



Universitat de Lleida

Estudi DMAGE: Diabetes Mellitus and damage caused by Advanced Glycation End-products

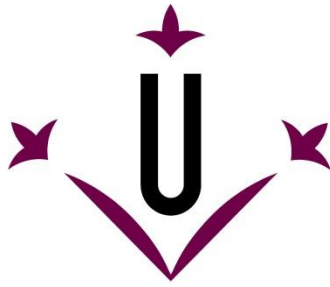
Enric Sánchez Peña

<http://hdl.handle.net/10803/663150>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

**Estudi DMAGE:
Diabetes Mellitus and damage caused by
Advanced Glycation End-products**

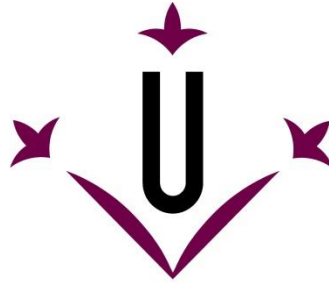
ENRIC SÁNCHEZ PEÑA

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de
Lleida
Programa de Doctorat en Salut

Directors
Dr. ALBERT LECUBE TORELLÓ
Dra. ELVIRA FERNÁNDEZ GIRÁLDEZ

Tutor
Dr. MANEL PORTERO OTIN

2018



Universitat de Lleida

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Estudi DMAGE:

Diabetes Mellitus and damage caused by

Advanced Glycation End-products

Doctorand

ENRIC SÁNCHEZ PEÑA

Directors

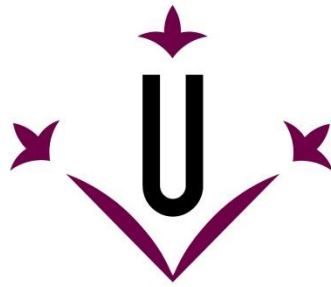
Dr. ALBERT LECUBE TORELLÓ

Dra. ELVIRA FERNÁNDEZ GIRÁLDEZ

Tutor

Dr. MANEL PORTERO OTIN

2018



Universitat de Lleida

Albert Lecube Torelló, cap de servei de Endocrinologia i Nutrició del Hospital Universitari Arnau de Vilanova,

Elvira Fernández Giráldez, Directora del IRBLleida, i

Manel Portero Otin, professor titular de la Universitat de Lleida:

CERTIFIQUEM que la Tesi Doctoral anomenada “**Estudi DMAGE: Diabetes Mellitus and damage caused by Advanced Glycation End-products**” ha estat realitzada pel senyor Enric Sánchez Peña sota la nostra direcció i tutoria.

Revisat, el present treball de recerca biomèdica compleix els requisits de la Universitat de Lleida i te la deguda qualitat per la seva presentació i defensa com a Tesi Doctoral.

Firmat:

Albert Lecube Torelló

Elvira Fernández Giráldez

Manel Portero Otin

Lleida, Juliol 2018

“If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants”

Isaac Newton

Dedicat a la Mama, al Papa, al meu germà,
i als nostres gossets i gatets

Agraïments

En aquest apartat vull agrair a totes les persones que d'una o altra manera han sigut part d'aquesta Tesi Doctoral;

En primer lloc a l'Albert Lecube, que al moment més delicat de la meua vida em va donar la oportunitat de fer realitat el meu somni. Aquesta oportunitat em va permetre superar amb escreix tots els problemes personals. Durant aquests mesos no hi ha hagut un sol dia que no anés feliç al Hospital Universitari Arnau de Vilanova. Per tots aquests motius el meu afecte envers ell durarà fins l'eternitat en forma de respecte i lleialtat. Professionalment m'ha fet créixer enormement treballant colze amb colze moltíssimes hores. Gràcies Albert, per confiar en mi, i donar-me molt més del que t'imagines.

A l'Elvira Fernández, pel seu incansable treball enfront del Servei de Nefrologia, del IRBLleida i del Bus de la Salut, projecte imprescindible en aquesta Tesi Doctoral.

Al Manel Portero per ser un referent de la investigació biomèdica a Lleida. Sense oblidar-me del seu company José Serrano, un altre referent en tots els àmbits des de que vaig rebre la seva primera classe.

A l'Àngels Betriu i a les infermeres d'UDETMA i del Bus de la Salut, que tant treballen i que em van acollir al seu grup. La Dra. Betriu lidera un grup perfectament metòdic i competitiu en investigació cardiovascular que m'ha servit de mirall.

A tot el Servei d'Endocrinologia i Nutrició, que sempre han col·laborat en la meua formació. Especialment a la Carolina, Liliana i la Raquel, pel compartit en els nostres estudis i congressos. I a la Pilar Ibars, que ha sigut com una segona mare.

Al servei de Pneumologia i la Unitat de la Son, liderats pel Ferran Barbé, així com a la Cecília Turino. Tots ells han sigut un pilar fonamental en el meu desenvolupament professional.

A la Unitat d'Obesitat, especialment al cirurgià Juan Antonio Baena, pel seu afany d'investigació i curiositat any rere any sense defalliment, i per les bones paraules i fets que sempre ha tingut amb mi.

Al Francisco Purroy, puntal de la Neurologia, per confiar i ensenyar-me tant.

A la meua família, que des de la distància sempre em fan costat i es preocupen per mi. Ells van sembrar la llavor del que m'estic convertint. Mil gràcies.

Als meus amics/gues de Prats i de Lleida, pels bons moments i les festes que feien recarregar forces.

I ja per últim, gràcies als pacients pel seu temps i col·laboració. Sense saber-ho m'han donat molts valors i una satisfacció personal incalculable.

ÍNDEX

Presentació	15
Resum dels 4 estudis que donen forma a la Tesi Doctoral	16
Abreviatures	20
Introducció i marc teòric	21
1. Característiques generals dels productes finals de glicació avançada	22
1.1. Definició	22
1.2. Reacció de Maillard	22
1.3. Classificació dels AGEs	24
1.4. AGEs en condicions de salut	24
1.5. Receptors d'AGEs	24
1.6. Eliminació d'AGEs	26
2. Potencial impacte per la salut de l'acumulació d'AGEs	26
2.1. AGEs en condicions patològiques	26
2.2. Glicació del col·lagen i l'elastina	27
2.3. AGEs, envelliment i edat biològica	29
2.4. Quantificació d'AGEs en teixit subcutani	30
2.5. Lector d'AGEs a nivell subcutani	30
3. AGEs en diverses situacions patològiques	31
3.1. AGEs i malaltia ateromatosa: més enllà de les taules de risc cardiovascular	31
3.2. AGEs i Malaltia Renal Crònica	33
3.3. AGEs i desenvolupament de complicacions tardanes de la Diabetis Mellitus tipus 2	34
3.4. El Pulmó com a nou òrgan diana de la DM2	35
3.5. AGEs i Obesitat	37
4. Projecte ILERVAS: El Bus de la salut	39
Hipòtesis	41
Objectius	43
Resultats	45

1. Primer Estudi: AGEs i malaltia ateromatosa subclínica. _____	46
2. Segon Estudi: AGEs i malaltia renal crònica. _____	58
3. Tercer Estudi: AGEs, diabetis mellitus tipus 2 i funció pulmonar. _____	72
4. Quart Estudi: AGEs i obesitat mòrbida _____	84
Discussió _____	93
1. Comentari general _____	94
2. Discussió del Primer Estudi: AGEs i malaltia ateromatosa subclínica _____	95
3. Discussió del Segon Estudi: AGEs i malaltia renal crònica _____	98
4. Discussió del Tercer Estudi: AGEs, diabetis mellitus tipus 2 i funció pulmonar _____	100
5. Discussió del Quart Estudi: AGEs i obesitat mòrbida. _____	103
Conclusions _____	106
Investigacions futures _____	109
Publicacions addicionals en les que el Doctorand ha participat durant el període de formació _____	112
Bibliografia _____	114

Presentació

Aquesta memòria es presenta per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida. Ha sigut redactada segons els criteris establerts en l'Acord núm. 67/2014 del Consell de Govern de 10/04/2014 pel qual s'aprova la Normativa acadèmica de doctorat de la Universitat de Lleida per la presentació de la Tesi Doctoral en format d'articles.

Amb aquesta Tesi s'ha volgut aprofundir en la recerca dels productes finals de glicació avançada (AGEs) mitjançant l'estudi de l'autofluorescència de la pell. Així, hem avaluat el paper que tenen els AGEs en la malaltia cardiovascular, la malaltia renal crònica, la diabetis mellitus tipus 2 i l'obesitat mòrbida. L'estudi de totes aquestes malalties ha estat possible gràcies a la col·laboració de diferents serveis del Hospital Universitari Arnau de Vilanova, així com amb el suport del IRBLleida. Especial importància ha tingut el projecte ILERVAS que no només engloba diferents serveis del Hospital, sinó que també avarca els centres d'Atenció Primària de tota la província de Lleida.

Resum dels 4 estudis que donen forma a la Tesi Doctoral

Introducció: Els productes finals de glicació avançada (AGEs) caracteritzen un grup heterogeni de compostos que de forma fisiològica s'acumulen amb l'edat al nostre organisme. Tot i així, en algunes circumstàncies, es produeix una acumulació accelerada d'AGEs que a través d'una gran varietat de mecanismes causen un dany sistèmic. Fins ara, el paper que juguen els AGEs en patologies com la malaltia cardiovascular, la malaltia renal crònica (MRC), la diabetis mellitus tipus 2 (DM2) i l'obesitat mòrbida encara es desconeix.

Material y mètodes: S'han realitzat quatre estudis; **(1) AGEs i malaltia ateromatosa subclínica:** estudi observacional i transversal amb 2.568 subjectes atesos al Bus de la Salut arreu de tota la província de Lleida. Es va realitzar un estudi ecogràfic vascular per tal d'avaluar la càrrega ateromatosa, definida pel nombre de territoris afectats, la ubicació (carotídea i/o femoral) i l'àrea de les plaques; **(2) AGEs i MRC:** estudi cas-control que analitza les dades de l'ecografia vascular realitzada a 87 pacients amb MRC de lleu a moderada, i a 87 subjectes sans equiparats per edat, sexe i IMC; **(3) AGEs, DM2 i funció pulmonar:** estudi transversal que valora la funció pulmonar de 1.909 subjectes del projecte ILERVAS en funció de la presència d'alteracions hidrocarbonades: 79 DM2, 660 amb prediabetis i 1.170 controls; **(4) AGEs i obesitat mòrbida:** estudi de tres cohorts equiparades per edat i sexe: 52 pacients amb obesitat mòrbida, 46 pacients sotmesos a cirurgia bariàtrica en els darrers 5 anys, i 46 subjectes no obesos. En tots els estudis es va mesurar la concentració d'AGEs mitjançant l'estudi de l'autofluorescència de la pell (SAF).

Resultats: Respectivament; **(1)** Els pacients amb plaques d'ateroma tenen una SAF superior a aquells que no tenen placa, al mateix temps que la SAF es correlaciona amb el nombre de territoris afectats, la seva ubicació i l'àrea de les plaques; **(2)** Els pacients amb estadis de lleu a moderat de MRC mostren un augment de la SAF en comparació amb els subjectes sense MRC, amb una correlació inversa entre la SAF i el filtrat glomerular; **(3)** La SAF es correlaciona de forma negativa amb la funció pulmonar, especialment en els pacients amb DM2; **(4)** Els subjectes amb obesitat mòrbida tenen una major SAF en comparació amb la població no obesa, el que sembla ser a costa d'aquells pacients obesos amb síndrome metabòlica, i especialment amb DM2. Després de la cirurgia bariàtrica, la SAF no disminueix de forma significativa, malgrat la pèrdua ponderal i millora metabòlica.

Conclusions: L'augment de la SAF, com a mesura de la concentració d'AGEs, s'associa amb la malaltia cardiovascular, així com amb el deteriorament de la funció renal i pulmonar. Per tant, la seva determinació pot ser útil per identificar aquells subjectes, amb i sense DM2, més vulnerables de presentar i/o desenvolupar malaltia. Per contra, l'augment de la SAF en l'obesitat està condicionada per l'alta prevalença d'alteracions metabòliques que presenta aquesta població. Per últim, 5 anys no semblen suficients per detectar canvis significants en la SAF, reforçant el concepte de "memòria metabòlica".

Introduction: The Advanced glycation end products (AGEs) characterize a heterogeneous group of compounds that accumulate physiologically with age in our body. However, in some circumstances, an accelerated accumulation of AGEs occurs causing a systemic damage through a high variety of mechanisms. To date, the role played by AGEs in pathologies such as cardiovascular disease, chronic kidney disease (CKD), type 2 diabetes (T2D) and morbid obesity is still unknown.

Material and methods: Four studies have been carried out; **(1) AGEs and subclinical atheromatous disease:** An observational and cross-sectional study with 2,568 subjects attended in the Bus of Health across the entire province of Lleida. A vascular ultrasound study was performed to evaluate the atheromatous burden defined by the number of affected territories, the location (carotid and/or femoral) and the area of the plaques; **(2) AGEs and CKD:** A case-control study that analyzes the data of vascular ultrasound study performed on 87 patients with mild-to-moderate stages of CKD and 87 healthy subjects matched by age, sex, and BMI; **(3) AGEs T2D and pulmonary function:** A cross-sectional study assessing the pulmonary function of 1,909 subjects from ILERVAS project according to the presence of glucose abnormalities; **(4) AGEs and morbid obesity:** study with three age and sex matched cohorts: 52 patients with morbid obesity, 46 patients undergoing bariatric surgery in the last 5 years, and 46 non-obese subjects. In all studies the concentration of AGEs was measured by the evaluation of skin autofluorescence (SAF).

Results: Respectively; **(1)** Patients with atheromatous plaques had a higher SAF than those with no plaque, at the same time SAF correlates with the number of affected territories, their location and the area of the plaques; **(2)** Patients with mild-to-moderate stages of CKD showed an increased SAF compared to non-CKD subjects, with an inverse correlation between SAF and glomerular filtration rate; **(3)** SAF was negatively correlated with pulmonary function, especially in T2D patients;. **(4)** Subjects with morbid obesity had a higher SAF in comparison with non-obese patients, which seems to be at the expense of obese patients with metabolic syndrome, and especially with T2D. After bariatric surgery, SAF does not significantly decrease despite the weight loss and metabolic improvement.

Conclusions: The increased SAF, as a measure of the AGEs concentration, is associated with cardiovascular disease, as well as deterioration of renal and pulmonary function. Therefore, its determination can be useful in identifying those subjects, with and without T2D, who are more vulnerable to presenting and/or developing pathology. In contrast, the increased SAF in obesity seems to be associated with the high prevalence of metabolism alterations in this population. Finally, 5 years do not seem sufficient to detect significant changes in SAF, reinforcing the concept of "metabolic memory".

Introducción: Los productos finales de glicación avanzada (AGEs) caracterizan un grupo heterogéneo de compuestos que de forma fisiológica se acumulan con la edad en nuestro organismo. Sin embargo, en algunas circunstancias, se produce una acumulación acelerada de AGEs que a través de una gran variedad de mecanismos causan un daño sistémico. Hasta ahora, el papel que juegan los AGEs en patologías como la enfermedad cardiovascular, la enfermedad renal crónica (ERC), la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la obesidad mórbida aún se desconoce.

Material y métodos: Se han realizado cuatro estudios; **(1) AGEs y enfermedad ateromatosa subclínica:** estudio observacional y transversal con 2.568 sujetos atendidos en el Bus de la Salud alrededor de toda la provincia de Lleida. Se realizó un estudio ecográfico vascular para evaluar la carga ateromatosa, definida por el número de territorios afectados, la ubicación (carotídea y/o femoral) y el área de las placas; **(2) AGEs y ERC:** estudio caso-control que analiza los datos de la ecografía vascular realizada a 87 pacientes con ERC de leve a moderada, y a 87 sujetos sanos equiparados por edad, sexo e IMC; **(3) AGEs, DM2 y función pulmonar:** estudio transversal que valora la función pulmonar de 1.909 sujetos del proyecto ILERVAS en función de la presencia de alteraciones hidrocarbonadas: 79 DM2, 660 con prediabetes y 1.170 controles; **(4) AGEs y obesidad mórbida:** estudio de tres cohortes equiparadas por edad y sexo: 52 pacientes con obesidad mórbida, 46 pacientes sometidos a cirugía bariátrica en los últimos 5 años, y 46 sujetos no obesos. En todos los estudios se midió la concentración de AGEs mediante el estudio de la autofluorescencia de la piel (SAF).

Resultados: Respectivamente, **(1)** Los pacientes con placas de ateroma tienen una SAF superior a aquellos que no tienen placa, al tiempo que la SAF se correlaciona con el número de territorios afectados, su ubicación y el área de las placas; **(2)** Los pacientes con estadios de leve a moderado de ERC muestran un aumento de la SAF en comparación con los sujetos sin ERC, con una correlación inversa entre la SAF y el filtrado glomerular; **(3)** La SAF se correlaciona de forma negativa con la función pulmonar, especialmente en los pacientes con DM2; **(4)** Los sujetos con obesidad mórbida tienen una mayor SAF en comparación con la población no obesa, lo que parece ser a costa de aquellos pacientes obesos con síndrome metabólico, y especialmente con DM2. Después de la cirugía bariátrica la SAF no disminuye de forma significativa, a pesar de la pérdida ponderal y mejora metabólica.

Conclusiones: El aumento de la SAF, como medida de la concentración de AGEs, se asocia con la enfermedad cardiovascular, así como con el deterioro de la función renal y pulmonar. Por lo tanto, su determinación puede ser útil para identificar aquellos sujetos, con y sin DM2, más vulnerables de presentar y/o desarrollar enfermedad. Por el contrario, el aumento de la SAF en la obesidad está condicionada por la alta prevalencia de alteraciones metabólicas que presenta esta población. Por último, 5 años no parecen suficientes para detectar cambios significantes en la SAF, reforzando el concepto de "memoria metabólica".

Abreviatures

AGEs	Productes finals de glicació avançada (Advanced glycation end-products)
ALI	Arginine-lysine imidazole
AU	Unitats arbitràries (Arbitrary units)
bFGF	Factor de creixement de fibroblasts bàsic
BPGYR	Bypass gàstric en Y-de-Roux
CB	Cirurgia bariàtrica
CEL	Ne-carboxetil-lisina
CML	3,4-Ne-carboximetil-lisina
CVF	Capacitat vital forçada
DM2	Diabetis mellitus tipus 2
ELISA	Assaig per immunoabsorció lligat a enzims (Enzyme-linked immunosorbent assay)
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HTA	Hipertensió arterial
HUAV	Hospital Universitari Arnau de Vilanova
ICAM-1	Molècula d'adhesió intercel·lular 1
IDL	Imidazolium dilysine
IMC	Índex de massa corporal
IRBLleida	Institut de Recerca Biomèdica de Lleida
ITB	Índex turmell-braç
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoproteïnes de baixa densitat
MCP-1	Proteïna quimioattractant de monòcits-1
MCV	Malalties cardiovasculars
MRC	Malaltia renal crònica
NF-kB	Factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades
OMS	Organització Mundial de la Salut
RAGE	Receptor cel·lular d'AGEs
SAF	Autofluorescència de la pell (Skin autofluorescence)
SCORE	Systematic coronary risk evaluation
SGLT-2	Cotransportador de sodi-glucosa tipus 2
sRAGE	Receptor soluble dels AGEs
UDETMA	Unitat de detecció i tractament de malalties aterotrombòtiques
VCAM-1	Molècula d'adhesió cel·lular vascular-1
VEMS	Volum espiratori màxim en el primer segon

Introducció i marc teòric

1. Característiques generals dels productes finals de glicació avançada

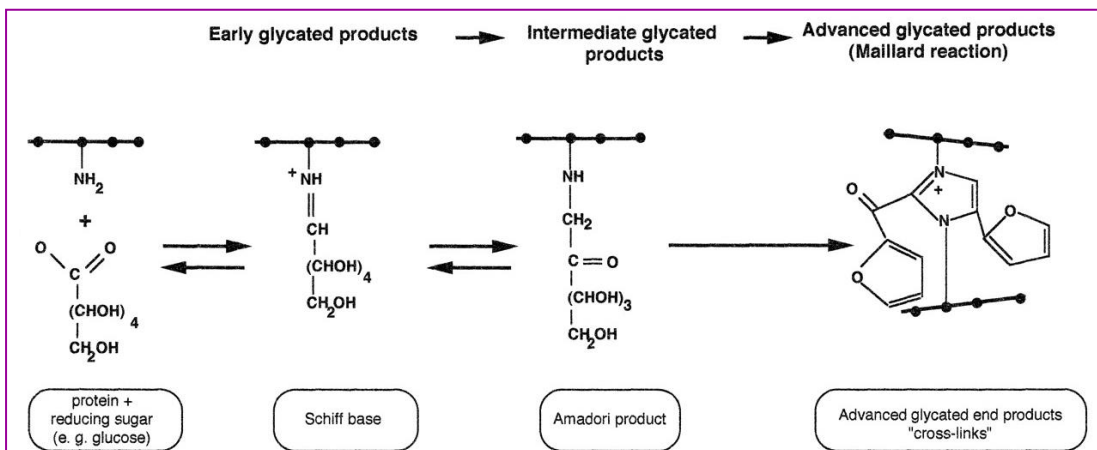
1.1. Definició

El terme productes finals de glicació avançada (AGEs, de l'anglès *Advanced Glycation End-products*) s'utilitza per una àmplia gamma de productes avançats de glicació no enzimàtica que es formen a partir de la reacció de Maillard ¹. Aquesta reacció es coneix en el camp de la nutrició des de l'any 1912. En ella, especialment els aminoàcids lisina i valina, reaccionen amb sucres que es caracteritzen per tenir grups reductors. Aquesta unió de sucres a proteïnes, sense la participació d'enzims catalitzadors, rep el nom de glicació. Després de la reacció inicial, es produeix una cascada de reaccions químiques que finalment dóna lloc als AGEs. Per tant, els AGEs són una extensa família de proteïnes modificades, formades per reaccions seqüencials de glicació, a la que finalment es sumaran processos d'oxidació. Macroscòpicament, són les reaccions responsables del enfosquiment de certs aliments amb gran contingut proteic i de carbohidrats quan són escalfats a altes temperatures. A nivell microscòpic, els AGEs es caracteritzen pel seu color groc-marró fluorescent i la capacitat per formar entrecreuaments amb les proteïnes de l'organisme ².

