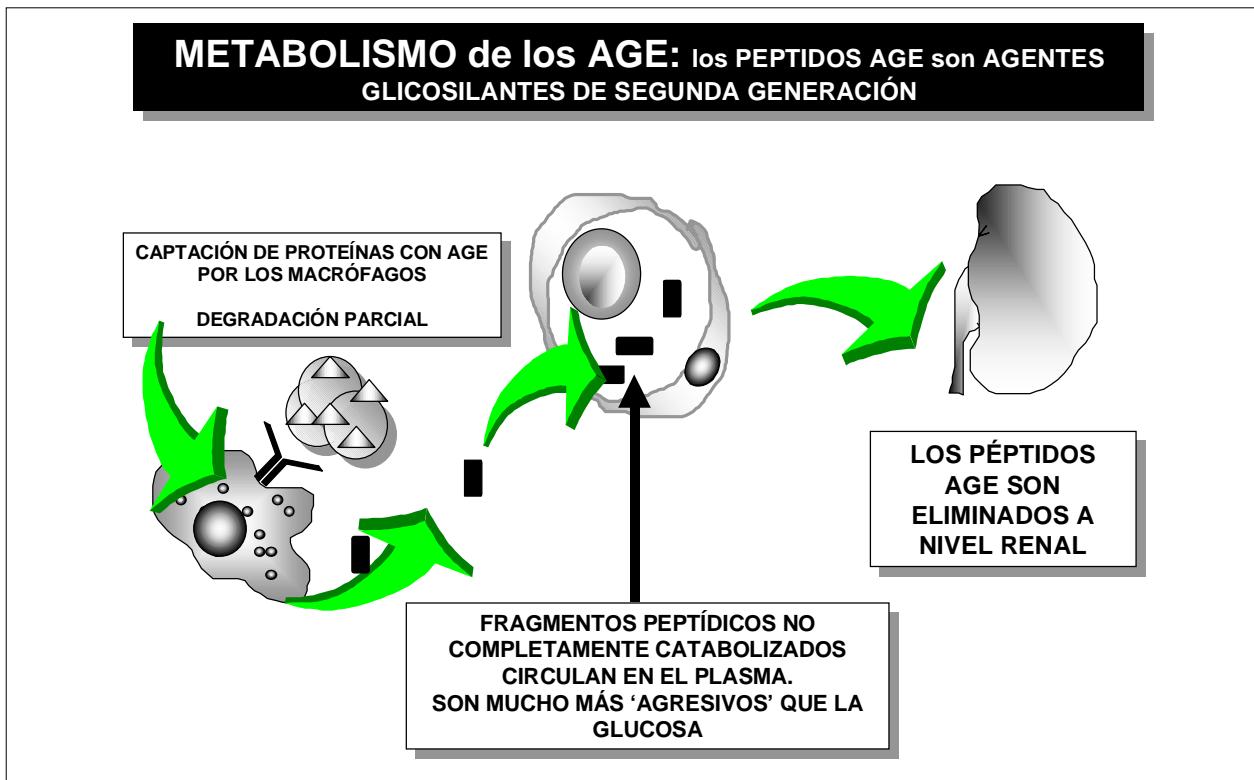


Figura 7. La glicación también ocurre a nivel intracelular. Este esquema resume resultados de nuestro laboratorio que muestran que las histonas hepáticas extraídas de ratas diabéticas poseen niveles de AGEs tres veces más altos que las ratas control. (Véase el texto por más detalles).

vía de la proteína C (un agente anticoagulante capital). El otro cambio pro-coagulante inducido por la ocupación del receptor de AGE es un aumento en la actividad del factor tisular (vía extrínseca), que activa los factores de la coagulación IX y X y la agregación directa del factor VIIa. En conjunto, estas alteraciones en la función de la célula endotelial, provocadas por los AGEs, favorecerían la formación de trombos en los sitios de acumulación extracelular de dichos AGEs⁽⁷⁰⁾. Por otra parte, los productos de glicación avanzada inyectados experimentalmente en animales inducen un aumento en la permeabilidad vascular actuando sobre el receptor de AGE⁽⁷¹⁾. En relación con la retinopatía, los AGEs modulan el crecimiento de las células endoteliales en los capilares retinianos, como lo muestran trabajos internacionales recientes en los que participan colegas uruguayos⁽⁷²⁾. Finalmente, en estudios inmunocitoquímicos, la colocalización de R-AGE (el receptor) y de los AGEs en los sitios de lesión microvascular sugiere que su interacción puede jugar un rol significativo en la patogenia de las lesiones vasculares diabéticas⁽⁷¹⁻⁷³⁾.

Los receptores de AGE también se han descrito en las células mesangiales glomerulares (figura 6). Al ser activados, estos receptores estimulan la secreción del factor de

crecimiento plaquetario que seguidamente media la producción de colágeno tipo IV, laminina y HSPG^(54,74,75). Es de destacar que en experimentación animal la administración crónica de AGEs a ratas sanas y euglicémicas conduce a la glomerulosclerosis focal, a la expansión mesangial y a la proteinuria⁽⁷⁶⁾, en una palabra reproduce la nefropatía diabética pero en normoglicemia.

La existencia de polimorfismos en los genes que codifican los receptores de AGEs o los mecanismos de transducción de estas señales, o ambos, podría explicar las conocidas variaciones individuales en la incidencia de complicaciones en individuos con niveles de glicemia comparables⁽⁷³⁾.

¿Pueden los AGEs afectar también las proteínas dentro de la célula?

Durante varios años se pensó que los productos de glicación avanzada se formaban solamente en las macromoléculas extracelulares de larga vida media. Dado que la tasa de formación de AGEs por la glucosa es lenta, las proteínas intracelulares con una velocidad de recambio, que se mide en minutos u horas, no existiría el tiempo suficiente como para acumular AGEs. Más recientemente, sin em-