1.2. Reacció de Maillard

La glicació no enzimàtica és la fase més ben caracteritzada de la reacció de Maillard ³⁻⁶ (**Figura 1**). Durant aquesta primera etapa es produeix la unió covalent entre un grup amino lliure en posició n-terminal d'un aminoàcid, pèptid o proteïna, i un grup carbonil que procedeix normalment d'un sucre reductor (per exemple la glucosa, fructosa i d'altres monosacàrids), encara que també pot procedir de la degradació de l'àcid ascòrbic o de productes formats durant l'oxidació lipídica.

Figura 1. Esquema de la formació dels AGEs en la reacció de Maillard. Imatge extreta de Bierhaus A, et al ⁶.

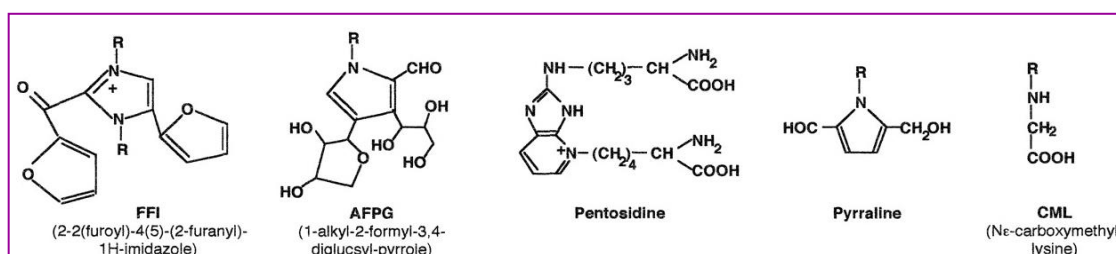


En el cas que provinguin de l'oxidació lipídica, els compostos formats s'anomenen productes finals de lipoxidació avançada (ALEs, de l'anglès *Advanced Lipoxidation End-products*). Al inici de la glicació, i degut a la no participació d'enzims, s'origina una aldimina inestable; posteriorment aquesta pateix un lent i espontani reordenament intern, obtenint-se una cetoamina amb unió covalent inestable⁴. El producte de condensació format perdrà una molècula d'aigua per generar un adducte anomenat "base de Schiff". Per ciclació, aquest compost es transforma a glicosilamina n-substituída, la qual és molt inestable i experimenta un reordenament denominat "reordenament d'Amadori"⁵.

Els productes d'Amadori són proporcionals a la concentració de glucosa plasmàtica de varies setmanes, de forma que aquest càlcul és molt utilitzat en la pràctica clínica i es correspon amb la determinació de l'hemoglobina glicosilada (HbA1c)⁶. En aquestes etapes inicials de la glicació no enzimàtica, les reaccions poden durar varies setmanes i ser reversibles. De fet, les proteïnes, en aquestes etapes, no pateixen importants alteracions estructurals ni existeix producció de color.

Després de la fase inicial, es produeix una cascada de reaccions químiques on es produeix la fragmentació de sucres i la degradació d'aminoàcids. En aquestes etapes, les reaccions de degradació, ara ja irreversibles, condueixen a la formació d'una gran quantitat de compostos intermedis pobrament caracteritzats. Molts d'aquests compostos donen un aroma i sabor característic als aliments. Els compostos dicarbonils poden reaccionar amb els grups amino lliures, tant amb els residus de lisina o arginina de les proteïnes com amb els compostos intermediaris d'Amadori. Aquestes reaccions, sota un entorn oxidatiu, donen lloc a la formació d'AGEs, dels quals s'han descrit més d'una vintena, com ara el 3,4-Ne-carboximetil-lisina (CML), la pentosidina i d'altres que es poden observar en la **Figura 2**⁷⁻⁹. L'oxidació que acompanya a la glicació és una reacció permanent, irreversible i lenta, de manera que només les proteïnes de vida llarga poden patir aquestes reaccions. En aquesta etapa final, les proteïnes pateixen canvis en la seva estructura i funcionalitat, amb el fet característic de canvi de color.

Figura 2. Estructura d'alguns dels compostos estructuralment diferents que resulten de la glicació avançada. Imatge extreta de Bierhaus A, et al⁶.



1.3. Classificació dels AGEs

Els AGEs es poden dividir en tres categories ¹⁰ :

- 1.- AGEs entrecreuats amb altres proteïnes fluorescents com ara la pentosidina, la vesperlisina, el glioxal (GOLD), el metilglioxal (MOLD), la argpirimidina i, finalment, el glucosepan.
- 2.- AGEs entrecreuats amb altres proteïnes no fluorescents, com ara l'elimidazolona (IDL), el 1-alquil-2-formil-3,4-glicosilpirrol (AFGP) i l'arginina-lisina-imidazol (ALI).
- 3.- AGEs no entrecreuats, com la pirralina, el CML, el Ne-carboxetil-lisina (CEL) i la fructosilisina (FL).

1.4. AGEs en condicions de salut

La glicació no enzimàtica afecta tant a proteïnes circulants com estructurals, provocant una acumulació paral·lela d'AGEs que es dona en tots els individus per un procés fisiològic normal d'envelliment. Tot i això, hi ha factors que influeixen en la quantitat absoluta i en el percentatge de la glicació no enzimàtica. Entre aquests, val la pena destacar els següents:

- a. La vida mitja de la proteïna circulant o tissular,
- b. El percentatge de carbohidrats de la proteïna,
- c. El nombre d'aminoàcids lliures que pot oferir cada proteïna,
- d. L'accessibilitat i punt isoelèctric dels grups amino en l'estructura proteica,
- e. La permeabilitat del teixit a glucosa i presència d'hiperglucèmia,
- f. El grau d'estrès oxidatiu, i
- g. El contingut d'AGEs en la dieta, el cafè i l'hàbit tabàquic.

1.5. Receptors d'AGEs

El receptor d'AGEs és una proteïna transmembrana d'entre 47 i 55 Kilodalton de la superfamília de les immunoglobulines. Hi ha tres classes de receptors:

(i) **Receptor cel·lular d'AGEs (RAGE)**: format per tres dominis: un domini extracel·lular d'unió a lligands, un domini situat a la membrana hidròfoba, i un domini citoplasmàtic que és essencial per a la senyalització intracel·lular (**Figura 3**). El RAGE s'expressa en molts tipus de cèl·lules, incloent cèl·lules endotelials, limfòcits, monòcits, i cèl·lules musculars llises vasculares. L'expressió de RAGE és generalment baixa en la majoria de teixits adults sans, però els seus nivells estan elevats en presència d'estrès cel·lular i en condicions patològiques com ara la diabetis, la malaltia cardiovascular

(MCV), la malaltia d'Alzheimer i el càncer ¹⁰⁻¹⁵. La unió entre els AGEs i el RAGE activa el factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades (NF-kB), augmenta l'expressió de gens, allibera citoquines inflamatòries i augmenta la producció d'espècies reactives d'oxigen ¹⁶⁻²². Aquesta generació d'espècies reactives d'oxigen potencia encara més la formació i acumulació d'AGEs i la posterior sobreexpressió del RAGE, provocant un cercle viciós que proporcionaria així una base fisiopatològica per entendre el fenomen de la "memòria metabòlica" ²³.

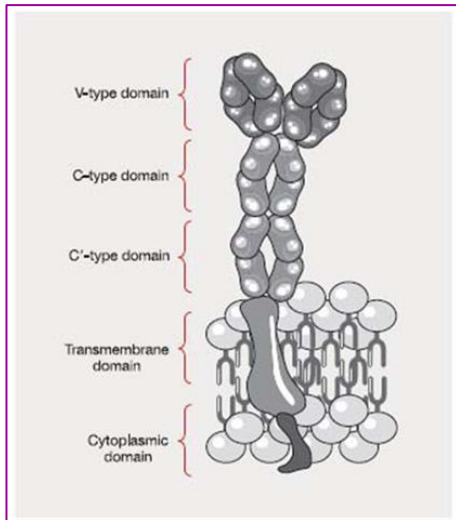


Figura 3. Dominis del receptor cel·lular d'AGEs (RAGE)

(ii) Receptor soluble del AGE (sRAGE): Aquest receptor es correspon amb el domini extracel·lular del RAGE, escindit proteolíticament ^{24, 25}. sRAGE té dues isoformes, cRAGE i esRAGE; aquest últim es produeix a partir de RNA de missatger formant aproximadament del 20 al 30% del total de sRAGE. La unió del sRAGE als AGEs circulants pot regular la seva activitat, al evitar el desencadenament d'esdeveniments intracel·lulars adversos ²⁶. Així, el tractament de ratolins diabètics amb sRAGE atenua la progressió de l'aterosclerosi i de la insuficiència renal ^{27, 28}. De forma similar, en pacients amb DM2, els nivells circulants dels sRAGE són significativament inferiors respecte a població control, i s'han associat amb la rigidesa arterial, però no amb l'edat ²⁹. Finalment, i degut a que sRAGE es secreta en paral·lel amb RAGE, fa que sRAGE es pugui utilitzar com un valuós biomarcador ^{30, 31}.

(iii) Receptors que intervenen en l'endocitosis i la degradació d'AGEs circulants: Aquests receptors s'anomenen de forma diferencial i es poden distingir els següents: AGEs receptor 1 (AGER1), AGEs receptor 2 (AGER2), AGEs receptor 3 (AGER3), el grup de diferenciació 36 (CD36) i els receptors scavenger macròfag I i II. Val la pena destacar que el AGER1 té propietats antioxidants i antiinflamatòries que s'associen amb la supressió de l'expressió de RAGE, del NF-kB, del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR), de vies d'estrès com les proteïnes cinasa activades per mitògens (MAPK) i de la proteïna adaptadora homòloga del col·lagen (p66shc). En estat de salut, l'expressió de AGER1 és baixa, es correlaciona amb els nivells circulants d'AGEs, i la ràtio entre RAGE/AGER1 és alta ³². No obstant això, en l'envelliment, la diabetis i

l'estrès oxidatiu, aquesta ràtio disminueix. Per una altra banda, el receptor AGER3 intervé en l'endocitosi d'AGEs i del colesterol-LDL oxidat circulant ³³.

1.6. Eliminació d'AGEs

L'eliminació d'AGEs es duu a terme mitjançant la proteòlisi intracel·lular o per cèl·lules *scavenger* com els macròfags, que endociten els AGEs a través de receptors específics anteriorment esmentats ³⁴⁻³⁹ (**Figura 4**). La proteòlisi d'AGEs produeix els anomenats adductes-AGEs lliures (adductes d'AGEs units a una o dos proteïnes) i pèptids-AGEs. Els adductes-AGEs lliures passen a la circulació sanguínia i són eliminats via renal, ja que tenen un baix pes molecular (<400 Dalton) i es poden filtrar lliurement pel glomèrul. D'altra banda, els pèptids-AGEs s'endociten en el túbul proximal del ronyó i són degradats a adductes-AGEs lliures, tot i que molts pèptids-AGEs tornen a la circulació ^{40, 41}. Aquests pèptids-AGEs s'uneixen a altres proteïnes constituint una segona generació d'AGEs, més reactius i agressius que els AGEs dels quals deriven ⁴². El resultat final de tot aquest procés és que tan sols s'excreta un terç dels AGEs totals per via renal, provocant l'acumulació de la resta ^{43, 44}.

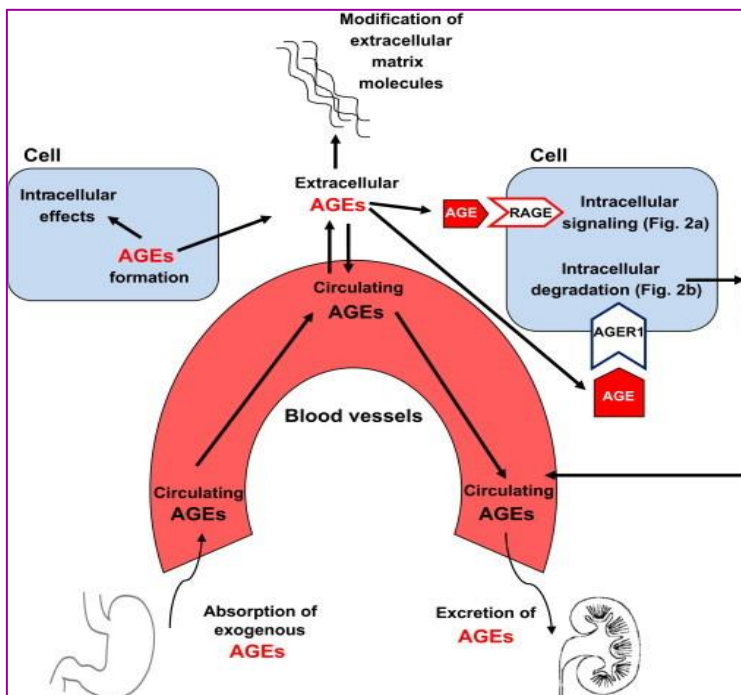


Figura 4. Sistema d'eliminació d'AGEs

2. Potencial impacte per la salut de l'acumulació d'AGEs

2.1. AGEs en condicions patològiques

Un cop formats els AGEs a l'organisme, aquests solen caracteritzar-se per: **(i)** una pigmentació marró i la capacitat d'emetre fluorescència; **(ii)** la capacitat de formar entrecreuaments entre les proteïnes alterant les seves funcions biològiques i estructurals,

a més d'incrementar la seva vida mitja, i **(iii)** la capacitat de produir radicals lliures d'oxigen. És a dir, totes aquestes característiques que pateixen les proteïnes degut a la glicació, no només fan canviar les seves propietats fisicoquímiques sinó també provoquen una gran quantitat de canvis fisiopatològics a nivell cel·lular amb potencial efecte sobre patologies com l'aterosclerosi i la DM2. A la **Taula 1** es fa un recull dels principals efectes adversos relacionats amb l'acúmulo d'AGEs.

Taula 1. Efectes adversos dels AGEs. Taula adaptada de Bierhaus A, et al. ⁶

Inducció de canvis en la senyalització cel·lular, l'activació de factors de transcripció i la posterior expressió gènica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ⁶
Augment de la taxa de mutació de l'ADN ⁴⁵
Estabilització del col·lagen, conferint-li una alta resistència a la col·lagenasa ^{46, 47}
Inducció d'estrès oxidatiu intracel·lular i activació del factor de transcripció NF-kB ⁴⁸
Reducció dels mecanismes de defensa antioxidants intracel·lulars (per exemple, glutatió o vitamina C) ⁴⁹
Augment de la formació de la matriu vascular i reducció de la llum vascular ⁵⁰
Peroxidació lipídica ^{51, 52}
Augment de la captació de macròfags per la unió d'AGEs i colesterol-LDL, i la possible formació de placa d'ateroma ^{53, 54}
Hipertròfia glomerular i glomeruloesclerosi ⁵⁵
Dipòsit i engruiximent a la membrana basal glomerular ⁵⁶
Pèrdua de l'activitat mitogènica de les cèl·lules endotelials i canvis en el factor de creixement de fibroblasts bàsic (bFGF) ⁵⁷
Inducció de citoquines i factors de creixement [per exemple, la interleucina 1 (IL-1 α), el factor de necrosi tumoral (TNF), el factor de creixement insulínic tipus 1 (IGF-I) i el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF)] per monòcits/macròfags, afavorint la proliferació cel·lular vascular ⁵⁸⁻⁶⁰
Estimulació de les cèl·lules T i inducció de la síntesi de interferó- γ ⁶¹
Augment de l'activitat procoagulant ^{62, 63}
Deteriorament de l'activitat anticoagulant (per exemple, l'expressió de trombomodulina) ^{62, 64, 65}
Augment de la permeabilitat endotelial ^{62, 64, 65}
Inducció de RAGE ^{62, 64, 65}
Iniciació de la proliferació de cèl·lules del múscul llis ⁶⁶
Desencadenament de la proliferació de fibroblasts ⁶⁷
Inducció de la síntesi de factor de creixement endotelial vascular ^{47, 68}
Augment de molècules d'adhesió com la molècula d'adhesió cel·lular vascular 1 (VCAM-1) ^{69, 70}
Augment de la secreció de la matriu mesangial ^{71, 72}
Deteriorament de proteoglicans heparán-sulfat units a la matriu ⁷³
Disminució dels efectes vasodilatadors del òxid nítric ⁷⁴
Unió dels eritròcits amb cèl·lules endotelials ⁷⁵
Inducció de la proteïna quimioatracent de monòcits 1 (MCP-1) en les cèl·lules del múscul llis ⁷⁶
Potenciament de la quimiotaxis de cèl·lules mononuclears, l'activació i la migració transendotelial ^{76, 77}
Augment de la vasoconstricció per la inducció de l'endotelina-1 ⁷⁸
Activació del complement ⁶⁷

2.2. Glicació del col·lagen i l'elastina

Tal i com s'ha dit anteriorment, els AGEs es formen a partir de la glicació no enzimàtica entre sucres i proteïnes. Però no tots els sucres i proteïnes poden donar lloc a AGEs. De tots els sucres naturals, la glucosa és la molècula que té la taxa més lenta de glicació en comparació amb els altres sucres gràcies a l'estabilitat proporcionada per la seva estructura en forma d'anell que limita la glicosilació ⁷⁹. Per la seva banda, si ens fixem en les proteïnes, només aquelles amb un lent *turnover* poden donar lloc a la

formació d'AGEs. És per aquest motiu que les proteïnes de vida més llarga són diana per l'acumulació d'AGEs, especialment el col·lagen i l'elastina.

El col·lagen és la proteïna més abundant de l'organisme i representa aproximadament un 30% de la proteïna total del cos. És la principal proteïna constituent dels teixits conjuntius, com la pell, tendons, artèries i ossos. Està constituït per un conjunt de tres cadenes polipeptídiques (1.000 aminoàcids per cadena), agrupades en una estructura helicoidal (**Figura 5**). L'etimologia del seu nom (del grec; *colla*, cola, i *geno*, dona vida) expressa de forma immillorable la funció d'aquesta proteïna essencial dels teixits conjuntius; que “enganxa”. Present en tot el cos humà, té una funció que es pot comparar a la d'una armadura que garanteix la cohesió i la resistència de les cèl·lules i teixits. Amb el temps la seva formació s'alenteix incrementant la seva rigidesa i duresa. Aquest fet afavoreix la degeneració articular, l'augment de la flacidesa cutània i la rigidesa de la paret arterial. Finalment, s'ha observat una correlació positiva entre l'edat i la presència d'AGEs en teixits rics en col·lagen ^{56, 80, 81}.

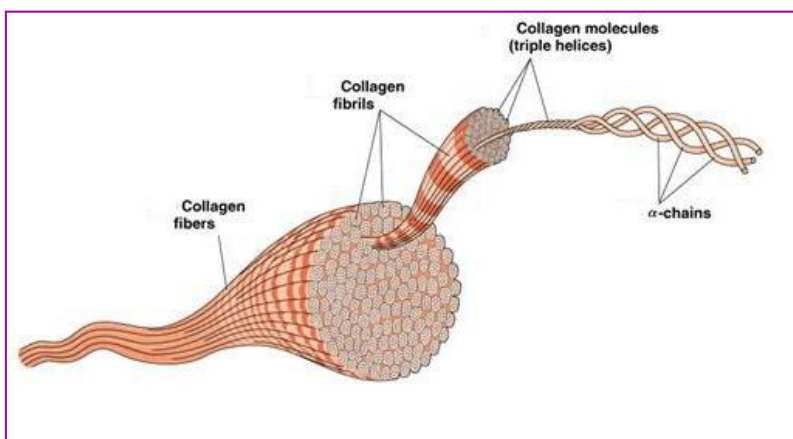


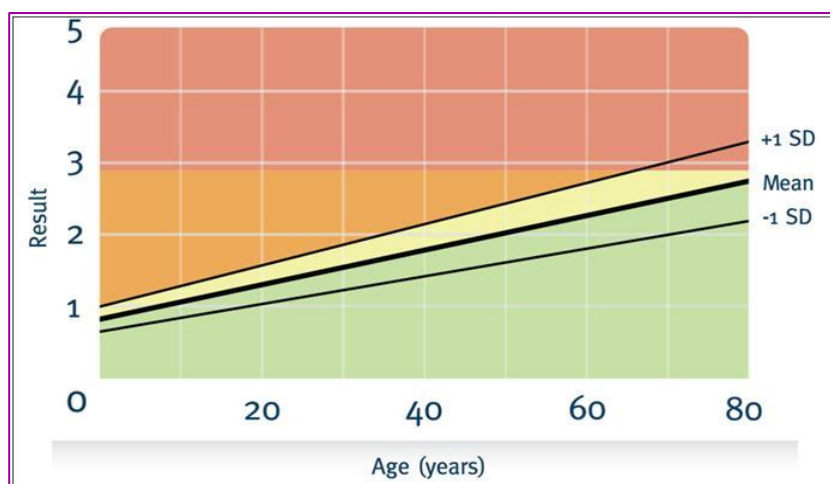
Figura 5. Figura esquematitzada de la fibra de col·lagen

Una altre proteïna de vida mitja llarga que és diana de l'acumulació d'AGEs, és l'elastina, proteïna important de la matriu extracel·lular i amb funcions estructurals. Però a diferència del col·lagen, que proporciona principalment resistència, l'elastina confereix elasticitat als teixits. L'elastina posseeix una llarga cadena d'aminoàcids amb nombroses seqüències d'aminoàcids hidròfobs, separats per altres seqüències que contenen parells de glicines i altres aminoàcids petits com la lisina. Aquesta composició d'aminoàcids és la que l'hi confereix les propietats elàstiques, ja que els aminoàcids hidròfobs permeten la disposició en estructures planes, i la lisina la formació de α-hèlixs. Present en tots els teixits connectius, l'elastina dona elasticitat essencial per als teixits sotmesos a cicles d'extensió-relaxament com la pell, les artèries, els lligaments i els pulmons ^{82, 83}. L'elastina es localitza especialment a la dermis, de la que conforma un 3% de la seva composició. També pren molta rellevància a les artèries on, per exemple, constitueix el 30% del pes en sec de la aorta ⁸⁴. Així doncs, la formació d'AGEs al llarg de l'estructura de l'elastina farà perdre les seves propietats biològiques i estructurals als diferents teixits en que es trobi.

2.3. AGEs, envelliment i edat biològica

El dogma central de la teoria del envelliment radica en que durant el metabolisme aerobi es produeixen, de forma accidental i incontrolada, espècies reactives d'oxigen que promouen reaccions que danyen macromolècules⁸⁵⁻⁸⁷. Aquest dany irreversible s'acumula amb el temps, produint una pèrdua gradual de la capacitat funcional de la cèl·lula. L'inqüestionable avantatge evolutiu que suposa des del punt de vista energètic la utilització de l'oxigen com últim acceptor d'electrons, es contraposa a la formació d'espècies reactives d'oxigen que són tòxiques, fet que rep el nom de la “paradoxa de l'oxigen”. Per aquest motiu, l'organisme desenvolupa mecanismes de defensa per contrarestar l'acció de les espècies reactives d'oxigen. Quan es produeix un desequilibri entre els mecanismes pro i antioxidants apareix un entorn oxidatiu que és un ambient determinant per la formació d'AGEs⁸⁸. El dany oxidatiu causat a les proteïnes es pot mesurar a partir del càlcul de l'acumulació d'AGEs, i es produeix paral·lelament amb l'edat. Així, hi ha un increment lineal en el valor d'AGEs d'aproximadament 0,023 unitats arbitràries (AU) per cada any d'edat^{89,90} (**Figura 6**).

Figura 6. Acumulació mitja d'AGEs en l'envelliment.



Tal com s'ha comentat anteriorment, el procés d'acumulació d'AGEs s'accelera en condicions d'estat inflamatori i/o d'estrès oxidatiu, consum de tabac i cafè, també en la malaltia renal crònica (MRC) i en la DM2⁹¹. Per tant, aquests factors que condueixen a una major acumulació d'AGEs, augmentarien també la velocitat d'envelliment. De fet, amb el càlcul d'AGEs es pot arribar a obtenir una edat biològica diferent a l'edat cronològica. Per tots aquests motius, ha sorgit un nou concepte que correlaciona l'envelliment (*ageing* en anglès) i els AGEs, anomenat AGE'ing. Pocs estudis s'han aventurat a quantificar quin és aquest envelliment afegit a l'edat cronològica.

2.4. Quantificació d'AGEs en teixit subcutani

El *Gold Standard* per la quantificació d'AGEs és l'estudi de biòpsies del teixit analitzat. En aquestes mostres, després de la digestió amb pepsina en àcid acètic durant 24 hores, s'analitza la fluorescència del col·lagen amb una longitud d'ona d'excitació a 370 nm, i d'emissió a 440 nm. D'altra banda, la pentosidina, CML i CEL es separen per cromatografia de gasos i espectrometria de masses utilitzant una post-columna de fluorescència (excitació a 328 nm, emissió a 378 nm). Tant CML, CEL com pentosidina s'han de normalitzar al contingut d'hidroxiprolina del col·lagen, tal i com descriuen Dyer et al.⁹². Aquesta tècnica, tot i ser la més precisa, necessita una mostra de teixit, gran quantitat d'hores, de personal especialitzat, i de grans aparells.

També es pot quantificar AGEs/sRAGE en mostres de sèrum utilitzant l'*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Aquesta és una tècnica d'immunoassaig en la qual un antigen immobilitzat es detecta mitjançant un anticòs enllaçat a un enzim capaç de generar un producte detectable, com per exemple el canvi de color. No obstant això, aquest mètode pren 24-48 hores en completar-lo, i és tècnicament complex. A més, la concentració d'AGEs/sRAGE pot ser variable en el temps, ja que depen de paràmetres modificables com la glucèmia, el tabaquisme, la dieta i el filtrat glomerular. En canvi, altres mètodes per quantificar els AGEs, com el que s'explica a continuació, són més senzills, ràpids i donen una informació a més llarg termini.

2.5. Lector d'AGEs a nivell subcutani

La possibilitat d'estudiar la concentració d'AGEs mitjançant l'autofluorescència cutània (SAF, de l'anglès *skin autofluorescence*), ha permès superar la dificultat inicial de la seva determinació per cromatografia de gasos i espectrometria de masses a partir de biòpsies cutànies facilitant així l'estudi a grans poblacions⁹³. Aquest fet ha estat possible gràcies a aparells com el AGE Reader™ (DiagnOptics, Groningen, The Netherlands) (**Figura 7**). Aquest és un dispositiu de sobretaula, no invasiu i automatitzat, que mesura la concentració d'AGEs a la pell del avantbraç dominant utilitzant un espectre de llum ultraviolada-A en menys d'un minut.



Figura 7. Lector d'AGEs subcutani (AGE Reader) realitzant una mesura del dipòsit d'AGEs al avantbraç d'un pacient.

El lector d'AGEs utilitza les propietats fluorescents característiques de certs AGEs per quantificar la seva acumulació. En resum, el lector il·lumina una superfície de 4 cm² de la pell del avantbraç amb una font de llum d'excitació màxima de 370 nm. L'emissió de llum (fluorescència en la longitud d'ona de 420 a 600 nm) i la llum d'excitació reflectida (amb una longitud d'ona de 300 a 420 nm) de la pell es mesura amb un espectròmetre. El quocient entre la llum d'emissió i la llum d'excitació reflectida, multiplicat per 100, dona lloc a la SAF i s'expressa en AU ⁹³. En estudis de validació, utilitzant biòpsies de pell del avantbraç, hi ha una forta correlació entre la SAF i el contingut cutani d'AGEs ⁹³⁻⁹⁶. Meerwaldt et al. van mostrar un percentatge intra- individual d'error de 5,03% amb les mesures preses mitjançant la SAF el mateix dia, i un percentatge d'error de 5,87% degut a la variació estacional ⁹⁶. Resultats similars van ser reportats per McIntyre et al. en pacients amb MRC ⁹⁷. Finalment, una anàlisi combinada d'estudis va mostrar que el 76% de la variància de la SAF pot explicar-se pels nivells de pentosidina ⁹⁸. És a dir, la pentosidina és l'AGE més important en el càlcul de la SAF.

El lector d'AGEs subcutanis presenta algunes limitacions, degut a que el mesurament de la SAF només permet l'avaluació d'individus amb un to de pell clar, ja que la variació en la reflectància de la pell dels subjectes de pell més fosca invalida la seva lectura. La classificació del color de la pell oscil·la entre I y VI segons l'escala de Fitzpatrick (**Figura 8**). En els treballs que hem dut a terme i que es descriuen més endavant, els subjectes amb un tipus de pell superior o igual a V van ser exclosos.

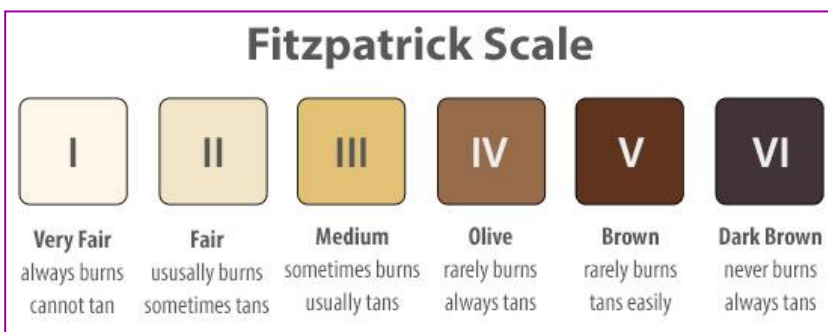


Figura 8. Escala de pigmentació cutània de Fitzpatrick.

3. AGEs en diverses situacions patològiques

3.1. AGEs i malaltia ateromatosa: més enllà de les taules de risc cardiovascular

Aterogènesi és un concepte que uneix patogènesi i arteriosclerosi. Aquesta última es defineix segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS) com una associació d'alteracions de l'íntima, amb acumulació focal de lípids, glúcids, sang, productes hemàtics, teixit fibrós i dipòsits càlcics, donant com a resultat final una alteració de la capa mitja de les artèries. L'arteriosclerosi és la principal causa d'un grup de patologies

conegudes com a MCV. Tot i la tendència decreixent mostrada en les tres últimes dècades en els països desenvolupats, les MCV són encara la principal causa de mortalitat a la població espanyola, i responsables d'un 35% de les defuncions^{99, 100}. Les MCV tenen un origen multifactorial, on destaquen per la seva importància els factors de risc no modificables com l'edat, el sexe, la raça, i la base genètica. I d'altres de modificables, com el tabaquisme, l'alcohol, el sedentarisme, la hipertensió arterial, la freqüència cardíaca, la dislipidemia, l'obesitat, la DM2, la MRC i determinats condicionants psicosocials. En el temps, la presentació d'un esdeveniment clínic ve precedida per una fase de lesió estructural asimptomàtica. En aquest sentit, és important la detecció precoç dels factors de risc i el càlcul del risc cardiovascular, que permet la intervenció preventiva de forma més efectiva. S'han proposat diversos models per fer l'estimació del risc cardiovascular. El més utilitzat són les taules del *Systematic Coronary Risk Evaluation* (SCORE), que estimen el risc de mort cardiovascular en els propers 10 anys, i que en l'actualitat són les recomanades per les societats Europees i Espanyoles¹⁰²⁻¹⁰⁴ (**Figura 9**). Per la seva elaboració es van utilitzar dades de sis estudis amb grans poblacions d'alt risc cardiovascular.

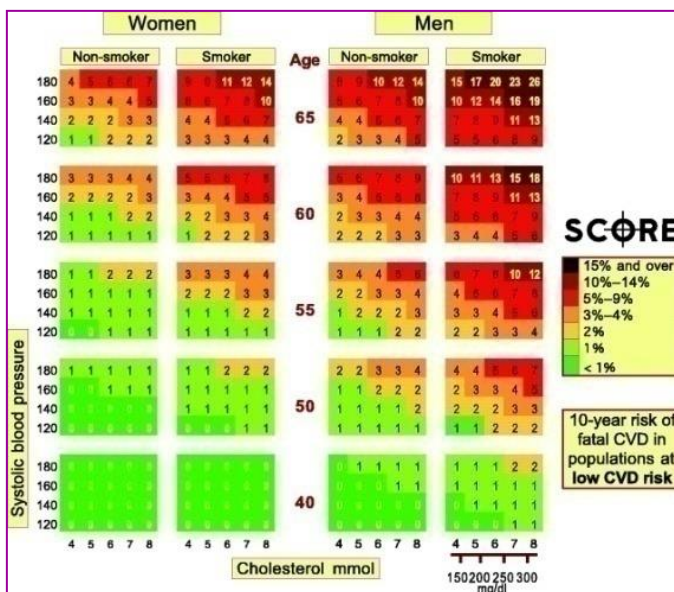


Figura 9. Estimació del risc d'un esdeveniment cardiovascular en els pròxims 10 anys: projecte SCORE.

En resum, l'SCORE estima el risc de un esdeveniment cardiovascular fatal en els pròxims 10 anys en regions d'alt risc d'Europa, en funció de: sexe, edat, pressió arterial sistòlica, colesterol total i consum de tabac. S'ha de destacar que a Catalunya es disposa d'unes taules de risc adaptades a les dades locals d'incidència i distribució dels factors de risc anomenades REGICOR¹⁰⁴. Però tot i la utilitat de les taules, existeix un gens menyspreable risc residual difícil de quantificar.

Un dels indicadors que es proposa en els darrers anys per avaluar el risc cardiovascular ha estat el càlcul dels AGEs. Estudis prospectius han observat que els AGEs tenen una capacitat predictora de mort i de futurs esdeveniments cardíacs en

pacients després d'un primer infart de miocardi ^{105, 106}. De forma similar, els AGEs es relacionen amb la incidència de mort cardiovascular en estudis amb més de 2.000 pacients amb estadis avançats de MRC, sobretot quan els valors són superiors a 3,61 AU ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Tota aquesta recerca es va iniciar fa anys, al evidenciar-se un augment d'AGEs en les lesions arterioscleròtiques provinents de mostres autòpsiques ^{110, 111}. Però amb estudis més recents, s'han identificat els mecanismes pels quals els AGEs es relacionen amb disfunció endotelial, inflamació i perfils lipídics més aterogènics. En particular, s'ha demostrat que els AGEs contribueixen a la disfunció endotelial a través del seu efecte pro-apoptòtic sobre les cèl·lules endotelials i cèl·lules progenitores endotelials ¹¹²⁻¹¹⁵. A més a més, els AGEs estimulen l'expressió de la molècula d'adhesió intercel·lular 1 (ICAM-1), del VCAM-1 i del inhibidor de l'activador del plasminògen-1 (PAI-1) ¹¹⁶⁻¹²¹. Les propietats aterogèniques dels AGEs també es poden atribuir a l'efecte que tenen sobre l'òxid nítric, afavorint la disfunció endotelial ¹²²⁻¹²⁴. S'ha proposat que la glicació del col·lagen contribuiria també a la formació de les plaques d'ateroma, mitjançant la seva progressió i trencament ¹²⁵. Fins i tot existeixen hipòtesis que proposen que la rigidesa arterial podria corregir-se mitjançant l'augment del *turnover* de col·lagen i elastina amb fibroblasts i cèl·lules mesènquimals, o mitjançant l'ús de les cèl·lules progenitores endotelials ^{126, 127}. El resultat final de tots aquests mecanismes són canvis a nivell vascular, com ara l'engrossiment i rigidesa de la paret arterial, la disminució de la llum vascular i l'augment de la seva permeabilitat.

Fins ara es desconeix el paper que pot jugar la determinació de la concentració tissular d'AGEs en relació a la detecció de malaltia ateromatosa subclínica. Aquest ha estat l'objectiu del nostre primer estudi.

3.2. AGEs i Malaltia Renal Crònica

Gran quantitat de literatura ha detallat un descens de la funció i l'aclariment renal de forma paral·lela al increment dels AGEs circulants ¹²⁸⁻¹³². S'ha descrit que els pacients amb MRC en estadis moderats tenen concentracions fins a 5 vegades més altes d'adductes AGE-lliures en plasma. Aquestes augmentes fins a 18 vegades en estadis finals, i fins a 40 en pacients sotmesos a diàlisi peritoneal ¹³³. Així, es pot intuir com la pèrdua progressiva de la funció renal afecta fortament a l'aclariment renal dels AGEs circulants. L'augment dels nivells plasmàtics d'AGEs, al seu temps, pot tenir un efecte deleteri sobre la pròpia funció renal.

El mecanisme fisiopatològic pel qual els AGEs danyen el glomèrul ha estat diana de diversos estudis, tant *in vitro* com *in vivo* ¹³⁴⁻¹³⁸. En ells es descriu com els AGEs produeixen canvis en les cèl·lules mesènquimals que es troben en els vasos renals, i que en condicions normals regulen la filtració glomerular i proporcionen suport estructural al teixit ^{139, 140}. Així, els AGEs poden afavorir l'expressió de VEGF en el glomèrul, contribuint a la hiperfiltració i desenvolupant la proteïnúria. A més, els AGEs també afavoreixen l'expressió de MCP-1 a nivell mesangial, iniciant el procés

inflamatori, i d'altres factors de creixement que potencien la hipertrofia glomerular ¹⁴¹⁻¹⁴⁵. Finalment, l'estrès oxidatiu present en els pacients amb MRC causa també un augment en la formació d'AGEs ¹⁴⁴.

Val a dir que, s'ha descrit que els pacients amb MRC tenen entre 5 i 10 vegades més probabilitat de morir per MCV que de arribar a requerir diàlisi, assolint taxes de mortalitat del 19,5% en estadi 2, del 24,3% en estadi 3, i del 45,7% en estadi 4 ¹⁴⁵. En aquest context, l'augment d'AGEs es correlaciona amb el risc de MCV en estadis finals de la MRC ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Hi ha, però, una manca d'estudis que analitzin el depòsit tissular d'AGEs en les fases inicials de la MRC (G2, G3a i G3b) ¹⁴⁶ (Figura 10). Per aquest motiu, s'ha dut a terme el segon estudi que forma part d'aquesta Tesi.