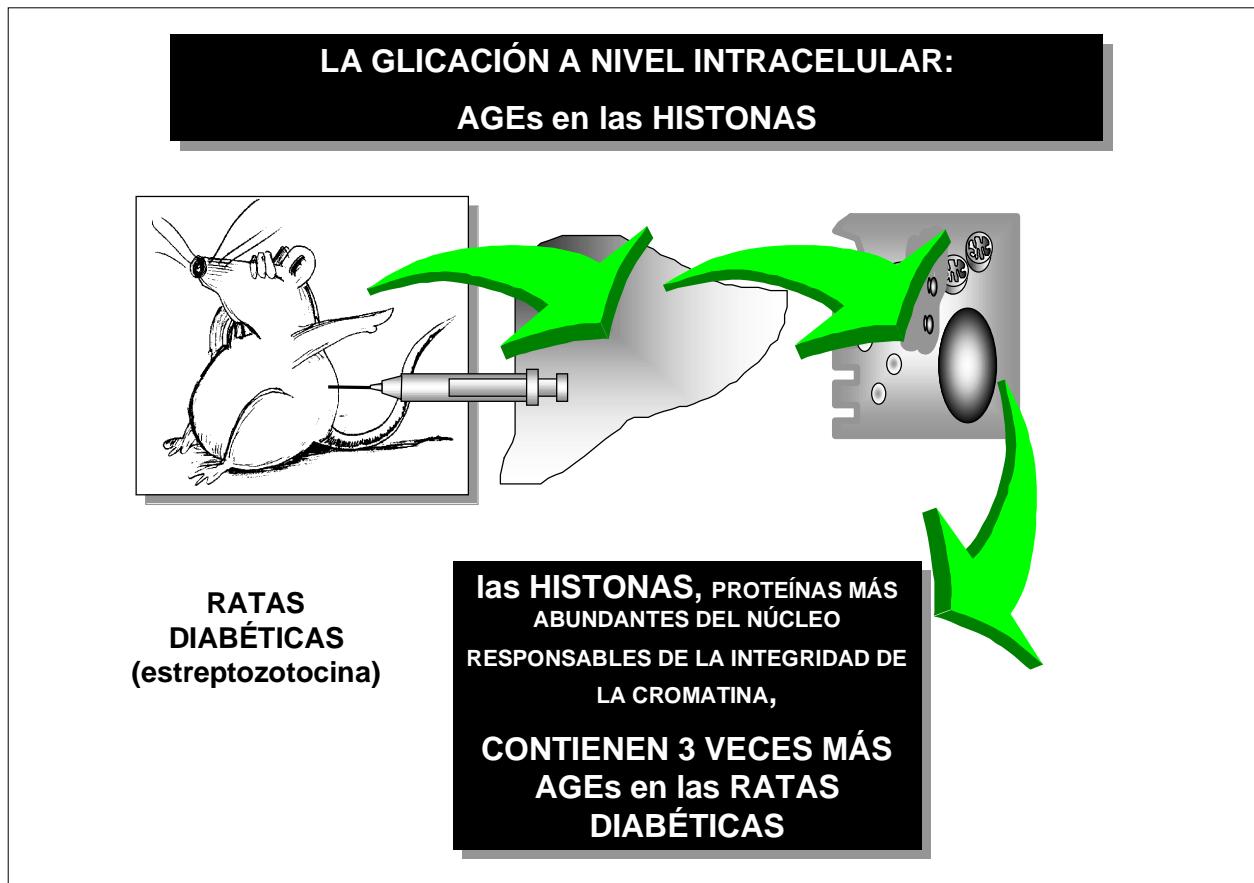


Figura 8. Los productos de glicación avanzada se metabolizan y producen pequeños péptidos. Los péptidos AGE circulan y modifican las proteínas del plasma y otras. Este diagrama resume en una manera esquemática la hipótesis actual de este metabolismo generado por varios laboratorios incluyendo el nuestro. (Véase el texto por más detalles).

bargo, se ha demostrado que, de hecho, los AGEs se forman en las proteínas de la célula *in vivo*^(42,43,77). Más aun, también se forman sobre el DNA *in vitro*⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾ y si los AGEs también se acumularan sobre el DNA *in vivo*, podrían producir efectos deletéreos sobre la expresión de los genes. Sobre este particular deseamos destacar que existe una acumulación rápida de AGEs, demostrada por nosotros, en las histonas de los hepatocitos. Las histonas son proteínas básicas que constituyen 50% de la masa de cromosoma y juegan un rol importante en el funcionamiento del gen. En nuestros experimentos, resumidos en la figura 7, después de solamente un mes de diabetes experimental, las histonas del hepatocito de rata demostraron niveles de AGEs tres veces superiores a los de sus controles y la acumulación de AGEs en las histonas aumentaba con la duración de la enfermedad y con la edad de los animales^(44,81). Esto refuerza el concepto de que la glicación avanzada ocurre realmente en las proteínas intracelulares. Por otra parte, esta confirmación abre la posibilidad de explorar el eventual rol de este proceso en la teratogenia asociada con la diabetes mellitus. Resultados análogos fue-

ron encontrados por otros autores en cultivos de células beta de los islotes de Langerhans, que comparten con los hepatocitos el mismo transportador de glucosa (GLUT II), que no depende de la insulina. Esta glicación intracelular refleja probablemente los aumentos inducidos por la hiperglicemia en metabolitos intermedios intracelulares (por ejemplo, glucosa-6-fosfato, gliceraldehido-3-fosfato), que son mucho más reactivos que la glucosa^(42,43,77,82). Finalmente, otro ejemplo de glicación avanzada intracelular que merece ser destacado ocurre en los eritrocitos. Aparte de la HbA1c, los eritrocitos también contienen la hemoglobina-AGE que representa 0,24% de la hemoglobina total en sujetos normales y es tres veces mayor en los diabéticos⁽⁸³⁾.

Recientemente, una amplia evidencia experimental sugiere que la glicación y el estrés oxidativo se pueden vincular a la vía del sorbitol potenciándose y contribuyendo así al desarrollo de complicaciones diabéticas. Debe ser señalado que la fructosa producida por la vía del sorbitol es extremadamente potente como agente de glicación, superando ampliamente a la glucosa^(84,85).