				Persistent Albuminuria Categories Description and Range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				ACR <30 mg/g	ACR of 30-300 mg/g	ACR >300 mg/g
GFR Categories (mL/min/1.73 m ²) Description and Range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

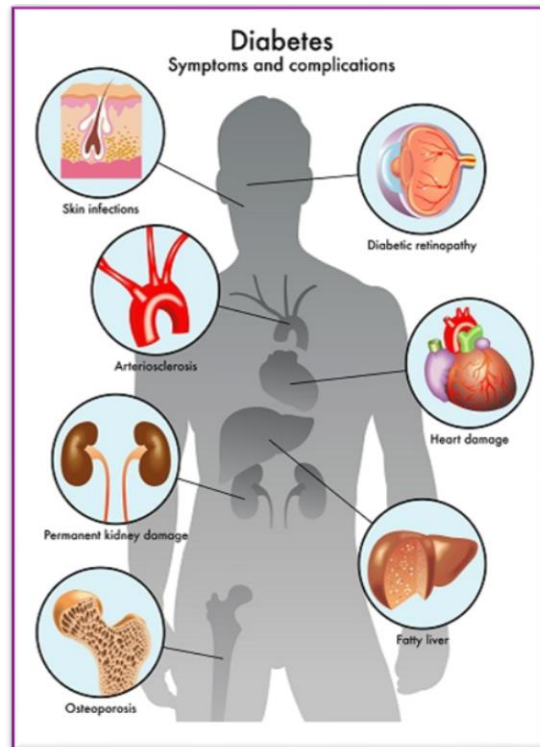
Figura 10. Classificació de la malaltia renal crònica segons la *Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) 2012* ¹⁴⁶.

3.3. AGEs i desenvolupament de complicacions tardanes de la Diabetis Mellitus tipus 2

La DM2 ha adquirit un caràcter endèmic, amb una alta prevalença, que a Espanya s'estima propera al 14% de la població major de 18 anys ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Ja que és una malaltia en la que el 50% dels pacients no saben que la patèixen, progressa asimptomàtica durant molts anys, motiu pel que sovint ja existeixen complicacions tardanes en el moment del diagnòstic ¹⁵⁰ (**Figura 11**). A més, s'estima que la DM2 produeix un cost anual al Sistema Sanitari Espanyol de al voltant d'uns 6.000 milions d'euros, 2.000 dels quals atribuïts a les seves complicacions ¹⁵¹. La característica

principal de la DM2 és, juntament amb la resistència a la insulina, la presència d'hiperglucèmia crònica, sent aquest el factor més determinant en la producció d'AGEs, proporcional al temps i la concentració d'aquesta. Una vegada formats els AGEs, i de forma independent als nivells posteriors de glucosa, promouen el desenvolupament i/o progressió de les complicacions tardanes. Aquest fet justifica la detecció prematura de la malaltia i l'obtenció d'un bon control metabòlic des de fases inicials de la DM2. Diversos estudis han posat de manifest el paper de les reaccions induïdes pels AGEs en la patogènia de les aparicions tardanes de la DM2 ¹⁵²⁻¹⁶⁰. Per exemple, val la pena destacar que els AGEs son reconeguts pel seu paper central en la patogènesi de la retinopatia diabètica, demostrant-se un augment dels seus nivells en el vitri quan la retinopatia està avançada ¹⁶¹⁻¹⁶³. També tenen un paper important en la nefropatia diabètica ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. De fet, s'han reportat nivells sèrics d'adductes-AGEs lliures més alts en subjectes amb estadis finals de MRC i DM2 en comparació a pacients amb MRC sense DM2, donant a lloc a acumulacions de gairebé el doble en el primer grup ^{167, 168}. Curiosament, un estudi *in vitro* ha demostrat que el dany tubular induït pels AGEs sembla estar mediat pel cotransportador de sodi-glucosa tipus 2 (SGLT-2) en les cèl·lules tubulars, afavorint la seva apoptosi ¹⁶⁶.

Figura 11. Complicacions tardanes de la Diabetis Mellitus tipus 2.



Finalment, també s'ha demostrat que els nivells d'AGEs es correlacionen amb arteriosclerosi i malaltia coronària, ajudant a explicar la major morbidimortalitat per MCV dels pacients amb DM2 ¹⁶⁹⁻¹⁷⁴. Per tant, sembla imprescindible un abordatge global del risc cardiovascular en aquests pacients ^{90, 175-180}. En aquest sentit, en els últims anys s'han publicat estudis de MCV en pacients amb DM2 on suggereixen que el càlcul d'AGEs afegeix valor diagnòstic a l'esquema convencional de l'avaluació de risc cardiovascular ¹⁸¹. Servint, fins i tot, d'indicador de predicció de morbidimortalitat en aquests pacients ^{182, 183}.

3.4. El Pulmó com a nou òrgan diana de la DM2

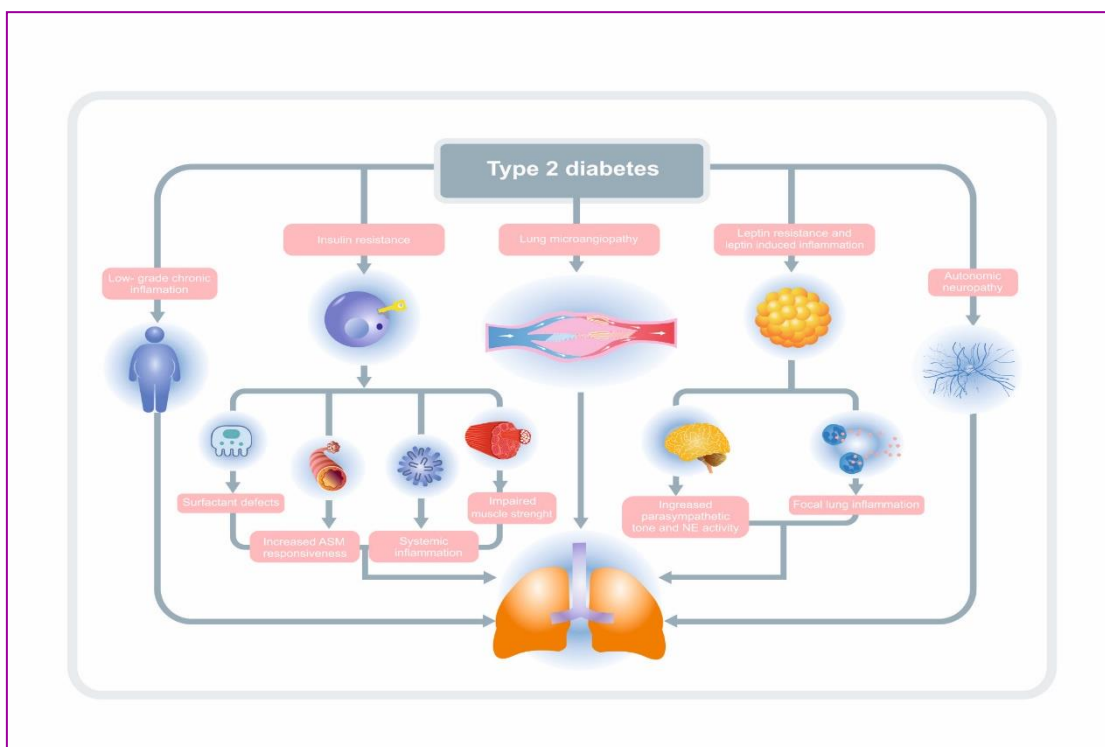
Tot i que el pulmó no acostuma a ser considerat un òrgan diana de les complicacions de la DM2, existeix suficient evidència científica que explica que les mateixes alteracions histològiques i fisiològiques que tenen lloc en les complicacions micro i macroangiopàtiques d'altres localitzacions, també poden ocórrer en aquest

òrgan. De fet, en troballes autòpsiques, es va revelar que els pacients amb DM2 tenen un engruiximent de la làmina basal de l'alvèol, de l'epiteli i dels capil·lars pulmonars, així com una disminució de l'espai alveolar, disfuncions en la secreció de moc, majors graus de fibrosi, emfisema centrolobular i microangiopatia ¹⁸⁴⁻¹⁸⁹. Aquestes diferències histològiques tindrien implicacions clíniques. Així, estudis transversals en diferents poblacions han trobat en els pacients amb DM2 una disminució tant de la capacitat vital forçada (CVF) com del volum espiratori màxim en el primer segon (VEMS) en comparació amb la població general, i que es mou entre el 8 i el 10% respecte al valor teòric ¹⁹⁰⁻¹⁹⁴. També es mostra una associació inversa i gradual entre els valors espiromètrics i les xifres de glucèmia plasmàtica en dejú i les de HbA1c ^{192, 194}. Per la seva banda, estudis longitudinals han mostrat que hi ha un descens més ràpid de la funció pulmonar en els pacients amb DM2 en comparació amb els grups control. En el Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study ¹⁹⁴, després de 3 anys de seguiment, la disminució dels valors espiromètrics en els pacients amb DM2 va excedir significativament a la cohort control. En Fremantle Study ¹⁹¹, després de 7 anys de seguiment, i tot i no disposar d'un grup control, la caiguda de la funció pulmonar va ser el doble del predit en la població general de referència. Un resultat discordant amb els dos anterior ens el proporciona el Copenhagen City Heart Study ¹⁹³, on no s'observen diferències després de 15 anys de seguiment.

Les raons que poden explicar l'associació entre la DM2 i la funció pulmonar no estan encara ben definides. S'han suggerit diversos mecanismes que podrien participar en el desenvolupament del "pulmó diabètic" com: **(i)** la microangiopatia a nivell alveolar ¹⁹⁵; **(ii)** la disminució de la força muscular ^{196, 197}; **(iii)** la presència d'un estat d'inflamació crònica de baix grau ^{198, 199}; **(iv)** la pròpia resistència a la insulina ²⁰⁰; **(v)** els defectes en la producció de surfactant pulmonar ²⁰¹; **(vi)** l'augment del múscul llis en les vies respiratòries, i finalment **(vii)** la desregulació del sistema nerviós simpàtic/parasimpàtic (**Figura 12** ²⁰²).

Un altre factor del que encara hi ha poca evidència seria la pèrdua de les propietats elàstiques del parènquima pulmonar relacionades amb la glicació no enzimàtica de proteïnes tissulars com el col·lagen o l'elastina ^{203, 204}. Donant suport a aquesta hipòtesi, en models animals i humans exposats a la hiperglucèmia crònica, s'ha vist augmentat l'espai entre els alvèols i la làmina basal endotelial. Aquest fet s'ha atribuït al augment de proteïnes glicades de la matriu extracel·lular, sobre tot les fibres de col·lagen tipus I i III, elastina i fibronectina ^{195, 205-208}. Aquesta expansió del interstici donaria lloc a fibrosi i a enduriment del pulmó, que condueix la pèrdua del retrocés elàstic juntament a una reducció en el volum pulmonar ^{209, 210}. Per finalitzar, el dipòsit dels AGEs i la unió amb els RAGE en el parènquima pulmonar, també pot augmentar l'activació d'estrès oxidatiu, la inflamació i l'expressió tissular de citoquines que afavoririen també la fibrosi del teixit pulmonar ²¹¹⁻²¹⁶.

Figura 12. Resum dels diferents mecanismes etiopatogènics pels que la Diabetis Mellitus tipus 2 exerciria el seu efecte negatiu sobre el pulmó. Extreta de Lecube et al.²⁰²



Aprofundir en el paper que poden jugar els AGEs en el deteriorament de la funció pulmonar en la diabetis ha estat l'objectiu del tercer estudi d'aquesta Tesi Doctoral.

3.5. AGEs i Obesitat

L'obesitat és una patologia crònica d'origen multifactorial que es caracteritza per una hipertròfia i/o hiperplàsia de les cèl·lules del teixit adipós, provocant una acumulació excessiva de greix. En població adulta, l'excés de pes es classifica segons l'OMS mitjançant l'índex de massa corporal (IMC) en: sobrepès (25-29,9 kg/m²), obesitat lleu (30-34,9 kg/m²), moderada (35-39,9 kg/m²) i greu o mòrbida (≥ 40 kg/m²)²¹⁷.

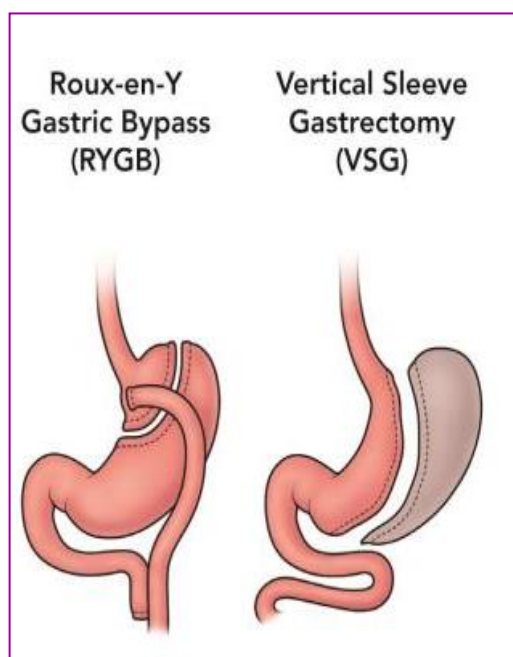
L'obesitat ja ha pres una naturalesa pandèmica i representa una de les amenaces més gran per a la salut del segle XXI. Actualment és la malaltia metabòlica més comú a molts països, afectant a tots els grups socioeconòmics, d'edat, sexes, i ètnies²¹⁸⁻²²⁰. Durant els últims 30 anys s'ha observat un augment significatiu en la taxa d'incidència de sobrepès i obesitat, xifrat per l'OMS en 921 milions al 1980, i en 2,1 bilions al 2013²²¹. Espanya segueix una tendència similar a altres països d'Europa, xifrant l'obesitat en el 22,8% en homes i 20,5% en dones, incrementant aquests percentatges amb l'edat²²². Resultats semblants conclouen altres estudis, fet que ocasiona una important carrega tant a nivell assistencial com econòmic pel Sistema Sanitari²²³. No hi ha dubte que la dieta i l'exercici físic són els pilars fonamentals dels programes de reducció de pes²²⁴,

²²⁵. Però l'adherència i l'èxit de les intervencions d'estil de vida a llarg termini són molt baixes, situant-se entre el 2% i 20% ²²⁶. Per aquests motius, i en front de la manca de finançament del tractament farmacològic, la cirurgia bariàtrica (CB) sorgeix com l'únic mètode eficaç per assolir i mantenir una pèrdua ponderal significativa a llarg termini ²²⁷. La CB és un conjunt de tècniques quirúrgiques que van sorgir als anys 50 com un tractament en aquells casos en què l'abordatge clàssic no era efectiu. La CB va permetre, mitjançant la reducció del volum de l'estómac, associada o no a malabsorció, aconseguir un balanç energètic negatiu que facilités la pèrdua de pes i el seu manteniment a llarg termini. Actualment la CB no només ha demostrat aquesta pèrdua de pes, sinó també una millora de les comorbiditats associades a l'obesitat i en la seva mortalitat.

La CB es classifica segons el seu component restrictiu i/o malabsoritiu (**Figura 13**). De les tècniques restrictives es destaca la gastrectomia vertical, i de les tècniques mixtes el bypass gàstric en Y-de-Roux (BPGYR). Si bé el BPGYR es considera la tècnica de referència, assolint pèrdues del 60-90% del excés de pes, la gastrectomia vertical cada vegada s'utilitza més per la seva teòrica simplicitat i efectivitat ^{228, 229}. Diversos estudis han mostrat una pèrdua ponderal inicial similar al BPGYR, encara que falta avaluar-ne els resultats a llarg termini ²³⁰. L'abordatge laparoscòpic ha de ser el mètode prioritari, i la mortalitat intraoperatòria ha de ser menor al 0,5%. S'ha de destacar que qualsevol tipus de CB altera mecanismes neurofisiològics i neuroendocrins per vies sovint poc conegudes ²³¹.

El concepte de pacients “obesos metabòlicament sans” fa referència a aquells individus que, si bé tenen un IMC >30 kg/m², no tenen resistència a la insulina ni cap altre factor de risc cardiovascular afegit. Aquests subjectes serien capaços d'acumular l'excés de greix a nivell del teixit adipós subcutani, expandint o incrementant aquest segons es necessiti, ben al contrari dels subjectes obesos “metabòlicament malalts” ²³². El greix ectòpic que acumula aquest darrer grup està íntimament relacionat amb els factors de risc cardiovascular, amb la resistència a la insulina i la DM2, la hipertensió, el fetge gras no alcohòlic i les hiperlipidèmies ^{233, 234}.

Figura 13. Representació de les principals tècniques de cirurgia bariàtrica.

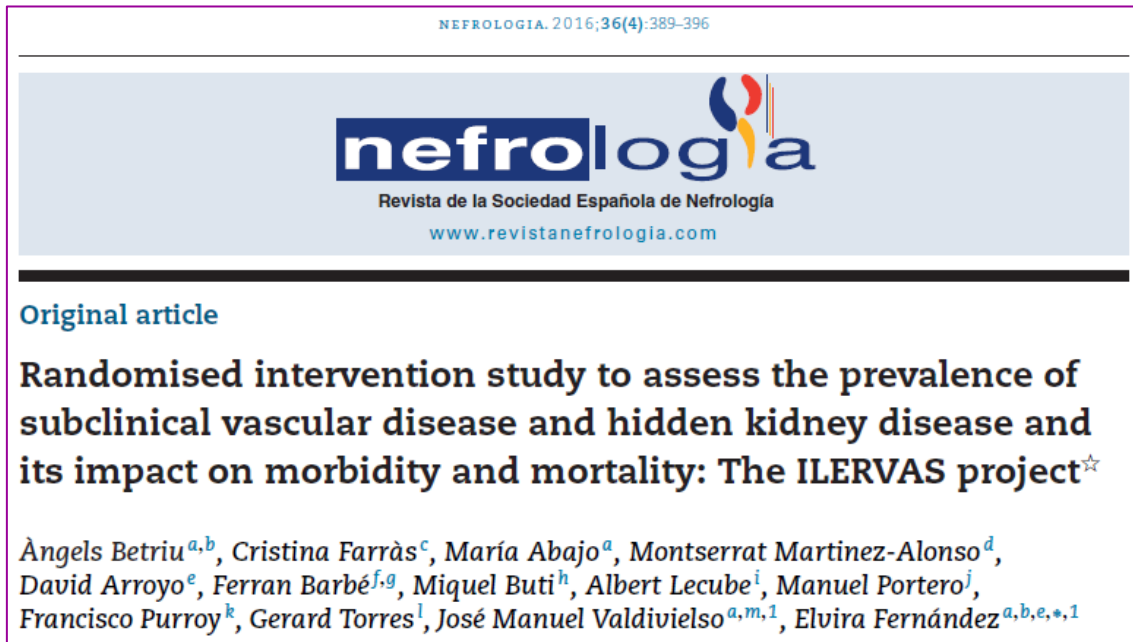


El paper dels AGEs ha estat avaluat principalment en població amb sobrepès o obesitat lleu, trobant-se una correlació entre els AGEs i: (i) el IMC en població general; (ii) el IMC en pacients amb DM2; (iii) el IMC en estadis finals de la MRC, i (iv) la presència d'obesitat abdominal^{90, 235-237}. No obstant això, desconeixem la relació entre els AGEs i l'obesitat mòrbida, així com si la pèrdua ponderal associada a la CB exerceix algun efecte sobre la seva concentració. Amb aquest objectiu, s'ha realitzat el quart i últim treball de recerca que forma part d'aquesta Tesi Doctoral.

4. Projecte ILERVAS: El Bus de la salut

El projecte ILERVAS (ClinTrials.gov: NCT03228459), popularment conegut com el Bus de la Salut, és un projecte de recerca prospectiu i d'intervenció que pretén conèixer la prevalença de malaltia ateromatosa subclínica i de malaltia renal oculta en una mostra de més de 8.000 persones de tota la província de Lleida. Tot i això, l'objectiu més ambiciós és el de comprovar si la detecció precoç de totes dues patologies i el seu abordatge terapèutic exerceix un efecte positiu sobre la incidència de morbimortalitat d'origen cardiovascular²³⁸ (**Figura 14**).

Figura 14. Imatge de la primera pàgina de la publicació on s'explica el disseny i objectius del projecte ILERVAS.



El Bus de la Salut està equipat amb material mèdic i personal sanitari, i recorre de forma sistematitzada, des de gener de 2015, els diferents municipis de la província de Lleida (**Figura 15**).