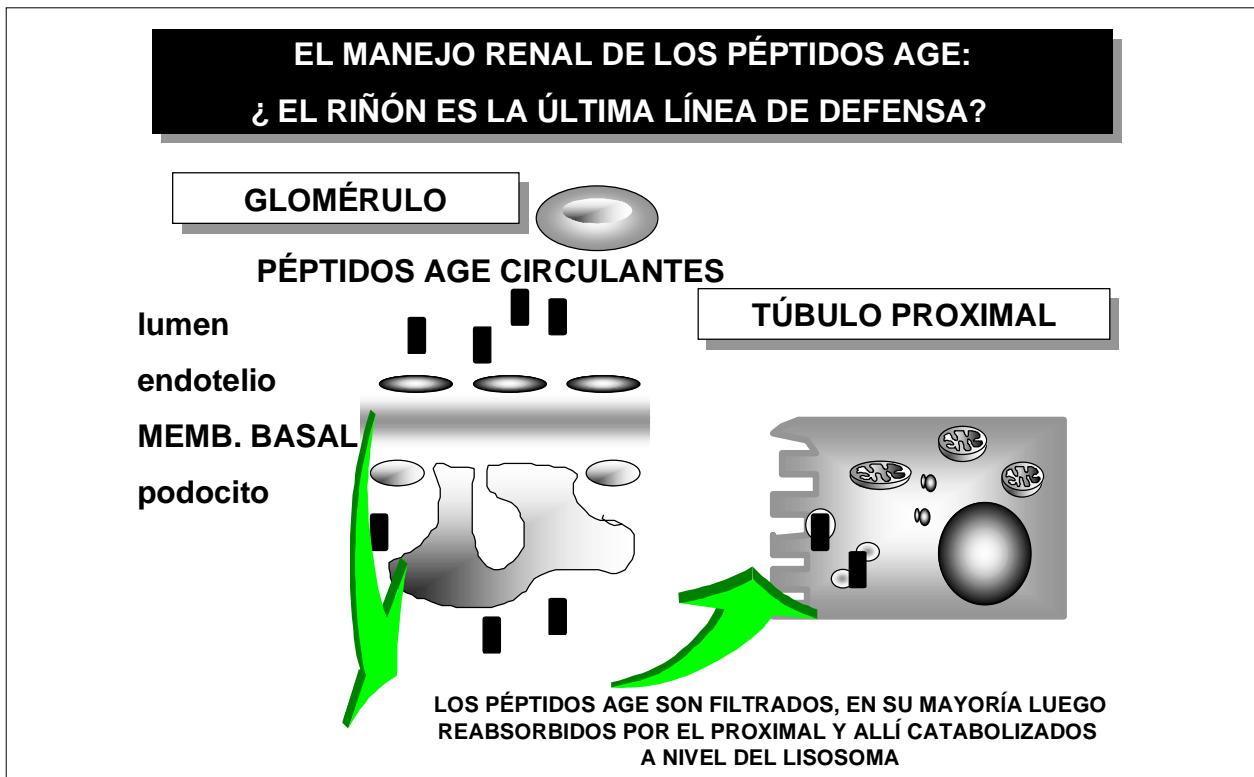


Figura 9. Los péptidos AGE son metabolizados por el riñón. Los péptidos AGE circulan, se filtran en los glomérulos y son reabsorbidos por el túbulo proximal. Este esquema resume algunos resultados generados en nuestro laboratorio. (Véase el texto por más detalles).

Laglicación más allá de los glúcidos simples: agentes glicantes de “segunda generación” (figura 8)

Como fue indicado previamente, la glicación por glucosa es muy lenta si se compara con la producida por muchos otros monosacáridos. Tan es así que muchos autores piensan que la aparición de la glucosa como el principal monosacárido circulante constituye una ventaja evolutiva de las formas más complejas de vida: en otras palabras, tenemos el azúcar menos tóxico en nuestra circulación⁽⁸⁶⁾. En los últimos años se han puesto en evidencia otros compuestos que median la glicación. Es así que se ha descubierto que existen en la circulación ciertos péptidos de bajo peso molecular y que contienen, en forma concentrada, los intermediarios dicarbonilo de la reacción de Maillard que son mucho más reactivos que la glucosa^(87,88). Se cree que estos péptidos AGE circulantes son probablemente el resultado del catabolismo incompleto de proteínas AGE, a cargo de los macrófagos y otras células. Estos compuestos circulan en niveles altos en plasma de pacientes diabéticos, así como (lo que constituyó inicialmente una sorpresa) de pacientes con insuficiencia renal^(87,88). Dichos péptidos AGE serían así fragmentos catabólicos en vías de ser excretados por el riñón, de ahí su aumento en la uremia. Algunos investigadores en necrología sugieren,

en el momento actual, que estos péptidos AGE circulantes, que dializan mal, serían algunas de las toxinas urémicas “medianas”.

En esta línea de investigación, utilizando técnicas bioquímicas e inmunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica, nuestro trabajo ha demostrado que los péptidos AGE circulantes son filtrados y catabolizados en parte por el sistema endolisosomal del túbulo contorneado proximal, como se observa en la figura 9. Nuestros datos sugieren que esta reabsorción podría estar mediada por receptores AGE, similares a los descritos más arriba en varios tipos de células. Según lo precisado anteriormente, la activación de estos receptores acciona varias respuestas celulares incluyendo la secreción de citoquinas y las reacciones de oxidación⁽⁸⁹⁾. Siguiendo esta línea de razonamiento, hemos esbozado la hipótesis de que en la diabetes un aumento en estos procesos podría participar en la reacción intersticial de fibrosis que acompaña la glomerulosclerosis característica de la última etapa de la enfermedad renal⁽⁹⁰⁾.

Sin embargo, el sino final de los péptidos AGE circulantes sigue sin ser determinado, puesto que no se ha descubierto ninguna enzima que podría mediar su catabolismo una vez que la hidrólisis lisosomal de los enlaces peptídicos ha ocurrido. Se podría especular en la existencia de un proceso lento de secreción hacia la orina de los

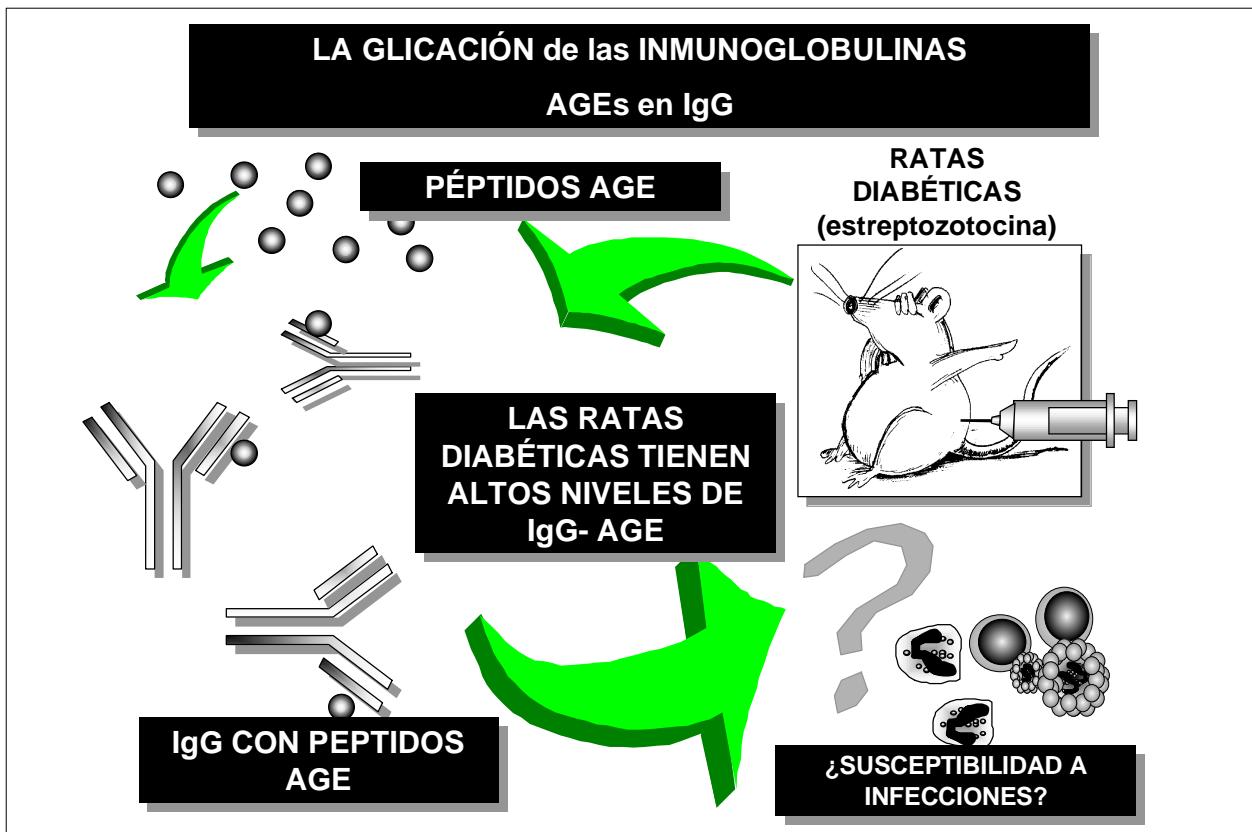


Figura 10. Los péptidos AGE modifican las IgG. Este diagrama resume resultados generados en nuestro laboratorio que muestran que los péptidos AGE circulantes modifican las IgG en ratas diabéticas. (Véase el texto por más detalles).

aminoácidos AGE resultantes de este catabolismo por la célula tubular. Dicho proceso podría también explicar la presencia de AGEs tales como la pentosidina en la orina de los pacientes diabéticos⁽⁹¹⁻⁹⁵⁾. Pensamos que a largo plazo, un exceso crónico en la carga tubular de péptidos AGE, debido a la diabetes, puede sobresaturar el mecanismo de eliminación y conducir a trastornos tubulares⁽⁸⁹⁾.

Finalmente, los péptidos AGE circulantes pueden no sólo ligarse a las proteínas, sino también a los fosfolípidos⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾. Es razonable pensar que los péptidos AGE reaccionan con los fosfolípidos de las membranas, si están presentes localmente en altas concentraciones tales como las demostradas por nosotros en los lisosomas. Una acumulación de estos compuestos en los lisosomas tubulares podría constituir una agresión más a las membranas contribuyendo de esta manera a la toxicidad global⁽⁹⁰⁾.

En resumen, además de los AGEs derivados de la glucosa, existen los productos endógenos producidos por degradación parcial de las proteínas así modificadas, los péptidos AGE, que pueden amplificar el daño tisular y actuar así como toxinas per se. En este caso el proceso constituiría un mecanismo patogénico compartido por la diabetes (exceso de producción) y la insuficiencia renal (defecto de excreción).

Las proteínas del plasma y de la matriz extracelular pueden ser “atacadas” por la glucosa en sí o por estos agentes más potentes o de “segunda generación” (si se nos permite una analogía con los antibióticos). Esto ha sido demostrado en el caso de varias proteínas del plasma, incluyendo las LDL. De hecho, usando un modelo de diabetes experimental en animales⁽⁹⁹⁾, nosotros hemos demostrado que los péptidos AGE circulantes modifican las IgG, en particular las cadenas livianas y estos resultados están esquematizados en la figura 10. Recientemente hemos encontrado resultados similares en un estudio con diabéticos tipo 2⁽¹⁰⁰⁾. Estas modificaciones estructurales de la IgG podrían conducir a la alteración funcional de las moléculas del anticuerpo y estar vinculadas al bien conocido aumento en la susceptibilidad a la infección característica en la diabetes mellitus.

Hiperglicemia y complicaciones macrovasculares

En lo que respecta al papel directo de la hiperglicemia en las complicaciones macrovasculares de la diabetes tipo 1 y 2, numerosas preguntas siguen sin respuesta aún y lo mismo podemos decir al respecto sobre cómo el tratamiento energético de la hiperglicemia podría afectar estas compli-

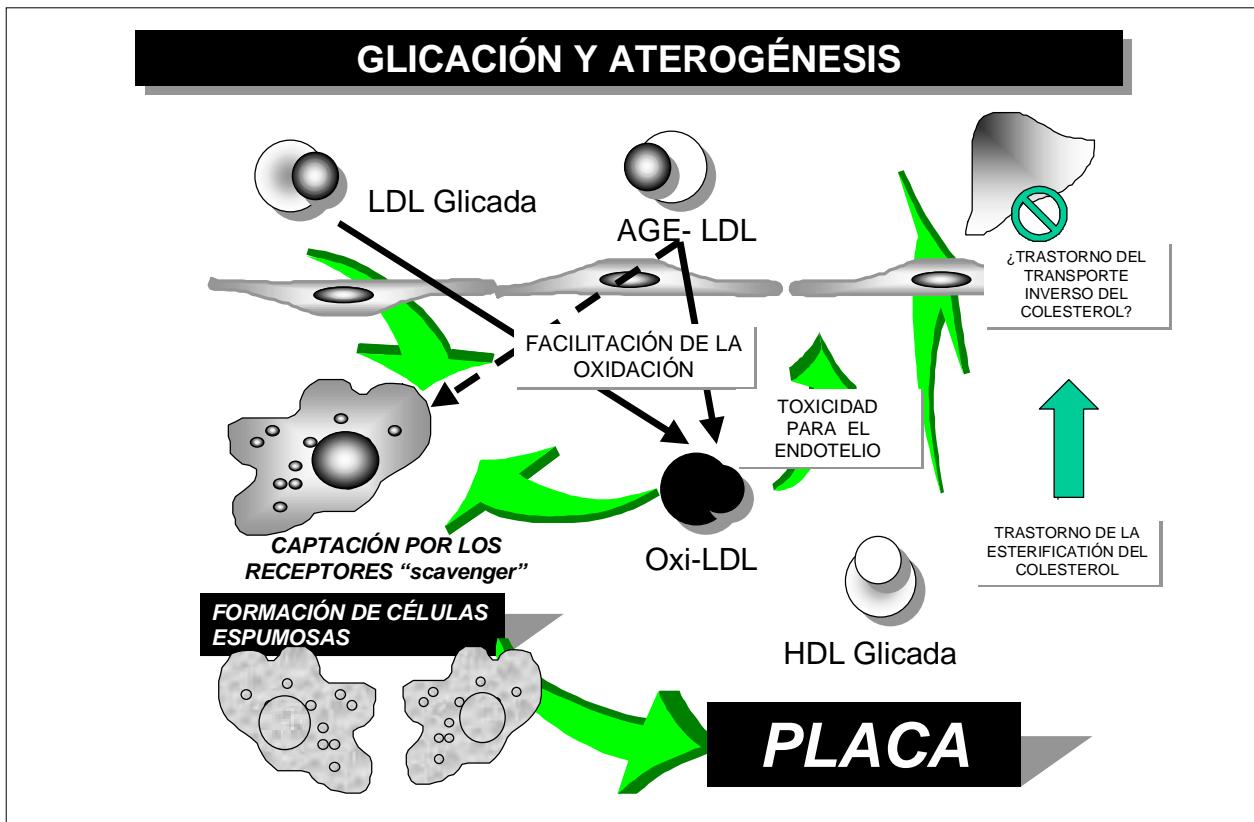


Figura 11. Glicación y macroangiopatía. Representación esquemática de las vías principales por las cuales la glicación de lipoproteínas puede acelerar la aterosclerosis. (Véase el texto por más detalles).

caciones. Con la herramienta que constituye la medida de los niveles de HbA_{1c}, el DCCT encontró una reducción de 41% en el riesgo de accidentes macrovasculares, que no fue estadísticamente significativa debido a la baja frecuencia de estos episodios en esa población relativamente joven de diabéticos tipo 1^(11,12). Sin embargo, estos datos sugieren ciertamente un papel posible de la hiperglucemia en la aceleración del proceso aterosclerótico en pacientes con diabetes tipo 1. Resultados similares fueron obtenidos en el UKPDS que se publicó a fines de 1998⁽¹³⁻¹⁵⁾.