Figura 15. Imatge del Bus de la Salut circulant per les carreteres de la província de Lleida.



En el seu interior es realitzen ²³⁸: **(i)** proves d'imatge de les arteries caròtides, femorals i transcranials; **(ii)** proves per avaluar l'estat de salut renal; **(iii)** espirometria forçada; **(iv)** analítica de sang venosa i capil·lar; **(v)** la SAF pel càlcul d'AGEs, i **(vi)** administració de qüestionaris dietètics, d'exercici físic i de la son. L'estat de salut dels participants serà avaluat cada 6 mesos durant els següents 10 anys, identificant esdeveniments cardiovasculars, canvis de tractament i d'estil de vida.

La població es selecciona en funció de l'edat (dones entre 50 i 70 anys, homes entre 45 i 65 anys), l'absència de malaltia vascular coneguda, i la presència d'almenys 1 factor de risc (hipertensió arterial, dislipèmia, obesitat, tabaquisme i/o l'antecedent d'un familiar de primer grau amb malaltia cardiovascular precoç).

En ILERVAS és un projecte transversal on col·laboren Assistència Primària, l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida, Grup de Fisiopatologia Metabòlica, Grup de recerca traslacional vascular i renal, i el Biobanc), l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova (els Serveis de Neurologia, Pneumologia, Endocrinologia i Nutrició, i la Unitat de Detecció i Tractament de Malalties Aterotrombòtiques), i l'Hospital de Santa Maria (Servei de Medicina Interna).

Hipòtesis

Els treballs que formen part d'aquesta Tesi Doctoral han estudiat situacions on encara es desconeix amb certesa el paper dels AGEs, i es basen en les següents hipòtesis:

- 1. AGEs i malaltia ateromatosa subclínica.** Ja que els AGEs han estat associats a malaltia cardiovascular en poblacions d'alt risc, en la població sense antecedent de malaltia cardiovascular:
 - 1.1. Els individus amb malaltia ateromatosa subclínica tindran un major acúmulo tissular d'AGEs que els subjectes sense cap lesió ateromatosa, i
 - 1.2. L'acumulació d'AGEs s'associarà amb una major càrrega ateromatosa, definida com el nombre de territoris afectats i el àrea total de placa,

- 2. AGEs i malaltia renal crònica.** Ja que en estadis avançats de la malaltia renal s'ha descrit una elevada concentració d'AGEs, en els estadis de lleu a moderat:
 - 2.1. Hi haurà també un augment de la concentració tissular d'AGEs que es relacionarà amb el decrement del filtrat glomerular,
 - 2.2. L'aglomeració tissular d'AGEs es correlacionarà amb la presència de malaltia ateromatosa subclínica, i
 - 2.3. La seva edat biològica serà superior a l'edat cronològica.

- 3. AGEs, diabetis mellitus tipus 2 i funció pulmonar.** Ja que en la diabetis els AGEs estan associats al desenvolupament de complicacions tardanes, i el pulmó ha sorgit com un nou òrgan diana:
 - 3.1. L'acumulació d'AGEs es correlacionarà amb una menor funció pulmonar, fins i tot entre la població general, i
 - 3.2. Aquesta correlació serà més marcada en els pacients amb diabetis.

- 4. AGEs i obesitat mòrbida.** Ja que s'han descrit concentracions elevades d'AGEs en poblacions amb sobrepès i obesitat lleu, els pacients amb obesitat mòrbida:
 - 4.1. Tindran una major acumulació d'AGEs que la població amb normopes,
 - 4.2. La determinació dels AGEs serà útil per identificar aquells pacients obesos amb major repercussió metabòlica, i
 - 4.3. La pèrdua de pes associada a la cirurgia bariàtrica conduirà a un descens en la concentració d'AGEs.

Objectius

El nostre objectiu ha estat aprofundir en el coneixement del significat clínic dels AGEs mesurats per autofluorescència cutània (SAF) en subjectes amb diferents patologies. Concretant els objectius, son els següents:

- 1. AGEs i malaltia ateromatosa subclínica.** En la població del Bus de la Salut volem:
 - 1.1. Mesurar l'acumulació d'AGEs mitjançant la SAF,
 - 1.2. Analitzar la prevalença de malaltia ateromatosa subclínica mitjançant ecografia arterial en els territoris carotidi i femoral,
 - 1.3. Examinar si existeix una correlació entre els resultats de la SAF i de l'ecografia arterial, especialment amb el nombre de plaques i la seva àrea total, i
 - 1.4. En un subgrup de pacients determinar la concentració sèrica d'AGEs.

- 2. AGEs i malaltia renal crònica.** En pacients amb malaltia renal crònica en estadis de lleu a moderat volem:
 - 2.1. Quantificar els valors d'AGEs i comparar-los amb els d'un grup control equiparat per edat, sexe i índex de masa corporal,
 - 2.2. Estudiar la relació entre els AGEs i la presència de malaltia ateromatosa subclínica, i
 - 2.3. Utilitzar els AGEs per estimar una edat biològica associada a l'envelliment accelerat descrit en aquesta població.

- 3. AGEs, diabetis mellitus tipus 2 i funció pulmonar.** En la població del Bus de la Salut volem:
 - 3.1. Analitzar si l'acumul d'AGEs es relaciona amb la funció pulmonar. Com en el projecte ILERVAS s'exclouen pacients amb DM2, avaluarem també una cohort de pacients provinents de les Consultes Externes del Servei d'Endocrinologia i Nutrició.

- 4. AGEs i obesitat mòrbida.** En una població amb obesitat mòrbida, una altra sotmesa a cirurgia bariàtrica, i en un grup de subjectes sense obesitat, volem:
 - 4.1. Comparar les concentracions d'AGEs en els tres grups,
 - 4.2. Avaluat la relació entre els AGEs i els diferents components de la síndrome metabòlica, i
 - 4.3. Observar si la pèrdua de pes associada a la CB aconsegueix un descens en la concentració d'AGEs.

Resultats

1. Primer Estudi: AGEs i malaltia ateromatosa subclínica.

Introducció: Tot i que els productes finals de glicació avançada (AGEs) causen un dany generalitzat al llit vascular, no existeix evidència sobre com els AGE es relacionen amb la malaltia ateromatosa subclínica en pacients amb baix o moderat risc vascular.

Material i mètodes: Estudi transversal i observacional que inclou 2.568 subjectes sense antecedents de malaltia cardiovascular. La malaltia ateromatosa s'avalua per ecografia vascular dels territoris carotidi i femoral, determinant la presència de plaques d'ateroma, la seva localització, el nombre de territoris afectats i àrea total de placa. Els nivells d'AGEs es determinen mitjançant l'estudi de l'autofluorescència cutània (SAF). A més, s'avalua també la concentració sèrica de CML i RAGE en un subgrup de 82 subjectes.

Resultats: Els pacients amb placa d'ateroma tenen una SAF superior a aquells sense malaltia ateromatosa (1,9 [1,7 a 2,3] vs. 1,8 [1,6 a 2,1] AU, $p < 0,001$). La SAF es correlaciona amb el nombre total de territoris afectats ($r = 0,171$, $p < 0,001$), augmentant progressivament des d'un valor de 1,8 [1,6 a 2,1] AU en aquells individus sense placa fins a 2,3 [1,9 a 2,7] AU en pacients amb ≥ 8 plaques ($p < 0,001$). Aquesta correlació positiva persisteix al avaluar per separat els territoris carotidi i femoral (ambdues $p < 0,001$). També s'observa una correlació entre la SAF i l'àrea total de la placa ($r = 0,113$, $p < 0,001$). A més, el model de regressió logística multinomial per a la presència de malaltia ateromatosa mostra que hi ha una associació significativa amb la SAF, juntament amb els factors de risc cardiovascular més clàssics. Finalment, els nivells sèric de CML es van trobar més elevats en el subgrup de pacients amb malaltia ateromatosa generalitzada en comparació en aquells sense cap placa ($p = 0,034$).

Conclusions: L'augment de la concentració d'AGEs s'associa amb un increment de la càrrega ateromatosa subclínica. Per tant, suggerim el seu us en les estratègies estàndard d'avaluació del risc cardiovascular en població general.

INTRODUCCIÓ

La progressió natural de l'aterosclerosi implica un llarg període, silenciós, en el que les fases avançades de la malaltia, sovint, no es detecten fins que es produeixin esdeveniments isquèmics a nivell cardiovascular ²³⁹. En aquest sentit, l'avaluació dels factors de risc clàssics en el desenvolupament de la malaltia ateromatosa, com ara la hipertensió arterial, la dislipèmia aterogènica, el tabaquisme i la DM2, han esdevingut útils per establir el risc de diferents grups poblacionals, particularment grups de baix risc vascular com joves i dones ^{240, 241}. Tot i això, fins el 60% dels events cardiovasculars tenen lloc en subjectes amb un risc calculat entre baix i moderat; i de fet, 4 de cada 10 infarts de miocardi o episodis de mort sobtada passen en persones sense antecedents previs de malaltia cardiovascular ²⁴². Per tant, nous paràmetres que ajudin a identificar als subjectes més vulnerables són encara necessaris per desenvolupar noves estratègies preventives ^{243, 244}.

Un dels mecanismes que podria afegir informació rellevant a l'avaluació estàndard del risc cardiovascular seria l'avaluació dels AGEs. Tal com ja hem comentat, els AGEs constitueixen un grup complex de compostos formats per la lenta glicació no enzimàtica de proteïnes, lípids i àcids nucleics, dels quals aproximadament una vintena han estat descrits fins a data d'avui ²⁴⁵. Els AGEs ja s'han relacionat amb l'aparició i la progressió de canvis a nivell vasculars, com ara l'augment de la permeabilitat, de l'engruiximent i de la rigidesa de la paret arterial ^{70, 119, 125}.

Tanmateix, no disposen encara d'evidència que refermi la hipòtesi de que la magnitud del dipòsit dels AGEs en la paret vascular es relacioni amb les principals característiques de la malaltia ateromatosa, com ara la quantitat de territoris afectats, la seva ubicació, o l'àrea total de les plaques ateromatoses. Per investigar aquesta qüestió s'ha realitzat un estudi transversal mitjançant l'avaluació no invasiva de l'acumulació tissular d'AGEs mitjançant la SAF en 2.568 subjectes sense antecedents de malaltia cardiovascular, que també van ser sotmesos a una exploració ecogràfica vascular dels territoris carotídi i femoral. A més, es van avaluar els nivells sèrics de CML i RAGE en un subgrup de 82 subjectes.

MATERIAL I MÈTODES

Declaració ètica

Tots els participants van signar un consentiment informat, i l'estudi va ser aprovat pel comitè d'ètica de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova (CEIC-1410).

Disseny de l'estudi i descripció de la població estudiada

Entre juliol de 2015 i desembre de 2017 es van reclutar un total de 2.568 subjectes d'origen caucàsic. Els pacients provenien dels centres d'Atenció Primària de la província de Lleida, en el contexte d'estudi en curs, prospectiu i d'intervenció, sobre la

detecció de malaltia ateromatosa asimptomàtica (Projecte ILERVAS; Identificador de ClinTrials.gov: NCT03228459) ²³⁸.

Es van utilitzar els següents criteris d'inclusió: edat entre 45-70 anys, sense antecedents de malaltia vascular (malaltia isquèmica, accident vascular cerebral o arteriopatia perifèrica), i amb almenys un factor de risc cardiovascular tradicional (obesitat, hipertensió, dislipèmia, tabaquisme o família de primer grau amb història de malaltia cardiovascular prematura). Els criteris d'exclusió van ser: malaltia renal crònica, DM2, malaltia pulmonar obstructiva crònica, neoplàsia activa, esperança de vida inferior a 18 mesos, color de pell fosc (classificació de Fitzpatrick superior o igual a 5), i dones embarassades.

Tots els subjectes inclosos tenien dades disponibles tant del SAF com de l'estudi vascular. A més, es va avaluar la concentració sèrica de CML i RAGE en 41 casos amb malaltia ateromatosa generalitzada (≥ 4 plaques) i 41 controls sense evidència de placa, acuradament emparellats per gènere, edat (± 4 anys), IMC (± 3 kg/m²) i colesterol total (± 30 mg/dl). Les dades antropomètriques van ser obtingudes mitjançant protocols estandarditzats. Es va registrar l'hàbit tabàquic (actual/ex-fumador/mai); com ex-fumador es va considerar un període d'abstinència tabàquica igual o superior a 1 any.

Estudi vascular i avaluació de la càrrega ateromatosa

Es van explorar de forma bilateral els territoris carotidis (caròtida comú, bifurcació, caròtida interna i caròtida externa) i femoral (comú i superficial). Les imatges van ser obtingudes per personal degudament entrenat mitjançant un aparell Doppler Ultrasound Vivid-I (General Electrics Healthcare, Waukesha, WI), equipat amb un transductor lineal de 12L-RS de banda ampla, que opera a freqüències entre 5-13 MHz. Es van utilitzar protocols d'escaneig i lectura validats ²⁴⁶.

Tal com es descriu al consens de Mannheim, el gruix de intima-mitja de la paret posterior de les artèries es va mesurar 1 cm proximal a la bifurcació, 1 cm dins de la bifurcació i en el primer cm de la caròtida interna ²⁴⁷. L'aterosomatosis subclínica es va definir com la presència d'almenys una placa en algun dels dotze territoris avaluats. Com a "placa" es va definir l'engruiximen i protusió intraluminal del gruix intima-mitja ≥ 1.5 mm ²⁴⁸. Es va diferenciar entre malaltia ateromatosa "focal" (1 territori afectat), "intermèdia" (de 2 a 3 territoris afectats) o "generalitzada" (de 4 a 12 territoris). Finalment es va mesurar la superfície de cada placa ateromatosa, i es va definir com "àrea total de la placa" (cm²) a la suma de l'àrea de totes les plaques d'un mateix subjecte ^{244, 249}.

Mesurament de l'autofluorescència cutània

La SAF es va mesurar amb el dispositiu AGE Reader™ (DiagnOptics Technologies, Groningen, The Netherlands), un dispositiu no invasiu i automatitzat que mesura la deposició d'AGEs en l'avantbraç dominant mitjançant un espectre de llum ultraviolada-A ⁹⁵. Es va registrar el valor mitjà de tres lectures, evitant les àrees de pell

tatuades o acolorides amb cosmètics. Un únic dispositiu, mantingut i calibrat seguint les indicacions del fabricant, es va utilitzar per a totes les mesures, expressades en AU.

Avaluacions de laboratori

Es va obtenir una mostra de sang capil·lar per avaluar nivells de creatinina (mg/dl), colesterol total (mg/dl) i colesterol de lipoproteïna de baixa densitat (LDL) (mg/dl) (sistema REFLOTRO[®] plus, Roche). A partir del valor de la creatinina, i considerant la raça i el gènere, va ser estimada la taxa de filtració glomerular per la fórmula CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*)²⁵⁰. A més, un cop finalitzat l'estudi vascular i feta la SAF, es va obtenir una mostra de sang venosa, sense dejú, a partir de la vena antecubital. Aquesta va ser separada per centrifugació (2.000g a 4°C durant 20 min) i congelada a -80°C per a l'anàlisi conjunt posterior. Les concentracions sèriques de CML i receptors dels AGEs es van mesurar per duplicat, utilitzant la tècnica d'ELISA.

Anàlisi estadística

Es va avaluar la distribució normal de les variables mitjançant la prova Shapiro-Wilk. Atesa la seva distribució no normal, les dades quantitatives s'expressen com la mitjana [rang interquartil]. Les comparacions entre grups es van fer utilitzant la prova de U de Mann-Whitney per a variables quantitatives, i el chi-quadrat de Pearson per a variables categòriques. La relació entre variables contínues va ser avaluada per la prova de correlació de Spearman.

Es va estudiar la precisió de la SAF com a mesura d'interès per discriminar els subjectes malalts (pacients amb ≥ 1 placa) dels casos sense malaltia ateromatosa utilitzant un anàlisi Receiver Operating Characteristic (ROC) i un informe complet sobre sensibilitat/especificitat.

Es va utilitzar un model de regressió logística multinomial per explorar les variables associades de manera independent amb la presència de qualsevol placa d'ateroma. Les variables independents incloses en l'anàlisi van ser la SAF, l'edat, el sexe, l'habit tabaquic i el colesterol total. Tots els valors "p" es van basar en una prova de significat estadístic a dues cares. Es va acceptar com a significatiu un valor de $p < 0,05$. Les anàlisis es van realitzar utilitzant el paquet estadístic SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, versió 20.0. Armonk, NY, EUA).

RESULTATS

La prevalença de malaltia ateromatosa subclínica en la població estudiada va ser del 70,4%: el 21,8% restringit als territoris carotidis, el 33,2% restringit als territoris femorals, i el 45,0% amb plaques en ambdós territoris. Les principals característiques clíniques i les dades metabòliques segons la presència de la placa es mostren a la **Taula 2**.

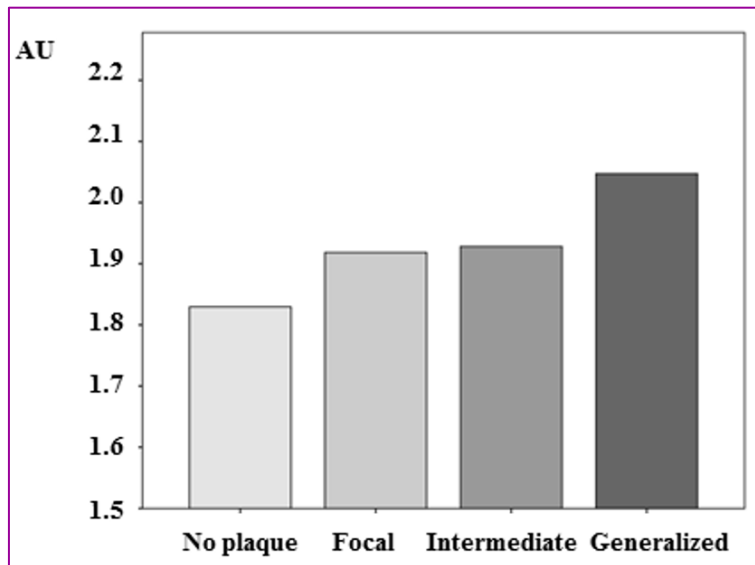
Taula 2. Principals característiques clíniques i dades metabòliques de la població estudiada segons la presència d'almenys una placa ateroma.

	Subjectes sense placa	Subjectes amb ≥ 1 placa	p
n	760	1808	-
Dones, n (%)	488 (64,2)	825 (45,6)	<0,001
Edat (anys)	56 [52 a 61]	58 [53 a 63]	<0,001
IMC (Kg/m²)	28,7 [25,6 a 31,6]	28,6 [25,9 a 31,8]	0,563
Ex-fumador, n (%)	591 (27,7)	1455 (31,1)	<0,001
Fumador actiu, n (%)	407 (19,1)	1545 (33,0)	<0,001
Pressió arterial sistòlica (mmHg)	127 [116 a 138]	131 [121 a 143]	<0,001
Pressió arterial diastòlica (mmHg)	80 [74 a 87]	82 [76 a 89]	<0,001
Colesterol total (mg/dl)	198 [178 a 224]	203 [180 a 229]	0,015
Colesterol LDL¹ (mg/dl)	141 [125 a 154]	144 [129 a 163]	0,017
FG (ml/min per 1,73m²)	96,6 [85,5 a 102,7]	95,2 [84,9 a 101,9]	0,063
SAF (AU)	1,8 [1,6 a 2,1]	1,9 [1,7 a 2,3]	<0,001

Les dades es mostren en mitjana [rang interquartil] o n (percentatge); IMC: índex de massa corporal; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; ¹: la determinació es va fer en casos en què el colesterol total era ≥200 mg/dl i dejú ≥6 hores o colesterol total ≥250 mg/dl, independentment de les hores de dejú; FG: filtració glomerular estimat segons l'equació CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*); SAF: autofluorescència de la pell; AU: *arbitrary units*.