¿Qué mecanismos han sido propuestos para explicar el vínculo entre la hiperglucemia y la aterosclerosis?

Muchos de los aspectos ilustrados en la figura 3 se aplican tanto a la micro como a la macroangiopatía. Los AGEs del colágeno de la pared arterial pueden atrapar las partículas de LDL que entonces pueden acumularse en la íntima. De esta manera, la LDL sería más propensa a la oxidación y a la captación local por los monocitos-macrófagos. Al mismo tiempo, la LDL oxidada causaría la activación de la célula endotelial⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾. Dicha activación podría mediar la secreción de matriz extracelular favoreciendo la formación de la base fibrótica del ateroma. Por otra parte, la activación de los receptores de los monocitos por las pro-

teínas AGE en la pared vascular, tales como el colágeno y la elastina, desencadenaría la secuencia ya mencionada de reacciones inflamatorias mediadas por citoquinas^(102,104). Este cuadro es, sin embargo, muy incompleto en el momento actual porque algunos mecanismos de la activación de célula endotelial se han observado solamente *in vitro* o en animales.

Por otra parte, como el diagrama en la figura 11 intenta resumir, una extensa literatura demuestra el rol de la glicación de las lipoproteínas en la aterogénesis⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾. Se ha descrito la glicación precoz de la apoB, de las apoAs y de las apoEs⁽¹⁰⁸⁾, y se tienen datos que prueban un metabolismo alterado de las formas glicadas de LDL y HDL^(105,107). La glicación puede tener efectos directos y puede también amplificar los efectos del estrés oxidativo en las lipoproteínas^(63,97,109-111). Así, ha sido demostrado por diversos autores, incluyendo nosotros, que la glicación no sólo aumenta la susceptibilidad de la LDL a la oxidación⁽¹¹⁰⁻¹¹¹⁾, sino que también, según lo expresado anteriormente, intensifica la propensión de las proteínas estructurales de la pared vascular a ligar las proteínas del plasma, incluyendo la LDL, contribuyendo así a una modificación oxidativa más marcada de dichas partículas. Las LDL glicadas y oxidadas inducen la acumulación de ésteres de colesterol

en macrófagos humanos y pueden también promover disfunción plaquetaria y endotelial^(112,113).

En lo que respecta a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), nosotros fuimos los primeros en demostrar que la activación *in vitro* de la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) por la apolipoproteína A-I glicada (apoA-I es la apolipoproteína principal en la HDL), es inferior a la activación por la apolipoproteína A-I nativa⁽¹¹⁴⁾. Estos datos fueron luego confirmados por otros investigadores en pacientes diabéticos^(115,116). Siendo la LCAT una fuerza impulsora clave en el transporte inverso del colesterol, se puede conjeturar que esta activación anormal estaría asociada a una reducción en el retorno del colesterol al hígado y contribuiría a la aceleración de la aterosclerosis en pacientes diabéticos. Aparte de estos estudios sobre lipoproteínas modificadas por la glucosa en lo que llamamos “glicación precoz”, otras evidencias han demostrado que la modificación de LDL por AGEs deteriora los mecanismos de captación de LDL y contribuye a explicar los niveles elevados de LDL en pacientes diabéticos⁽¹¹⁷⁾. Incluso si es prematuro concluir que la reducción de la hiperglicemia tendría un gran impacto en la disminución del riesgo de patología macrovascular, como lo tiene en la microangiopatía, estos estudios agregan un estímulo adicional para explorar este aspecto.

¿Disponemos de algún agente farmacológico contra los AGE?

Los agentes terapéuticos que inhiben la formación de AGEs han permitido investigar el papel de los mismos en el desarrollo de las complicaciones diabéticas usando modelos animales⁽¹¹⁸⁾. El principal inhibidor de los AGEs que se ha estudiado en considerable detalle es la aminoguanidina. La aminoguanidina reacciona principalmente con los intermediarios dicarbonilo tales como la 3-deoxiglucosona y bloquea la secuencia reacional que conduce a los AGEs⁽¹¹⁹⁾. La prevención de la formación de AGEs por el tratamiento con aminoguanidina retrasa la evolución de las lesiones microvasculares encontradas en la retina o los glomérulos de animales diabéticos, así como podría también tener un potencial terapéutico en el control de la neuropatía periférica diabética⁽¹²⁰⁻¹²⁶⁾.

La gran pregunta ante estos resultados tan alentadores es si los inhibidores de la producción de AGEs también podrían prevenir las complicaciones diabéticas en humanos. Para contestarla, los efectos de la aminoguanidina sobre varios indicadores de nefropatía diabética están siendo analizados en un estudio multicéntrico, randomizado y doble-ciego en Estados Unidos y Europa, que está actualmente en su fase III. Por otra parte, la industria farmacéutica está sintetizando y probando cientos de compuestos pasibles de efectuar la lisis de los AGEs.

Conclusión

Es por todos conocido que la microangiopatía diabética no puede explicarse simplísticamente, muchos factores están implicados. Sin embargo, el estudio DCCT demostró indiscutiblemente en 1993 que el control glicémico estricto es capaz de retrasar dramáticamente el inicio de las complicaciones microangiopáticas o retardar su evolución. Esto fue corroborado para la diabetes tipo 2 por el UKPDS publicado en 1998. La prevención de las complicaciones diabéticas requiere de este modo por lo menos el control de la glicemia. La hiperglicemia es considerada hoy como un factor protagónico en el desarrollo de las complicaciones vasculares diabéticas, pudiendo mediar sus efectos nocivos por múltiples mecanismos, entre los cuales la glicación parece jugar un rol preponderante. Estudios en animales demuestran que la aminoguanidina, un inhibidor de este proceso, atenúa el desarrollo de las complicaciones vasculares diabéticas. La meta glicémica recomendada para la mayoría de los pacientes es por lo menos mantener la HbA1c menos de 2% por encima del límite superior de los valores de referencia. Evidentemente, algunos pacientes no pueden lograr este grado de control por una diversidad de razones. Además, la terapéutica necesita ser individualizada y adaptada a cada paciente. A medida que la nueva información aportada por la investigación básica y clínica se va haciendo disponible, nuestra mejor comprensión del rol de la hiperglicemia modificará seguramente la manera en que tratamos la diabetes.

Agradecimiento: deseamos expresar toda nuestra gratitud a la QF Lydia Dibarrat por habernos mostrado la senda del rigor científico.