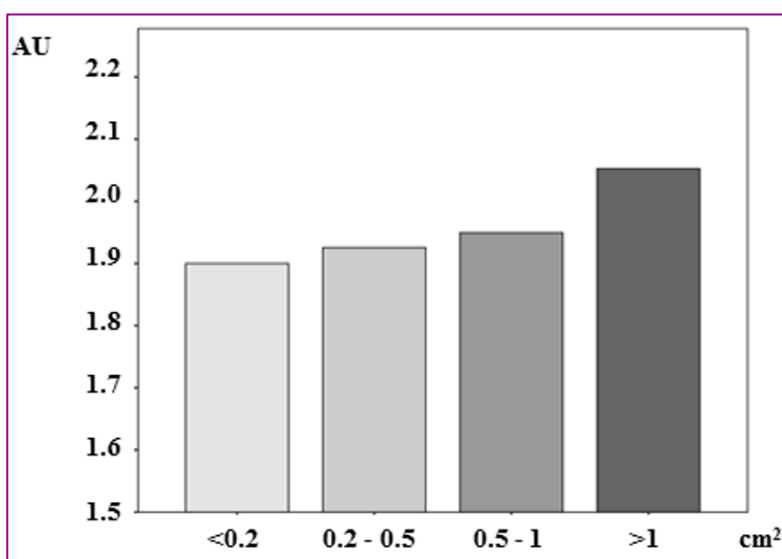
L'ateromatosi asimptomàtica va ser més prevalent en els fumadors actius i en els homes, i va augmentar amb l'edat, els nivells de pressió arterial i la concentració de colesterol total i LDL. A més, els pacients amb malaltia ateromatosa subclínica presentaven una SAF més alta (1,9 [1,7 a 2,3] vs. 1,8 [1,6 a 2,1] AU, p<0,001). La SAF també va ser major quan els dos territoris carotidis i femorals van ser afectats (2,0 [1,7 a 2,3] AU) que quan la malaltia estava restringida a la caròtida (1,9 [1,7 a 2,2] AU, p=0,008) o femoral (1,9 [1,7 a 2,2] AU, p=0,004). Finalment, el valor de la SAF augmenta progressivament des de pacients sense placa (1,8 [1,6 a 2,1] AU) fins aquells amb ateromatosi subclínica generalitzada (2,0 [1,8 a 2,4] AU) (p<0,001) (**Figura 16**). Així, els subjectes amb ≥8 territoris afectats mostren la major SAF (2,3 [1,9 a 2,7] AU). En l'anàlisi bivariant es va observar una correlació positiva entre la SAF i el nombre de territoris afectats (r=0,171, p<0,001).

Figura 16. Autofluorescència cutània segons el nombre de territoris vasculars amb malaltia ateromatosa: focal (1 territori), intermedi (2 a 3 territoris) o generalitzat (4 a 12 territoris).



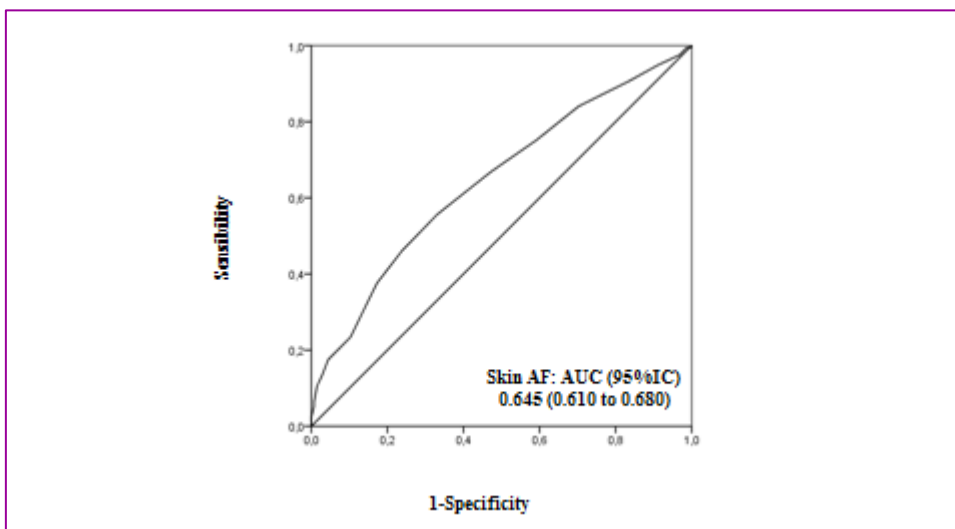
La superfície total de la placa va ser de 0,51 [0,21 a 1,07] cm², que van des de 0,13 [0,09 a 0,23] cm² en pacients amb només 1 placa fins a 1,41 [0,90 a 2,12] cm² quan la malaltia es generalitza. També es va observar una correlació positiva i significativa entre la SAF i l'àrea total de la placa ($r=0,113$, $p<0,001$) (**Figura 17**).

Figura 17. Autofluorescència cutània segons els quartils de la superfície total de la placa.



L'anàlisi de la corba ROC va revelar que el millor punt de tall per a la SAF (combinant sensibilitat i especificitat) per identificar pacients amb malaltia ateromatosa era 2,05 AU. En aquest punt, l'àrea sota la corba ROC era de 0,590 (0,566 a 0,614). Aquest valor va augmentar a 0,645 (0,610 a 0,680), amb una sensibilitat del 55,6% i una especificitat del 66,9%, quan l'anàlisi ROC es va restringir al sexe masculí (**Figura 18**). En aquest punt, reduint-se el punt de tall fins a 1,85 AU el percentatge d'individus, amb alguna placa va augmentar del 70,6% entre els que presentaven una SAF <1,85 AU fins al 85,9% entre aquells amb SAF \geq 1,85 AU ($p < 0,001$). Aquestes dades indiquen un risc augmentat en més de 2 vegades de presentar al menys una placa ateromatosa (diferència mitjana 2,5 [IC del 95%: 1,9 a 3,4]; $p < 0,001$) en comparació amb els subjectes amb un valor de SAF inferiors. A més, l'àrea total de la placa era més alta entre aquells amb una SAF \geq 1,85 AU en comparació amb la menor quantitat de SAF (0,81 [0,39 a 1,50] vs. 0,58 [0,24 a 1,15] cm^2 ; $p < 0,001$).

Figura 18. Anàlisi de la corba *Receiver Operating Characteristic (ROC)* per avaluar la precisió de la SAF per discriminar la presència de malaltia ateromatosa subclínica dels casos normals, juntament amb un informe de sensibilitat/especificitat en la població masculina.



L'àrea total de la corba ROC es va interpretar seguint les pautes següents: 0,9 a 1,0, excel·lent; 0,8 a 0,9, bo; 0,7 a 0,8, just; 0,6 a 0,7, pobre i 0,5 a 0,6, no útil.

D'altra banda, el model de regressió logística multinomial per a la presència de malaltia ateromatosa va mostrar que hi havia una associació significativa amb la SAF, juntament amb l'edat, el gènere masculí, el colesterol total i l'hàbit tabàquic (**Taula 3**).

Taula 3. Model de regressió logística multinomial per a la presència de malaltia ateromatosa i les seves variables associades incloent tota la població de l'estudi.

Malaltia ateromatosa	OR (CI 95%)	p
Edat (anys)		
[44-53]	Ref.	
[54-57]	1,79 (1,39 a 2,32)	<0,001
[58-63]	2,44 (1,89 a 3,17)	<0,001
[64-71]	5,63 (4,14 a 7,66)	<0,001
Sexe		
Dones	Ref.	
Homes	3,05 (2,48 a 3,76)	<0,001
SAF (AU)	1,70 (1,34 a 2,14)	<0,001
Colesterol total		
<200 mg/dl	Ref.	
≥200 mg/dl	1,51 (1,26 a 1,83)	<0,001
Fumador		
Mai	Ref.	
Ex-fumador	1,72 (1,37 a 2,15)	<0,001
Actiu	3,32 (2,56 a 4,31)	<0,001
Prova de bondat d'ajust de Chi-quadrat		0,701

Finalment, la **Taula 4** mostra les principals característiques clíniques principals i les concentracions sèriques de CML i RAGE en subpoblació d'estudi segons la presència de malaltia ateromatosa.

Taula 4. Principals característiques clíniques i dels productes finals de glicació avançada en sèrum i les seves dades de RAGE de la població que forma part del subestudi cas-control segons la presència de malaltia ateromatosa generalitzada.

	Subjectes sense placa	Malaltia ateromatosa generalitzada	p
n	41	41	-
Dones, n (%)	14 (34,1)	15 (36,6)	1,000
Edat (anys)	59 [55 a 63]	60 [55 a 65]	0,656
IMC (Kg/m²)	28,0 [25,9 a 29,9]	28,0 [26,5 a 30,5]	0,597
Colesterol total (mg/dl)	210 [189 a 228]	202 [183 a 222]	0,358
CML	105,0 [64,4 a 121,6]	109,8 [85,6 a 143,1]	0,034
RAGE	0,044 [0,018 a 0,142]	0,039 [0,023 a 0,066]	0,506
SAF (AU)	1,8 [1,6 a 2,1]	2,1 [1,9 a 2,4]	<0,001

DISCUSSIÓ

Aquest és el primer estudi en que la SAF s'ha avaluat a marcador de malaltia ateromatosa subclínica en una gran cohort de subjectes de mitjana edat sense esdeveniments cardiovasculars coneguts. En la nostra cohort s'ha descrit una estreta relació entre la SAF i totes les característiques relacionades amb la càrrega de malaltia ateromatosa (presència de placa, nombre de territoris afectats i àrea total de placa).

La prevalença de la malaltia ateromatosa subclínica en el nostre estudi va ser del 70,4%, percentatge superior al 63% descrit en la mostra de treballadors del Banc de Santander de l'estudi PESA (*Progression of Early Subclinical Atherosclerosis*)²⁵¹. En ambdós casos, la presència de placa ateromatosa en pacients de mitjana edat, asimptomàtics però vulnerables, és com un problema clínic d'alta prevalença que cal resoldre. Més encara quan gairebé un terç dels participants de l'estudi PESA classificats com de baix risc per les escales tradicionals (*Framingham Heart Study* i *European Systematic Risk Assessment*) presentaven una malaltia ateromatosa intermèdia o generalitzada²⁵¹. A més, el nostre estudi també posa de manifest que si el cribatge de la malaltia ateromatosa es limita a l'exploració carotídea deixem de detectar almenys un 12% de pacients amb malaltia exclusiva dels territoris femorals. Aquest missatge està en concordança amb les dades de l'estudi *Carotid-Femoral Ultrasound Morphology and Cardiovascular Events* (CAFES-CAVE), que va demostrar que l'exploració només carotídea o femoral només predeia un 15% i un 13% menys de nous esdeveniments que l'examen d'ambdós territoris en un període de deu anys seguiment²⁵². Estudis demogràfics previs, com el *Multi Ethnic Study of Atherosclerosis* (MESA), el *US High Risk Plaque Study*, i el *Northern Manhattan Study* van establir també fortes associacions entre els esdeveniments cardiovasculars i la malaltia ateromatosa subclínica en territoris carotídeu i coronari^{243, 253, 254}. En aquest contexte, les nostres dades mostren que la SAF pot ser una eina útil per ajudar-nos a detectar a aquesta població en risc.

S'han descrit alguns efectes característics dels AGEs que podrien afavorir la formació de plaques, com augmentar l'estrès oxidatiu, les modificacions del col·lagen i altres proteïnes que constitueixen la matriu extracel·lular de la paret arterial i la membrana basal, la promoció de la captura de LDL al compartiment subendotelial, i l'increment de la rigidesa vascular²⁵⁶⁻²⁵⁸. A més, la unió dels AGEs al seu receptor activa el factor nuclear kappa B, entre altres vies pro-oxidants i proinflamàtores^{259, 260}. Per tant, el paper dels AGEs afavoriria la formació de plaques ateromatoses causant danys generalitats a les artèries mitjançant l'augment de la inflamació, l'estrès oxidatiu i la reticulació de proteïnes de la paret arterial. A més, els AGEs també actuen com a mediadors de la progressió i trencament de les lesions ateromatoses estables¹²⁵.

Atès que la malaltia ateromatosa és un procés difús, la mesura de la superfície total de la placa sembla ser una aproximació més fiable per al pacient en situació de risc. D'aquesta manera, s'ha comunicat que la placa creix longitudinalment al llarg de l'eix de flux carotídeu amb més rapidesa, quasi el doble, del que ho fa en gruix²⁶¹. Per tant, sembla raonable suggerir que els pacients amb plaques més petites tindran un

menor risc cardiovascular en comparació amb aquells amb la mateixa quantitat de plaques però amb una major superfície total.

L'associació entre els AGEs circulants i la mortalitat per a totes les causes, i especialment d'origen cardiovascular, ha estat avaluada en estudis epidemiològics de grandària moderada, centrats en gent gran, en dones amb DM2 i en pacients amb diabetis mellitus tipus 1 ²⁶²⁻²⁶⁵. D'aquesta manera, en una població adulta d'homes i dones majors de 65 anys, la concentració sèrica de CML es va associar amb una major incidència de malalties coronària i cerebrovascular, de forma independent als factors de risc tradicionals ²⁶⁶. No obstant això, Hanssen et al. va mostrar que les mesures d'AGEs en plasma no eren diferents en comparar 1.291 individus amb i sense malaltia cardiovascular provinents de dos estudis de cohorts holandesos ²⁶⁷. De manera semblant, en una cohort de dimensions més modestes, amb subjectes amb malaltia renal, no es va detectar cap associació entre CML i la incidència malaltia cardiovascular ²⁶⁸. Les nostres dades en un petit subgrup de la població inicial mostren un discret, tot i que significatiu, increment de la concentració de CML en els subjectes amb malaltia ateromatosa subclínica generalitzada.

Hi ha limitacions potencials que volem destacar en el nostre estudi. En primer lloc, com a estudi observacional i transversal, no es pot establir una relació causal entre la SAF o els AGEs circulants amb l'ateromatosi subclínica. A més, no podem estar segurs que els pacients amb valors més elevats de SAF siguin també els que desenvolupin esdeveniments cardiovasculars durant els pròxims anys. Tanmateix, el problema és clínicament rellevant, ja que la prevalença de l'ateromatosi subclínica afecta quasi a dos terços de la població estudiada, i es necessita ajuda per identificar de forma eficaç els subjectes de més alt risc. En segon lloc, la SAF pot ser poc fiable en subjectes amb pell fosca a causa d'una excessiva absorció de la llum. Hem intentat resoldre aquesta limitació seleccionant només els subjectes caucàsics i exclouent aquells amb tonalitats de pell més fosques. En tercer lloc, hem estudiat els nivells circulants d'AGEs tan sols en una població petita, tot i que ben seleccionada.

En conclusió, hi ha una clara necessitat d'identificar subjectes amb major risc de patir malaltia cardiovascular. En general, els clínics han utilitzat puntuacions globals de risc que combinen múltiples factors de risc cardiovascular tradicionals per classificar els pacients. El nostre estudi mostra que la SAF s'associa amb un augment de la càrrega ateromatosa i proporciona informació clínicament rellevant, el que suggereix la seva introducció en les futures estratègies d'avaluació de risc cardiovasculars en població general.

SUPORT FINANCER

Aquest treball ha rebut suport econòmic per realitzar les determinacions sèriques de CML i RAGE per part de la Fundación de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (FSEEN) i el Laboratori Esteve.

CONTRIBUCIÓ CIENTÍFICA COM A PÒSTER

Sánchez E, Betriu À, Fernández E, Purroy F, Barbé F, Martínez-Alonso M, Castro E, Molí MT, Hernández M, Lecube A. Productos finales de glicación avanzada y carga ateromatosa: el bus de la salud (proyecto ILERVAS). En el 59 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición, Barcelona 2017.

PREMIS REBUTS

Premi al millor pòster en l'Àrea clínica durant el 59 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición, Barcelona 2017.

2. Segon Estudi: AGEs i malaltia renal crònica.

Introducció: Els AGEs, associats clàssicament amb la DM2, permeten estimar el risc cardiovascular en pacients amb MRC avançada, així com la seva edat vascular. En absència d'hiperglucèmia, els AGEs poden augmentar en presència d'estrès oxidatiu i inflamació, així com en funció de la dieta o el consum de tabac. La mesura de la concentració dels AGEs a nivell subcutànis una tècnica ràpida, automatitzada, fàcil i innòcua. Fins ara no disposem d'informació dels nivells d'AGEs en fases inicials de la MRC, i menys de la seva relació amb la presència de malaltia ateromatosa subclínica.

Material i mètodes: Estudi cas-control observacional. Esvan reclutar 87 pacients amb MRC classificada en els estadis 2, 3a i 3b, així com 87 controls sense MRC. Tots dos grups van ser acuradament aparellats per edat, sexe, IMC, perímetre de cintura i hàbit tabàquic. Es van excloure en tots dos grups els pacients amb el diagnòstic de DM2. La concentració d'AGEs a nivell subcutani es va estimar mitjançant SAF, i es va utilitzar un dispositiu AGE Reader. A més, es va realitzar un estudi ecogràfic dels territoris carotidis per avaluar la presència de malaltia ateromatosa. Als anàlisis comparatius habituals es va afegir un estudi de regressió lineal múltiple per determinar els factors associats a nivells elevats d'AGEs.

Resultats: No hi van haver diferències en l'edat, el sexe ni la presència dels factors de risc cardiovascular clàssics entre tots dos grups. Els pacients amb MRC tenien uns nivells de SAF superiors als del grup control ($2,2 \pm 0,4$ vs. $2,5 \pm 0,6$; $p < 0,001$). Quan els pacients amb i sense placa van ser analitzats per separat, les diferències en la SAF entre pacients amb MRC i controls van persistir solsament en el grup que presentava alguna placa carotídea ($2,6 \pm 0,5$ vs. $2,2 \pm 0,5$; $p < 0,001$). L'edat vascular estimada va ser 12 anys superior en els pacients amb malaltia renal ($p = 0,001$). En l'anàlisi univariant, la SAF es va correlacionar negativament amb el filtrat glomerular ($r = -0,312$, $p = 0,003$), i positivament amb l'edat ($r = 0,586$, $p < 0,001$), la pressió del pols ($r = 0,380$, $p < 0,001$) i l'SCORE risk ($r = 0,434$, $p < 0,001$). Finalment, la regressió lineal múltiple va posar de manifest com l'edat i el filtrat glomerular s'associen de forma independentment als valors de SAF ($p < 0,001$).

Conclusions: Els AGEs estan augmentats en els estadis inicials de la MRC, i augmenten en la mesura en que disminueix el filtrat glomerular. Els pacients amb malaltia renal tenen una edat vascular 12 anys superior a l'edat cronològica. Aquest envelliment vascular prematur podria afavorir futurs esdeveniments cardiovasculars. La mesura dels AGEs sorgeix com una eina útil per a valorar el risc cardiovascular en pacients renals.

RESEARCH ARTICLE

Skin Autofluorescence and Subclinical Atherosclerosis in Mild to Moderate Chronic Kidney Disease: A Case-Control Study

Enric Sánchez¹, Àngels Betriu², David Arroyo², Carolina López¹, Marta Hernández¹, Ferran Rius¹, Elvira Fernández², Albert Lecube^{1,3*}

1 Endocrinology and Nutrition Department, Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), Universitat de Lleida, Lleida, Catalonia, Spain, **2** Unit for the Detection and Treatment of Atherothrombotic Diseases (UDETMA), Nephrology Department, Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), Universitat de Lleida, Lleida, Catalonia, Spain, **3** CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

* alecube@gmail.com



Abstract

Advanced glycation end-products (AGEs) are increased and predict mortality in patients with chronic kidney disease (CKD) who are undergoing hemodialysis, irrespective of the presence of type 2 diabetes. However, little information exists about the relationship between AGEs and subclinical atherosclerosis at the early stages of CKD. A case-control study was performed including 87 patients with mild-to-moderate stages of CKD (glomerular filtration rate from 89 to 30 ml/min/per 1.73m²) and 87 non-diabetic non-CKD subjects matched by age, gender, body mass index, and waist circumference. Skin autofluorescence (AF), a non-invasive assessment of AGEs, was measured. The presence of atheromatous disease in carotid and femoral arteries was evaluated using vascular ultrasound, and vascular age and SCORE risk were estimated. Patients with mild-to-moderate stages of CKD showed an increase in skin AF compared with control subjects (2.5±0.6 vs. 2.2±0.4 AU, p<0.001). A skin AF value >2.0 AU was accompanied by a 3-fold increased risk of detecting the presence of an atheromatous plaque (OR 3.0, 95% CI 1.4–6.5, p = 0.006). When vascular age was assessed through skin AF, subjects with CKD were almost 12 years older than control subjects (70.3±25.5 vs. 58.5±20.2 years, p = 0.001). Skin AF was negatively correlated with glomerular filtration rate (r = -0.354, p<0.001) and LDL-cholesterol (r = -0.269, p = 0.001), and positively correlated with age (r = 0.472, p<0.001), pulse pressure (r = 0.238, p = 0.002), and SCORE risk (r = 0.451, p<0.001). A stepwise multivariate regression analysis showed that age and glomerular filtration rate independently predicted skin AF (R² = 0.289, p<0.001). Skin AF is elevated in patients with mild-to-moderate CKD compared with control subjects. This finding may be independently associated with the glomerular filtration rate and the presence of subclinical atheromatous disease. Therefore, the use of skin AF may help to accurately evaluate the real cardiovascular risk at the early stages of CKD.

OPEN ACCESS

Citation: Sánchez E, Betriu À, Arroyo D, López C, Hernández M, Rius F, et al. (2017) Skin Autofluorescence and Subclinical Atherosclerosis in Mild to Moderate Chronic Kidney Disease: A Case-Control Study. PLoS ONE 12(1): e0170778. doi:10.1371/journal.pone.0170778

Editor: Abelardo I Aguilera, Hospital Universitario de la Princesa, SPAIN

Received: October 13, 2016

Accepted: January 10, 2017

Published: January 31, 2017

Copyright: ©2017 Sánchez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are available within the paper and in the Dryad Digital Repository at the following URL: <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.k0c40>.

Funding: This work was supported by grants from de Instituto de Salud Carlos III ISCIII (Action Plan 14/00008). This organization had no role in study design, the collection, analysis and interpretation of data, report writing, or the decision to submit the article for publication.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Advanced glycation end products (AGEs) characterize a heterogeneous group of compounds formed by the non-enzymatic glycation of proteins after exposure to aldose sugars [1]. These reactions progress in normal aging, and are accelerated under chronic hyperglycemia [2, 3]. In this way, the concentration of AGEs is associated with a higher incidence and faster progression of chronic type 2 diabetes (T2D) microangiopathy, and it is also an independent predictor of mortality in this population [4, 5]. In addition, other conditions like chronic inflammation, oxidative stress, and tobacco smoke can lead to increased AGEs formation [1, 6, 7].

The gold standard skin biopsy measurement of AGEs agglomeration may be substituted by a non-invasive device based on skin autofluorescence (AF) [8]. Skin AF has been previously validated in clinical settings, and its clinical value has been established in large studies including individuals with a high risk of atherosclerosis, as T2D and chronic kidney disease (CKD) [9–12]. AGEs promote the development and evolution of atherosclerosis through direct and receptor pathways [13].

The progressive loss of glomerular filtration rate (GFR) is associated with systemic inflammation, as well as with an imbalance between oxygen reactive species production and antioxidant defenses [14, 15]. Increased circulating levels of AGEs are found in patients with CKD undergoing hemodialysis regardless, of the presence of T2D [4, 16]. Some additional factors have been associated with AGEs accumulation in renal failure because of decreased glomerular filtration, intraperitoneal formation during the time course of peritoneal dialysis, or dietary intake [17–20]. Therefore, the high body burden of AGEs in subjects with CKD may play a role in the pathogenesis of vascular complications associated with hemodialysis [21]. However, there is little information about the relationship between AGEs and subclinical atherosclerosis at earlier stages of CKD.

To shed light on this issue, we performed a case-control study of tissue accumulation of AGEs according to the presence of mild to moderate CKD. For this purpose, we selected subjects without T2D and no previous cardiovascular events. The AGEs were measured via skin AF. We also aimed to assess the relationship between AGEs accumulation and subclinical atherosclerosis, by evaluating vascular ultrasound data.

Material and Methods

Ethics statement

Informed written consent was obtained from all participants, and the protocol was approved by the Arnau de Vilanova University Hospital ethics committee.

Design of the study and description of the study population

We assessed the effect of mild to moderate CKD on tissue accumulation of AGEs following the *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* guidelines for reporting case-control studies [22].

A total of 128 patients attending the outpatient Nephrology Clinic were examined to determine eligibility at the time of a regular visit between December 2014 and October 2015. The inclusion criteria were age older than 18 years, Caucasian origin, and GFR categories G2 (mildly decreased; 60–89 ml/min/per 1.73m²), G3a (mildly to moderately decreased; 45–59 ml/min/per 1.73m²), or G3b (moderately to severely decreased; 30–44 ml/min/per 1.73m²) according the standards established by the *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* [23]. Therefore, all patients with GFR category G2 also present moderately or increased albuminuria

(≥ 30 mg/g or ≥ 3 mg/mmol). The GFR was estimated following the CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) equation [24].

Using the standard deviation of serum AGEs detected in a previous study, we determined that the minimum sample required was 51 subjects [2]. Forty-one patients were excluded: T2D ($n = 10$), prior cardiovascular event ($n = 8$), GFR lower than 30 ml/min/per 1.73m² ($n = 6$), non-Caucasian races ($n = 4$), chronic treatment with steroids ($n = 3$), active malignancy ($n = 3$), type 1 diabetes ($n = 3$), and age older than 80 years ($n = 1$). Moreover, 3 patients were excluded for their brown skin (Fitzpatrick type IV skin) because the excessive light absorption produced by this type of skin precludes reliable measurements of skin AF. No pregnant women were evaluated.

We aimed to select one control for every case. Subsequently, 87 subjects without kidney disease (GFR categories G1 and G2 without albuminuria) from the same Department served as the control group. Controls were closely matched to cases by, gender, BMI, waist circumference, and smoking status. As a linear relation between skin AF and subject age has been previously described, both groups were also matched by chronological age [2].

Measurement of AGEs accumulation and determination of vascular age

Skin AF was measured using the AGE Reader™ device (DiagnOptics, Groningen, The Netherlands), a fully automated noninvasive tool that measures AGE deposition using an Ultraviolet-A spectrum. The skin AF is determined from the ratio between the emission fluorescence in the wavelength range between 420–600 nm, and the reflected excitation light with a wavelength between 300–420 nm, which was measured using a spectrometer and software. The measurement time is about one minute, and the mean value of three readings was recorded in all subjects. In addition, vascular age was calculated using skin AF value by the formula previously validated by Koetsier [vascular age = (skin AF - 0.83) / 0.024] [2].

Vascular ultrasound study and SCORE risk estimation

The ultrasound assessment of carotid and femoral arteries followed a predetermined protocol as defined in the NEFRONA study [25]. Briefly, B-mode and color-Doppler ultrasound imaging was performed using a Vivid-i BT09 device (General Electrics Healthcare, Waukesha, WI) equipped with 6–13 MHz broadband linear array transducer and Doppler examinations in transverse and longitudinal planes. The presence of atheromatous plaque in the following territories was evaluated on the left and right sides: internal, bulb and common carotid arteries, and deep and superficial femoral arteries. Plaques were defined as focal intrusions into the lumen ≥ 1.5 mm thick, as recommended by *American Society of Echocardiography* [26]. Simultaneously, the ankle-brachial index (ABI) was assessed: a pathologic ABI was defined as a value ≤ 0.9 or ≥ 1.4 , and the modified method by Schröder was preferred [27]. Participants were classified by grades of atheromatous disease in 4 stages according ultrasound study and the ABI: (i) no atherosclerosis (ABI > 0.9); (ii) mild atherosclerosis (ABI between 0.7–0.9); (iii) moderate atherosclerosis (carotid plaque with stenosis $< 50\%$); and (iv) severe atherosclerosis (ABI < 0.7 or carotid plaque with stenosis $\geq 50\%$) [25]. To better analyze our results, patients were grouped according to the severity of atheromatous disease: Group I (patients without and with mild atherosclerosis, in which the absence of plaques is mandatory) and Group II (patients with moderate and severe atherosclerosis, in which presence of plaques is mandatory).

The SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation) risk system is based on age, gender, country of origin, systolic blood pressure, smoking status, and either total cholesterol or total cholesterol/high-density lipoprotein cholesterol ratio. It was used to estimate the 10-year risk of mortality from cardiovascular disease [28].

Statistical analysis

Normal distribution of the variables was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. Data were expressed either as the mean ± SD or median (total range). Comparisons between groups were performed using the Student's *t* test or the Mann-Whitney U test for continuous variables, and the χ^2 test or the Fisher test were used for categorical variables.

The relationship between the continuous variables was examined with Pearson's linear correlation test or the Spearman correlation coefficient. A stepwise multivariate regression analysis was used to explore the variables independently related to skin AF. The independent variables included age, gender, pulse pressure, LDL cholesterol, GFR, glycosylated haemoglobin, and SCORE risk. Significance was considered with a two-sided *p* value <0.05. Statistical analyses were performed using SPSS statistical package (SPSS, Chicago, IL, USA) version 20.

Results

The main clinical characteristics and metabolic data of the study population according to the presence of CKD are showed in [Table 1](#). Patients with mild to moderate decrease in GFR showed significantly higher levels of skin AF versus non-CKD subjects (2.5 ± 0.6 vs. 2.2 ± 0.4

Table 1. Main clinical characteristics and metabolic data of the study population according to the presence of chronic kidney disease.

	<i>Mild to moderate CKD</i>	<i>Non CKD</i>	<i>Mean difference (95% CI)</i>	<i>p</i>
N	87	87	-	-
Women, n (%)	33 (37.9)	33 (37.9)	-	1.000
Age (yrs)	58.1 ± 10.6	56.5 ± 8.8	-1.5 (-4.4 to 1.4)	0.307
BMI (Kg/m²)	28.8 ± 5.8	28.9 ± 4.8	0.8 (-1.5 to 1.6)	0.918
Waist circumference (cm)	100.4 ± 15.1	100.7 ± 12.7	0.2 (-3.9 to 4.5)	0.893
Non-smoker, n (%)	56 (49.5)	49 (41.4)	-	0.286
Systolic Blood Pressure (mm Hg)	131.1 ± 16.8	128.0 ± 18.0	-3.0 (-8.2 to 2.1)	0.246
Diastolic Blood Pressure (mm Hg)	77.6 ± 10.0	75.7 ± 11.7	-1.9 (-5.1 to 1.3)	0.253
Pulse Pressure (mm Hg)	53.5 ± 14.3	52.3 ± 14.3	-1.1 (-5.4 to 3.1)	0.591
Fasting plasma glucose (mmol/l)	5.3 ± 0.5	5.3 ± 0.8	0.0 (-3.1 to 4.7)	0.685
HbA1c (%)	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.4	0.0 (-0.1 to 0.1)	0.933
Serum Creatinine (mg/dL)	1.32 ± 0.6	0.81 ± 0.1	-0.5 (-0.6 to -0.3)	<0.001
GFR (mL/min per 1.73m²)	60.8 ± 18.3	90.0 ± 9.3	29.1 (24.7 to 33.5)	<0.001
ACR (mg/g)	108.2 ± 191.0	5.3 ± 5.3	-102.9 (-150.7 to -55.1)	<0.001
Total cholesterol (mg/dL)	164.5 ± 35.6	194.9 ± 41.9	30.4 (-18.7 to 42.1)	<0.001
HDL-cholesterol (mg/dL)	50.7 ± 12.6	53.2 ± 12.2	2.42 (-1.4 to 6.2)	0.218
LDL-cholesterol (mg/dL)	91.4 ± 27.9	117.4 ± 37.2	26.0 (15.8 to 36.3)	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	133.5 (42.0 to 780.0)	140.0 (52.0 to 632)	6.4 (-21.6 to 34.6)	0.650
SCORE risk (%)	2.3 ± 2.6	1.7 ± 2.2	-0.6 (-1.3 to 0.0)	0.079
Atheromatous plaque, n (%)	68 (78.1)	72 (82.7)	-	0.444
Causes of chronic kidney disease				
High blood pressure	36 (41.4)	-	-	-
Polycystic kidney disease	16 (18.4)	-	-	-
Glomerulonephritis	25 (28.7)	-	-	-
Tubulointerstitial nephritis	10 (11.5)	-	-	-

Data are means ± SD, n (percentage) or median (total range). CKD: chronic kidney disease; BMI: body mass index; HbA1c: glycosylated haemoglobin; GFR: glomerular filtration rate estimated according the CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) equation; ACR: albumin to creatinine ratio; SCORE: Systematic Coronary Risk Evaluation.

doi:10.1371/journal.pone.0170778.t001

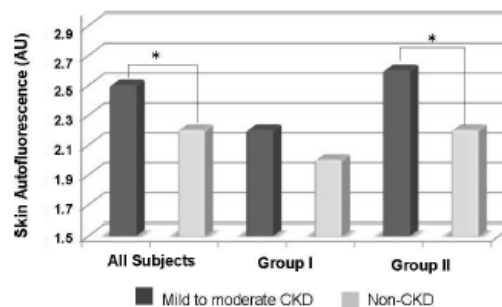


Fig 1. Skin autofluorescence according to the presence of atheromatous plaque between controls and patients with mild to moderate stages of CKD. CKD: chronic kidney disease; AU: arbitrary units; *: $p < 0.001$; Group I: patients without and with mild atherosclerosis, in which the absence of plaques is mandatory; Group II: patients with moderate and severe atherosclerosis, in which presence of plaques is mandatory.

doi:10.1371/journal.pone.0170778.g001

arbitrary units (AU), $p < 0.001$). When the subjects with and without atheromatous plaque (group I vs. group II) were analyzed separately, differences in skin AF values persisted only in the second group (Group II: 2.6 ± 0.5 vs. 2.2 ± 0.5 AU, $p < 0.001$), and disappeared among subjects with no detectable plaque (Group I: 2.2 ± 0.7 vs. 2.0 ± 0.3 AU, $p = 0.464$) (Fig 1). When the entire population was evaluated, subjects with a skin AF value higher > 2.0 AU showed a 3-fold increased risk of an atheromatous plaque (OR 3.0, 95% CI 1.4–6.5, $p = 0.006$).

As shown in previous studies, a strong positive correlation was observed between skin AF and age ($r = 0.472$, $p < 0.001$), without differences between genders. While both groups were closely matched for age, when vascular age was assessed, subjects with mild to moderate CKD appeared to be almost twelve years older than control subjects (70.3 ± 25.5 vs. 58.5 ± 20.2 years, $p = 0.001$).

In the entire population, skin AF correlated negatively with GFR ($r = -0.354$, $p < 0.001$), and LDL-cholesterol ($r = -0.269$, $p = 0.001$), and correlated positively with age ($r = 0.472$, $p < 0.001$), pulse pressure ($r = 0.238$, $p = 0.002$), and SCORE risk ($r = 0.451$, $p < 0.001$) (Fig 2). The same linear correlations were observed when only patients with CKD were evaluated, but disappeared in the control group. An intriguing negative correlation was also established between AGEs and LDL cholesterol (Table 2).

Finally, a stepwise multivariate regression analysis showed that the age and GFR (but not pulse pressure, glycosylated hemoglobin, LDL-cholesterol nor SCORE risk) were independently associated with forearm skin AF ($R^2 = 0.289$, $p < 0.001$) (Table 3).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to show that subjects with early stages of CKD significantly increase skin AF values. In addition, a close relationship exists between skin AF and asymptomatic atheromatous disease in this population. Furthermore, skin AF appears to be negatively correlated with GFR, suggesting that renal dysfunction is a key factor to increase AGEs deposition in subcutaneous tissue.

The current study agrees with recent findings in subjects with an estimated GFR > 60 ml/min/per 1.73m^2 , in whom skin AF was significantly higher in those with peripheral artery disease versus the subclinical atherosclerosis group. This contributes to vascular damage in addition to classical mechanisms [29]. The biological effects of AGEs through its ligation to their receptors located in large blood vessels accelerate plaque formation [13]. In patients with end-stage renal disease, immunostained pentosidine -a major glycoxidation product- was observed

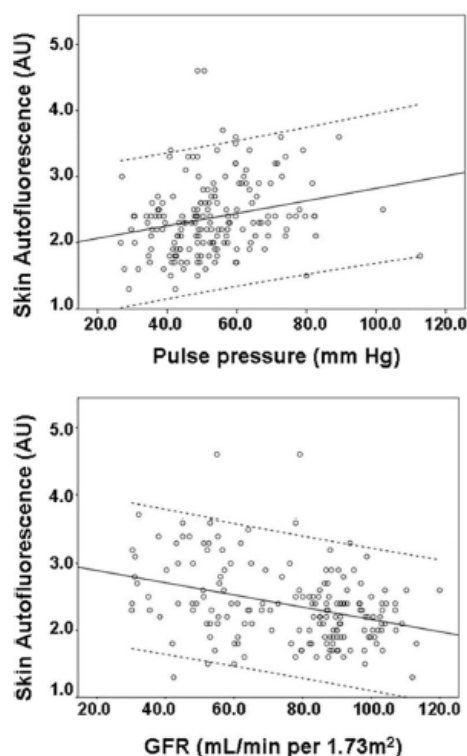


Fig 2. Scatter plot showing linear correlation between skin autofluorescence and: pulse pressure, and glomerular filtration rate. AU: arbitrary units; GFR: glomerular filtration rate estimated according the CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) equation.

doi:10.1371/journal.pone.0170778.g002

along the elastin fibers in aortic media. This was associated with medial calcification [30]. These data also shown that deposition of AGEs accompanies subclinical atherosclerosis beyond the presence of T2D [31].

Table 2. Correlations of skin autofluorescence with clinic and metabolic variables.

	<i>All subjects</i>		<i>Mild to moderate CKD</i>		<i>Non CKD</i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Age (yrs)	0.472	<0.001	0.586	<0.001	0.291	0.006
BMI (kg/m ²)	0.040	0.600	0.088	0.417	-0.25	0.819
PP (mmHg)	0.238	0.002	0.380	<0.001	0.055	0.612
FPG (mmo/l)	-0.021	0.789	0.016	0.885	-0.040	0.712
HbA1c (%)	0.054	0.603	0.139	0.307	-0.124	0.453
GFR (mL/min per 1.73m ²)	-0.349	<0.001	-0.315	0.003	-0.110	0.309
LDL-cholesterol (mg/dl)	-0.269	0.001	-0.127	0.255	-0.284	0.011
SCORE risk (%)	0.451	<0.001	0.541	<0.001	0.314	0.105

CKD: chronic kidney disease; BMI: body mass index; PP: pulse pressure; FPG: fasting plasma glucose; HbA1c: glycosilated hemoglobin; GFR: glomerular filtration rate estimated according the CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) equation; SCORE: Systematic Coronary Risk Evaluation).

doi:10.1371/journal.pone.0170778.t002

Table 3. Stepwise multivariate regression analysis of variables associated with skin autofluorescence.

		Beta	p
Skin AF	Age (yrs)	0.424	<0.001
	GFR (mL/min per 1.73m ²)	-0.275	<0.001
	LDL-cholesterol (mg/dl)	-0.148	0.112
	SCORE risk (%)	0.155	0.171
	PP (mmHg)	0.057	0.598
	HbA1c (%)	0.032	0.719
R ² = 0.289	Constant		0.001

Beta: Standardized regression coefficient; AF: autofluorescence; GFR: glomerular filtration rate estimated according the CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) equation; SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation); PP: pulse pressure; HbA1c: glycosilated haemoglobin.

doi:10.1371/journal.pone.0170778.t003

CKD substantially increases the risk of cardiovascular disease. Indeed, a large community-based population study including 1,120,295 adults showed an adjusted hazard ratio for cardiovascular events was 1.4 with an estimated GFR of 45 to 59 ml/min/per 1.73m². This increased to 2.0 with an estimated GFR of 30 to 44 ml/min/per 1.73m² [32]. In addition, AGEs are also known to accumulate in the microvasculature of the kidney and to promote glomerular filtration and proteinuria [33]. In fact, clinical studies in patients with type 1 diabetes revealed a significant increase in the skin concentration of AGEs as urinary albumin increased from normal to microalbuminuria, and macroalbuminuria [34].