Summary

Hyperglycemia is currently considered as a causal key factor in the development of diabetic vascular complications that might cause harmful effects by multiple ways. This fact was clearly confirmed by the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) for microangiopathy in type I diabetes and proved by the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) for type II diabetes. Both studies confirmed what was clinically suspected for a long time: prevention of diabetes complications needs at least an efficient control of glycemia.

The present review resumed current evidence of the role of hyperglycemia in vascular complications. We briefly draw the polyol way, protein kinase C and oxidative “stress”. The aim of the paper is to deep on the direct deleterious action of glucose and other monosaccharides on proteins, known as glycation or non-enzymatic glycation, one of the biochemical mechanism more relevant in

this pathology. We also included a synopsis of our findings. Evidence obtained from research in animals and clinical trials of phase III are underlined, indicating that the glycation inhibitor, aminoguanidine, delays the beginning and modifies the course of complications. Lastly, we considered relations between glycation, biochemistry of aging and renal failure.

Résumé

L'hyperglycémie est considérée à l'heure actuelle comme facteur de cause impliqué au développement des complications vasculaires diabétiques, provoquant ses effets nocifs par de différentes voies. Cela est nettement confirmé par l'étude DCCT pour la microangiopathie dans le cas du diabète type 1 et prouvé par le UKPDS publié vers la fin 1998 dans le cas du diabète type 2. Ces études ont confirmé ce qui a été longtemps perçu à la clinique: la prévention des complications diabétiques exige au moins un bon contrôle de la glycémie. Dans la présente révision, on résume les évidences actuelles qui remarquent le rôle de l'hyperglycémie aux complications vasculaires. Après la description du rôle de la voie poliol, de la protéine Kinase C et du stress oxidatif, on approfondit l'un des mécanismes biochimiques protagonistes à cette pathologie: l'action délétère directe de la glucose et d'autres monosaccharides sur les protéines, connue comme glycation ou glycosylation pas-enzymatique. On y inclut aussi une briève analyse de certains aspects de notre propre recherche dans ce domaine. On souligne enfin, l'évidence obtenue dans des études en animaux et dans les essais cliniques de phase III, en soutenant que l'aminoguanidine, inhibiteur de la glycation, retarde l'apparition et modifie le cours de ces complications-là. On parle finalement du lien existant entre la glycation, la biochimie du vieillissement et la pathogénie de l'insuffisance rénale.

Bibliografía

1. Stern M. Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis. *Diabetes* 1995; 44: 369-74.
2. Eastman RC, Siebert CW, Harris M, Gorden P. Clinical Review 51: Implications of the Diabetes Control and Complications Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:1105-7.
3. Turner R. The U.K. Prospective Diabetes Study. A review. *Diabetes Care* 1998; 21 Suppl 3: C35-8.
4. Clark CJ, Lee D. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995; 332: 1210-7.
5. Fore W. Noninsulin-dependent diabetes mellitus. The prevention of complications. *Med Clin North Am* 1995; 79: 287-98.
6. Bodansky HJ, Cudworth AG, Drury PL, Kohner EM. Risk factors associated with severe proliferative retinopathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1982; 5: 97-100.
7. Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner ID, Morris AD. ABC of arterial and venous disease: vascular complications of diabetes. *BMJ* 2000; 320(7241): 1062-6.
8. Lorenzi M. Glucose toxicity in the vascular complications of diabetes: the cellular perspective. *Diabetes/Metab Rey* 1992; 8: 85-103.
9. Steffes MW, Mauer SM. Pathophysiology of renal complications. In: Rifkin H PJ D, ed. *Diabetes Melitus Theory and Practice*. New York: Elsevier Science Publishing, 1990: 257-63. (Vol. 16).
10. Chukwuma CS. Type 2 diabetic nephropathy in perspective. *J Diabetes Compl* 1995; 9: 55-67.
11. The Diabetes Control and Complications Trial Data Group. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1995; 44: 968-83.
12. The Diabetes Control and Complications Trial Data Group. The effect of intensive diabetes management on macrovascular events and risk factors in the Diabetes Control and Complications Trial. *Am J Cardiol* 1995; 75: 894-903.
13. The United Kingdom Prospective Diabetes Study Data Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998; 352: 837-53.
14. Watkins P. UKPDS: a message of hope and a need for change. United Kingdom Prospective Diabetes Study. *Diabet Med* 1998; 15:895(6): 895-6.
15. Nathan D. Some answers, more controversy, from UKPDS. United Kingdom Prospective Diabetes Study. *Lancet* 1998; 352: 832-3.
16. The Diabetes Control and Complications Trial Data Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
17. Gabbay K. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N Engl J Med* 1973; 288: 831-6.
18. Boel E, Selmer J, Flodgaard H, Jensen T. Diabetic late complications: will aldose reductase inhibitors or inhibitors of advanced glycosylation endproduct formation hold promise? *J Diabetes Compl* 1995; 9: 104-29.
19. Soulis-Liparota T, Cooper M, Dunlop M, Jerums G. The relative roles of advanced glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia* 1995; 38: 387-94.
20. Maillard LC. Condensation des acides aminés sur les sucres; formation de melanoidines par voie méthodique. *CR Acad Sci Paris* 1912; 154: 66-8.
21. Njoroge FG, Monnier VM. The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. *Prog Clin Biol Res* 1989; 304: 85-91.
22. Monnier V. Toward a Maillard reaction theory of aging. In: Baynes JW, Monnier VM, ed. *Proceedings of the NIH Conference on the Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition*. New York: Liss, 1989: 1-22.
23. Brownlee M. Advanced products of non-enzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. In: Rifkin HPDJ ed. *Diabetes melitus: theory and practice*. New York: Elsevier, 1990: 279-91.
24. Ziyadeh F. Mediators of hyperglycemia and the pathogenesis of matrix accumulation in diabetic renal disease. *Miner Electrolyte Metab* 1995; 21: 292-302.
25. Baynes J, Thorpe S. Role of oxidative stress in diabetic

- complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48:1-9.
26. **Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G.** Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism* 1995; 44: 363-8.
 27. **Lopes-Virella M, Virella G.** Cytokines, modified lipoproteins, and arteriosclerosis in diabetes. *Diabetes* 1996; 45 (Suppl 3): S40-4.
 28. **Korc I, De Mate HC, Muse MI, De Sirtori OA.** Soluble lens proteins in rats on different sugar diets. *Exp Eye Res* 1970; 10: 313-8.
 29. **Lee AY, Chung SS.** Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999; 13(1): 23-30.
 30. **Hamada Y, Odagaki Y, Sakakibara F, Naruse K, Koh N, Hotta N.** Effects of an aldose reductase inhibitor on erythrocyte fructose 3-phosphate and sorbitol 3-phosphate levels in diabetic patients. *Life Sci* 1995; 57: 23-9.
 31. **Ward J.** Biochemical and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Clin Invest Med* 1995; 18: 267-74.
 32. **Robison W, Laver N, Lou M.** The role of aldose reductase in diabetic retinopathy prevention and intervention studies [review]. *Prog Retin Eye Res* 1995; 14: 593-640.
 33. **Skyler JS.** Relation of metabolic control of diabetes mellitus to chronic complications. In: Rifkin H PDJ, ed. *Diabetes mellitus: theory and practice*. New York: Elsevier, 1990: 856-68.
 34. **Baynes JW.** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-41.
 35. **Dahl-Jorgensen K, Brinchmann-Hansen O, Bangstand HJ, Hanssen KE.** Blood glucose control and microvascular complications-what do we know. *Diabetologia* 1994; 37: 1172-7.
 36. **Stevens VJ, Vlassara H, Abati A, Cerami A.** Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1977; 252: 2988-3002.
 37. **Armbruster DA.** Fructosamine: structure, analysis and clinical usefulness. *Clin Chem* 1987; 33: 2157-63.
 38. **Menini T, Gugliucci A, Sodahlon YK, Stahl AJC, Bickle JF, Brogard JM.** Glycated immunoglobulin M in diabetic patients. *Ann Biol Clin* 1993; 51: 887-91.
 39. **Gugliucci A, Menini T, Stahl AJC.** Glycation of fibrinogen in diabetic patients: a practical colorimetric assay. *Glycosylation Dis* 1994; 1: 177-84.
 40. **Hunt JV, Smith CT, Wolfe SP.** Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990; 39: 1420-4.
 41. **Giardino I, Edelstein D, Brownlee M.** Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. *J Clin Invest* 1994; 94:110-7.
 42. **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.
 43. **Gugliucci A.** Advanced glycation of rat liver histone octamers: an *in vitro* study. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 588-93.
 44. **Fujii E, Iwase H, Ishii-Karakasa I, Yajima Y, Hotta K.** The presence of 2-keto-3-deoxygluconic acid and oxoaldehyde dehydrogenase activity in human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210(3): 852-7.
 45. **Niwa T, Takeda N, Miyazaki T, Yoshizumi H, Tatematsu A, Maeda K, et al.** Elevated serum levels of 3-deoxyglucosone, a potent protein-cross-linking intermediate of the Maillard reaction, in uremic patients. *Nephron* 1995; 669: 438-43.
 46. **Wellsknecht M, Thorpe S, Baynes J.** Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry* 1995; 34: 15134-41.
 47. **Tanaka S, Avigad G, Brodsky B, Eikenberry EF.** Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol* 1988; 495-505.
 48. **Monnier VM, Kohn RR, Cerami A.** Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *P Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 583-9.
 49. **Brownlee M, Vlassara H, Cerami A.** Non enzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes* 1985; 34: 938-41.
 50. **Brownlee M, Pongor S, Cerami A.** Covalent attachment of soluble proteins by nonenzymatically glycosylated collagen: role in the *in situ* formation of immune complexes. *J Exp Med* 1983; 158: 1739-44.
 51. **Haneda M, Kikkawa R, Horide N, Togawa M, Koya D, Kajiwara N et al.** Glucose enhanced type IV collagen production in cultured rat glomerular mesangial cells. *Diabetologia* 1991; 34: 198-200.
 52. **Bailey A, Sims TJ, Avery NC, Miles CA.** Chemistry of collagen cross-links: glucose-mediated covalent cross-linking of type-IV collagen in lens capsules. *Biochem J* 1993; 296: 489-97.
 53. **Makino H, Shikata K, Hironaka K, Kushiro M, Yamasaki Y, Sugimoto H, et al.** Ultrastructure of nonenzymatically glycated mesangial matrix in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1995; 48: 517-26.
 54. **Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS.** Altered cellular interactions between endothelial cells and non enzymatic glycosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem* 1992; 267: 12404-7.
 55. **Striker LJ, Peten EP, Elliot SJ, Dio T, Striker GE.** Mesangial cell turnover: effect of heparin and peptide growth factors. *Lab Invest* 1991; 64(4): 446-56.
 56. **Lloyd-Jones D, Bloch K.** The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med* 1996; 47: 365-75.
 57. **Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B.** Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters* 1995; 369: 131-5.
 58. **Bucala R, Tracey KJ, Cerami A.** Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991; 87: 432-8.
 59. **Bierhaus A, Hofmann M, Ziegler R, Nawroth P.** AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 1998; 37: 586-600.
 60. **Thornalley P.** Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol* 1998; 44: 1013-23.
 61. **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): S65-6.
 62. **Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al.** Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 1994; 269: 9889-97.
 63. **Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D.** Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1521-8.
 64. **Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D.** Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 1993; 91: 2155-68.

66. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach J, Brett J, Ryan J, Kao J et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 1992; 267: 14987-97.
67. Schmidt AM, Mora R, Cao K, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R et al. The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *J Biol Chem* 1994; 269: 9882-8.
68. Horii Y, Skolnik E, Suthanthiran M, Vlassara H. Novel T-cell receptors for advanced glycation endproducts (AGE) mediate production of IFN. *Diabetes* 1992; 41: 59A.
69. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Novel macrophage receptor for glucose-modified protein is distinct from previously describes scavenger receptors. *J Exp Med* 1986; 164: 1301-9.
70. Wautier J, Zoukourian C, Chappéy O, Wautier M, Guillausseau P, 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.
71. Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, et al. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 1997; 96: 2262-71.
72. Ruggiero-Lopez D, Rellier N, Lecomte M, Lagarde M, Wiernsperger N. Growth modulation of retinal microvascular cells by early and advanced glycation products. *Diabetes Res Clin Pract* 1997; 34: 135-42.
73. Yan S, Stern D, Schmidt A. What's the RAGE? The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the dark side of glucose. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 179-81.
74. Doi T, Vlassara H, Kirstein M, Yamada Y, Striker GE, Striker LJ. Receptor specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycation end products is mediated via platelet derived growth factor. *P Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2873-7.
75. Skolnik EY, Yang Z, Makita Z, Radoff S, Kirstein M, Vlassara H. Human and rat mesangial cell receptors for glucose-modified proteins: potential role in kidney tissue remodeling and diabetic nephropathy. *J Exp Med* 1991; 174: 931-9.
76. Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai, Cerami A, Bucala R. Exogenous advanced glycosylation endproducts induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *P Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12043-7.
77. Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Amino-guanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 1998; 47(7): 1114-20.
78. Bucala R, Model P, Cerami A. Modification 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: 105-9.
79. Bucala R, Model P, Russel M, Cerami A. Modification of DNA by glucose-6-phosphate induces DNA rearrangements in an *E. coli* plasmid. *Proc Natl Acad Sel USA* 1985; 82: 8439-42.
80. Mullokandov EA, Franklin WA, Brownlee M. Damage of DNA by the glycation products of glyceraldehyde-3-phosphate and lysine. *Diabetologia* 1994; 37: 145-9.
81. Gugliucci A, Bendayan M. Histones from diabetic rats contain increased levels of advanced glycation products. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212: 56-62.
82. Kaneto H, Fujii J, Myint T, Miyazawa N, Islam KN, Kawasaki Y, Suzuki K 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(3): 855-63.
83. Makita Z, Vlassara H, Rayfield E, Cartwright K, Friedman E, Rodby R, et al. Hemoglobin-AGE: a circulating marker for advanced glycosylation. *Science* 1992; 258: 651-3.
84. McPherson J, Shilton B, Walton D. Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins. *Biochemistry* 1988; 27: 1901-7.
85. Takagi Y, Kashiwagi A, Tanaka Y, Asahina T, Kikkawa RYS. Significance of fructose-induced protein oxidation and formation of advanced glycation end product. *J Diabetes Complications* 1995; 9: 87-91.
86. Bunn HF, Higgins PJ. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 1981; 213: 222-4.
87. Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, Friedman EA, Kaufman AM, Korbet SM, et al. Reactive glycosylation end products in diabetic uremia and treatment of renal failure. *Lancet* 1994; 343: 1519-22.
88. Bucala R, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *A J Kidney Dis* 1995; 26: 875-88.
89. Fuh H, Yang D, Striker L, Striker G, Vlassara H. *In vivo* AGE-peptide injection induces kidney enlargement and glomerular hypertrophy in rabbits: prevention by aminoguanidine. *Diabetes* 1992; 41: 9A.
90. Gugliucci A, Bendayan M. Renal fate of advanced glycation products: evidence for reabsorption and catabolism of advanced glycation peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia* 1996; 39: 149-60.
91. Sell DR, Monnier VM. End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *J Clin Invest* 1990; 85(2): 380-4.
92. Takahashi M, Ohishi T, Aoshima H, Kawana K, Kushida K, Inoue T, et al. The Maillard protein cross-link pentosidine in urine from diabetic patients. *Diabetologia* 1993; 36: 664-7.
93. Miyata T, Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, van Ypersele de Strihou C et al. Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int* 1998; 53(2): 416-22.
94. Weiss M, Rodby R, Justice A, Hricik D. Free pentosidine and neopterin as markers of progression rate in diabetic nephropathy. Collaborative Study Group. *Kidney Int* 1998; 54: 193-202.
95. Miyata T, Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, Ypersele de Strihou van C, et al. Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int* 1998; 53: 416-22.
96. Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation *in vivo*. *P Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6434-8.
97. Bucala R, Cerami A. Phospholipids react with glucose to initiate advanced glycosylation and fatty acid oxidation: inhibition of lipid advanced glycosylation and oxydation by aminoguanidine. *Diabetes* 1992; 41(23A): 91.
98. Hicks M, Delbridge L, Yue DK, Reeve TS. Catalysis of lipid peroxidation by glucose and glycosylated collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 151: 649-55.
99. Gugliucci A, Menini T. Circulating advanced glycation peptides in streptozotocininduced diabetic rats: evidence for preferential modification of IgG light chains. *Life Sci* 1998; 62: 2141-50.

100. **Gugliucci A, Menini T, Stahl AJC, Brogard JM.** Advanced glycation of immunoglobulin G and albumin in type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2000 (in press).
101. **Witztum J, Steinberg D.** Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785-92.
102. **Bierman E.** Atherogenesis in diabetes. *Atheroscler Thromb* 1992; 12: 647-56.
103. **Berliner J, Heinecke J.** The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 707-27.
104. **Guyton J.** The role of lipoproteins in atherogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1995; 369: 29-38.
105. **Kortlandt W, Rijn van H, Erkelens D.** Glycation and lipoproteins. *Diab Nut Metab* 1993; 6: 231-9.
106. **Lyons T.** Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Diabetes* 1992; 41: 67-73.
107. **Lyons T, Jenkins A.** Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8: 174-80.
108. **Curtiss LK, Witztum JL.** Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CI and E are glucosylated in hyperglycemic diabetic subjects. *Diabetes* 1985; 34: 452-61.
109. **Kobayashi K, Watanabe J, Umeda F, Nawata H.** Glycation accelerates the oxidation of low density lipoprotein by copper ions. *Endocr J* 1995; 42: 461-5.
110. **Gugliucci A, Stahl AJC.** Scavenger receptors assay in human monocyte-derived macrophages. *J Immunol Meth* 1994; 174, 103-7.
111. **Gugliucci A, Menini T, Stahl AJC.** Susceptibility to copper-enhanced autoxidation of VLDL+LDL fractions from diabetic patients. *Biochem Mol Biol Int* 1994; 32: 139-47.
112. **Gugliucci A, Dumont S, Siffert JC, Stahl AJC.** In vitro glycated low density lipoprotein interaction with human monocyte-derived macrophages. *Res Immunol* 1992; 143, 17-23.
113. **Gugliucci A, Dumont S, Siffert JC, Stahl AJC.** Comparative interaction of glycated and oxidized low density lipoproteins with human monocyte-derived macrophages. *Int J Immunopathol Pharmacol* 1993; 6: 51-7.
114. **Gugliucci A, Stahl A.** In vitro glycation of human apolipoprotein AI reduces its efficiency in lecithin:cholesterol acyltransferase activation. *Clin Chim Acta* 1991; 204: 37-42.
115. **Calvo C, Ulloa N, Del Pozo R, Verdugo C.** Decreased activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by glycated apolipoprotein A-I. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31: 217-20.
116. **Fournier N, Myara I, Atger VNM.** Reactivity of lecithin-cholesterol acyl transferase (LCAT) towards glycated high-density lipoproteins (HDL). *Clin Chim Acta* 1995; 234: 47-61.
117. **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 dislipidemia of diabetes and renal insufficiency. *P Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9441-5.
118. **Brownlee M, Vlassara H, Kooney T, Ulrich P, Cerami A.** Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986; 232: 1629-32.
119. **Chen H, Cerami A.** Mechanism of inhibition of advanced glycosylation by aminoguanidine *in vitro*. *J Carbohydrate Chem* 1993; 12: 731-42.
120. **Huijberts MSP, Wolffenbuttel BHR, Crijns FRL, Nieuwenhuijsen Kruseman AC, Bemelmans MHA, Struijker Boudier HAJ.** Aminoguanidine reduces regional albumin clearance but not urinary albumin excretion in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1994; 37: 10-4.
121. **Hammes HP, Brownlee M, Edelstein D, Saleck M, Federlin MK.** Aminoguanidine inhibits the development of accelerated diabetic retinopathy in the spontaneous hypertensive rat. *Diabetologia* 1994; 37: 32-5.
122. **Kihara M, Schmelzer JD, Poduslo JF, Curran GL, Nicklander KK, Low PA.** Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electrophysiology, and oxygen free radicals. *P Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6107-11.
123. **Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M.** Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *P Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11555-8.
124. **Hammes H, Strodtter D, Weiss A, Bretzel R, Federlin K.** Secondary intervention with aminoguanidine retards the progression of diabetic retinopathy in the rat model. *Diabetologia* 1995; 38: 656-60.
125. **Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G.** Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1991; 40: 1328-35.
126. **Edelstein D, Brownlee M.** Aminoguanidine ameliorates albuminuria in diabetic hypertensive rats. *Diabetologia* 1992; 35: 96-7.