The plasma concentration of AGEs in T2D has also identified those normoalbuminuric subjects who will experience a higher increase in the glomerular basement membrane at in about 5-years follow-up period [35]. More recently, Luo et al. have demonstrated that in a non-hyperglycemic milieu, AGEs increase the permeability of the glomerular endothelial cells by a matrix metalloproteinases degradation of tight junction complexes, mainly occluding and claudin-5 proteins [36]. Our results support the close relationship between AGEs accumulation and decreases in GFR because a strong and negative relationship between mild to moderate ranges of GFR and skin AF was observed. Whether the AGEs renal accumulation in humans promotes kidney dysfunction or whether the decrease in GRF triggers AGE accumulation cannot be elucidated from our study. However, when the receptor for AGEs is deleted in a mouse model, there is a 29% increase in GFR accompanied by structural changes such as reduced thickening of glomerular basement membrane and mesangial sclerosis [37].

When assessed using skin AF values, we observed a marked increase in vascular age, which is more than 10 years higher than the chronological age in patients with CKD. Vascular aging occurs along with endothelial dysfunction, vascular remodelling, inflammation, and increased stiffness, all of them previously associated with AGEs [16, 38]. In this way, we observed a 3-fold increased risk of an atheromatous plaque in subjects with a skin AF value higher > 2.0 AU. This data support the idea that AGEs are useful in identifying a subclinical phenotype of early vascular disease in large blood vessels [39]. Therefore, in a CKD population before end-stage disease is established, skin AF may represent a clinically helpful and non-invasive method to screen assess cardiovascular risk.

The relationship between skin AF and other conventional risk factors outside T2D remains controversial. In our study, skin AF positively correlated with SCORE risk when the entire population as well as patients with renal impairment were evaluated. However, the correlation disappeared in the control group. Similarly, skin AF was not related to SCORE risk or its

components in a sub-study of the *Groningen Overweight and Lifestyle (GOAL)* project that included overweight and obese subjects without T2D nor renal disease [40]. These data support the idea that, in the clinical setting the decreased GFR is as a key factor accounting for skin AF when T2D is not present. The inverse association between skin AF and LDL cholesterol detected in our population deserves an additional comment. When the LDL conjugated diene is measured as marker of lipid peroxidative stress, a negative correlation with skin AF has been described in critically ill patients [41]. In addition, serum LDL cholesterol was also negatively correlated with skin AF in a cross-sectional study of 223 individuals visiting the vascular outpatient clinic for primary or secondary prevention [29].

This study has some limitations. As a cross-sectional study, we cannot establish a causal relationship between skin AF and subclinical atheromatosis. However, the problem is clinically relevant since the prevalence of CKD reaches 20.4% among participants from the 2005–2006 *National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)*, and help is needed to better identify subjects at risk [42, 43]. Second, we did not compare skin AF with plasma AGEs levels. We assumed that skin AF remains stable for a long time because it is less influenced by factors such as smoking or nutrition. In fact, plasma AGEs measurements were not different when comparing individual with and without cardiovascular disease in participants from two Dutch cohort studies including 1,291 subjects with various degrees of glucose metabolism [44]. Third, skin AF could be unreliable in subjects with dark skin due to excessive light absorption. We tried to solve this limitation selecting only Caucasian subjects and excluding four of them with medium brown skin.

In conclusion, skin AF is elevated in patients with mild to moderate CKD in comparison with control subjects. This finding is related with the presence of subclinical atheromatous disease, and appears to be independently associated with the GFR. Therefore, skin AF is an easy, fast and non-invasive method that may help to accurately evaluate real cardiovascular risk in the early stages of CKD.

Acknowledgments

This work was supported by grants from de Instituto de Salud Carlos III ISCIII (Action Plan 14/00008). This organization had no role in study design, the collection, analysis and interpretation of data, report writing, or the decision to submit the article for publication.

Author Contributions

Conceptualization: ES AB EF AL.

Data curation: ES CL MH FR AL.

Formal analysis: ES AB DA AL.

Funding acquisition: EF AL.

Investigation: ES CL MH FR AL.

Methodology: ES AB EF AL.

Project administration: AB EF AL.

Resources: EF DA AL.

Supervision: AB DA EF AL.

Validation: ES AB.

Visualization: ES AL.

Writing – original draft: ES AB DA AL.

Writing – review & editing: ES AB DA CL MH FR EF AL.

References

1. 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. PMID: [7918300](#)
2. Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaff R. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther*. 2010; 12: 399–403. doi: [10.1089/dia.2009.0113](#) PMID: [20388050](#)
3. Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation end-products. *J Intern Med*. 2002; 251: 87–101. PMID: [11905595](#)
4. Chilelli NC, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a "glycooxidation-centric" point of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013; 23: 913–9. doi: [10.1016/j.numecd.2013.04.004](#) PMID: [23786818](#)
5. Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W, Malone J, Sivitz W, Monnier VM; DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial and Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 3103–11. PMID: [16249432](#)
6. Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2010; 3: 101–8. doi: [10.4161/oxim.3.2.11148](#) PMID: [20716934](#)
7. Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 13915–20. PMID: [9391127](#)
8. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PH, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, Thorpe SR, Baynes JW, Gans RO, Smit AJ. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* 2004; 47: 1324–30. doi: [10.1007/s00125-004-1451-2](#) PMID: [15243705](#)
9. Lutgers HL, Graaff R, Links TP, Ubink-Veltmaat LJ, Bilo HJ, Gans RO, Smit AJ. Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006; 29: 2654–9. doi: [10.2337/dc05-2173](#) PMID: [17130200](#)
10. Ueno H, Koyama H, Tanaka S, Fukumoto S, Shinohara K, Shoji T, Emoto M, Tahara H, Kakiya R, Tabata T, Miyata T, Nishizawa Y. Skin autofluorescence, a marker for advanced glycation end product accumulation, is associated with arterial stiffness in patients with end-stage renal disease. *Metabolism* 2008; 57: 1452–7. doi: [10.1016/j.metabol.2008.05.016](#) PMID: [18803952](#)
11. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, Thorpe SR, Baynes JW, Navis G, Gans RO, Smit AJ. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 3687–93. doi: [10.1681/ASN.2005020144](#) PMID: [16280473](#)
12. Yamagishi S, Fukami K, Matsui T. Evaluation of tissue accumulation levels of advanced glycation end products by skin autofluorescence: A novel marker of vascular complications in high-risk patients for cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 2015; 185: 263–8. doi: [10.1016/j.ijcard.2015.03.167](#) PMID: [25814214](#)
13. Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. The role of AGEs in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 979–86. PMID: [18473849](#)
14. Li L, Astor BC, Lewis J, Hu B, Appel LJ, Lipkowitz MS, Toto RD, Wang X, Wright JT Jr, Greene TH. Longitudinal progression trajectory of GFR among patients with CKD. *Am J Kidney Dis*. 2012; 59: 504–12. doi: [10.1053/j.ajkd.2011.12.009](#) PMID: [22284441](#)
15. Poulianiiti KP, Kaltsatou A, Mitrou GI, Jamurtas AZ, Koutedakis Y, Maridakis M, Stefanidis I, Sakkas GK, Karatzaferi C. Systemic redox imbalance in chronic kidney disease: a systematic review. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 8598253. doi: [10.1155/2016/8598253](#) PMID: [27563376](#)
16. Wang CC, Wang YC, Wang GJ, Shen MY, Chang YL, Liou SY, Chen HC, Chang CT. Skin Autofluorescence Is Associated with Endothelial Dysfunction in Uremic Subjects on Hemodialysis. *PLoS One*. 2016; 11: e0147771. doi: [10.1371/journal.pone.0147771](#) PMID: [26809145](#)
17. Raj DSC, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M. Advanced glycation end products: a nephrologist's perspective. *Am J Kid Dis*. 2000; 35: 365–80. PMID: [10692262](#)

18. Friedlander M, Wu Y, Elgawish A and Monnier V. Early and advanced glycosylation end products. Kinetics of formation and clearance in peritoneal dialysis. *J Clin Invest*. 1996; 97: 728–35. doi: [10.1172/JCI118471](https://doi.org/10.1172/JCI118471) PMID: [8609229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8609229/)
19. Miyata T, Ueda Y, Shinzato T, Iida Y, Tanaka S, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Maeda K. Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J Am Soc Nephrol*. 1996; 7: 1198–206. PMID: [8866413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8866413/)
20. Uribarri J, Peppas M, Cai W, Goldberg T, Lu M, He C, Vlassara H. Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14: 728–31. PMID: [12595509](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12595509/)
21. Weiner DE, Tighiouart H, Amin MG, Stark PC, MacLeod B, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, Sarnak MJ. Chronic kidney disease as a risk factor for cardiovascular disease and all-cause mortality: a pooled analysis of community-based studies. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 1307–1315. PMID: [15100371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15100371/)
22. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP; STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Lancet*. 2007; 370: 1453–7. doi: [10.1016/S0140-6736\(07\)61602-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61602-X) PMID: [18064739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18064739/)
23. Stevens PE, Levin A; Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med*. 2013; 158: 825–30. doi: [10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00007](https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00007) PMID: [23732715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23732715/)
24. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med*. 2009 May 5; 150(9):604–612. PMID: [19414839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19414839/)
25. Junyent M, Martínez M, Borràs M, Coll B, Valdivielso JM, Vidal T, Sarró F, Roig J, Craver L, Fernández E. Predicting cardiovascular disease morbidity and mortality in chronic kidney disease in Spain. The rationale and design of NEFRONA: a prospective, multicenter, observational cohort study. *BMC Nephrol*. 2010; 11: 14. doi: [10.1186/1471-2369-11-14](https://doi.org/10.1186/1471-2369-11-14) PMID: [20609210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20609210/)
26. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, Najjar SS, Rembold CM, Post WS; American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a Consensus Statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008; 21: 93–111. doi: [10.1016/j.echo.2007.11.011](https://doi.org/10.1016/j.echo.2007.11.011) PMID: [18261694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18261694/)
27. Schröder F, Diehm N, Kareem S, Ames M, Pira A, Zwettler U, Lawall H, Diehm C. A modified calculation of ankle-brachial pressure index is far more sensitive in the detection of peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2006; 44: 531–6. doi: [10.1016/j.jvs.2006.05.016](https://doi.org/10.1016/j.jvs.2006.05.016) PMID: [16950430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16950430/)
28. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Njølstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM; SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 2003; 24: 987–1003. PMID: [12788299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12788299/)
29. den Dekker MA, Zwiars M, van den Heuvel ER, de Vos LC, Smit AJ, Zeebregts CJ, Oudkerk M, Vliegenthart R, Lefrandt JD, Mulder DJ. Skin autofluorescence, a non-invasive marker for AGE accumulation, is associated with the degree of atherosclerosis. *PLoS One*. 2013; 8: e83084. doi: [10.1371/journal.pone.0083084](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083084) PMID: [24376641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24376641/)
30. Sakata N, Noma A, Yamamoto Y, Okamoto K, Meng J, Takebayashi S, Nagai R, Horiuchi S. Modification of elastin by pentosidine is associated with the calcification of aortic media in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 1601–9. PMID: [12897101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12897101/)
31. Lutgers HL, Graaff R, de Vries R, Smit AJ, Dullaart RP. Carotid artery intima media thickness associates with skin autofluorescence in non-diabetic subjects without clinically manifest cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest* 2010; 40: 812–7. doi: [10.1111/j.1365-2362.2010.02329.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02329.x) PMID: [20597962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20597962/)
32. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004; 351: 1296–305. doi: [10.1056/NEJMoa041031](https://doi.org/10.1056/NEJMoa041031) PMID: [15385656](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15385656/)
33. Rojas A, Morales MA. Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci*. 2004; 76: 715–30. doi: [10.1016/j.lfs.2004.09.011](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.011) PMID: [15581904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15581904/)
34. Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, Moore LL, Jean S, Brinck-Johnsen T, Bucala R, Vlassara H. 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. PMID: [7789650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7789650/)

35. Beisswenger PJ, Howell SK, Russell GB, Miller ME, Rich SS, Mauer M. Early progression of diabetic nephropathy correlates with methylglyoxal-derived advanced glycation end products. *Diabetes Care*. 2013; 36: 3234–9. doi: [10.2337/dc.12-2689](https://doi.org/10.2337/dc.12-2689) PMID: [23780945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23780945/)
36. Luo P, Peng H, Li C, Ye Z, Tang H, Tang Y, Chen C, Lou T. Advanced glycation end products induce glomerular endothelial cell hyperpermeability by upregulating matrix metalloproteinase activity. *Mol Med Rep*. 2015; 11: 4447–53. doi: [10.3892/mmr.2015.3269](https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3269) PMID: [25634678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25634678/)
37. Reiniger N, Lau K, McCalla D, Eby B, Cheng B, Lu Y, Qu W, Quadri N, Ananthakrishnan R, Furmansky M, Rosario R, Song F, Rai V, Weinberg A, Friedman R, Ramasamy R, D'Agati V, Schmidt AM. Deletion of the receptor for advanced glycation end products reduces glomerulosclerosis and preserves renal function in the diabetic OVE26 mouse. *Diabetes*. 2010; 59: 2043–54. doi: [10.2337/db09-1766](https://doi.org/10.2337/db09-1766) PMID: [20627935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20627935/)
38. Kajikawa M, Nakashima A, Fujimura N, Maruhashi T, Iwamoto Y, Iwamoto A, Matsumoto T, Oda N, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Goto C, Aibara Y, Noma K, Takeuchi M, Matsui T, Yamagishi S, Higashi Y. Ratio of serum levels of AGEs to soluble form of RAGE is a predictor of endothelial function. *Diabetes Care*. 2015; 38: 119–25. doi: [10.2337/dc14-1435](https://doi.org/10.2337/dc14-1435) PMID: [25336748](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25336748/)
39. Harvey A, Montezano AC, Touyz RM. Vascular biology of ageing—Implications in hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 83: 112–21. doi: [10.1016/j.yjmcc.2015.04.011](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.04.011) PMID: [25896391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25896391/)
40. Tiessen AH, Jager W, ter Bogt NC, Beltman FW, van der Meer K, Broer J, Smit AJ. Skin autofluorescence as proxy of tissue AGE accumulation is dissociated from SCORE cardiovascular risk score, and remains so after 3 years. *Clin Chem Lab Med*. 2014; 52: 121–7. doi: [10.1515/cclm-2012-0825](https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0825) PMID: [23612547](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23612547/)
41. Hunt KJ, Baker N, Cleary P, Backlund JY, Lyons T, Jenkins A, Virella G, Lopes-Virella MF; DCCT/EDIC Research Group. Oxidized LDL and AGE-LDL in circulating immune complexes strongly predict progression of carotid artery IMT in type 1 diabetes. *Atherosclerosis*. 2013; 231: 315–22. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.027](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.027) PMID: [24267245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24267245/)
42. Murphy D, McCulloch CE, Lin F, Banerjee T, Bragg-Gresham JL, Eberhardt MS, Morgenstern H, Pavkov ME, Saran R, Powe NR, Hsu CY; Centers for Disease Control and Prevention Chronic Kidney Disease Surveillance Team. Trends in Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *Ann Intern Med*. 2016 [Epub ahead of print]
43. Shahinian VB, Hedgeman E, Gillespie BW, Young EW, Robinson B, Hsu CY, Plantinga LC, Burrows NR, Eggers P, Saydah S, Powe NR, Saran R; CDC CKD Surveillance System. Estimating prevalence of CKD stages 3–5 using health system data. *Am J Kidney Dis*. 2013; 61: 930–8. doi: [10.1053/j.ajkd.2013.01.018](https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.01.018) PMID: [23489675](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23489675/)
44. Hanssen NM, Engelen L, Ferreira I, Scheijen JL, Huijberts MS, van Greevenbroek MM. Plasma levels of advanced glycation endproducts Nε-(carboxymethyl)lysine, Nε-(carboxyethyl)lysine, and pentosidine are not independently associated with cardiovascular disease in individuals with or without type 2 diabetes: the Hoorn and CODAM studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98: E1369–73. doi: [10.1210/jc.2013-1068](https://doi.org/10.1210/jc.2013-1068) PMID: [23780372](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23780372/)

CONTRIBUCIÓ CIENTÍFICA COM A PUBLICACIÓ

Sánchez E, Betriu À, Arroyo D, López-Cano C, Hernández M, Rius F, Fernández E, Lecube A. Skin autofluorescence and subclinical atherosclerosis in mild to moderate chronic kidney disease: a case-control study. Plos One. 2017; 12:e0170778. (ISSN: 1932-6203. United States).

Factor d'impacte: 3.057 (Q1)

CONTRIBUCIÓ CIENTÍFICA COM A COMUNICACIONS ORALS

López C, **Sánchez E**, Gutierrez L, Hernández M, Betriu À, Fernández E, Lecube A. Productos avanzados de la glicación en los estadios precoces de la enfermedad renal. En el XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Diabetes, Bilbao 2016.

Betriu À, **Sánchez E**, Arroyo D, Valdivielso JM, Abajo M, Lecube A, Fernández E. Envejecimiento vascular medido por autofluorescencia cutánea en pacientes con estadios iniciales de enfermedad renal. En el XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología, Oviedo 2016.

Arroyo A, **Sánchez E**, Betriu A, Vidal T, López C, Valdivielso JM, Maria V, Samsó E, Fernández E, Lecube A. Envelliment vascular mesurat per autofluorescència cutània en pacients amb estadis inicials de malaltia renal. En la XXXII Reunió anual de la Societat Catalana de Nefrologia, Barcelona 2016.

CONTRIBUCIÓ CIENTÍFICA COM A PÒSTER

Sánchez E, Betriu À, Fernández E, Rius F, Hernández M, Santos MD, Lecube L. Skin autofluorescence is associated with subclinical atherosclerotic plaque in early stages of chronic kidney disease. En el American Diabetes Association's 76th Scientific Sessions, New Orleans 2016.

3. Tercer Estudi: AGEs, diabetis mellitus tipus 2 i funció pulmonar.

Introducció: Els teixits rics en col·lagen i elastina, com ara el pulmó, poden ser objectiu de la glicació no enzimàtica. L'acumulació d'AGEs podria ser un dels mecanismes que col·laboraria en el deteriorament de la funció pulmonar descrit en la DM2. Per aquest motiu hem volgut avaluar la relació entre els AGEs i la funció pulmonar en una ampla població tenint en consideració la presència dels trastorns del metabolisme hidrocarbonat (prediabetis i DM2).

Material i Mètodes: Estudi transversal que inclou 1.830 subjectes provinents del Bus de la Salut: 660 (34,6%) amb prediabetis i 1.170 amb metabolisme normal de la glucosa. A més a més, es van incloure també 79 pacients amb DM2 provinents de les Consultes Externes del Servei d'Endocrinologia. No hi ha cap subjecte amb diagnòstic de patologia pulmonar. Tots els pacients disposaven de dades sobre la seva funció pulmonar, mitjançant una espirometria forçada, i de la mesura dels AGEs mitjançant la SAF.

Resultats: La SAF va ser significativament més alta en pacients amb DM2 que en els pacients amb prediabetis (2,5 [2,0-3,0] vs. 1,9 [1,7-2,2] AU, $p < 0,001$), i també que en aquells amb metabolisme normal de glucosa (1,9 [1,7-2,2], $p < 0,001$). Els subjectes amb una alteració ventilatoria (tant sigui patró no obstructiu com obstructiu) presentaven una SAF significativament major en comparació amb els subjectes amb funció pulmonar normal ($p < 0,001$). Quan tota la població de l'estudi va ser avaluada de forma conjunta es va observar una correlació positiva entre la SAF i l'edat, la xifra d'HbA1c, l'hàbit tabàquic i el filtrat glomerular. A més, també existeix una correlació negativa entre la SAF i paràmetres pulmonars com la capacitat vital forçada (CVF: $r = -0,114$, $p < 0,001$) i el volum expiratori forçat en el primer segon (VEMS: $r = -0,212$, $p < 0,001$). Aquesta darrera relació es va veure enfortida quan es van analitzar solsament els pacients amb DM2 (CVF: $r = -0,453$, $p < 0,001$; VEMS: $r = -0,393$, $p < 0,001$). A partir de l'anàlisi ROC, el millor punt de tall per discriminar la presència d'un VEMS $< 80\%$ del valor teòric va ser una SAF $\geq 2,05$ AU. Amb aquest punt de tall, el percentatge de individus amb un VEMS $< 80\%$ augmenta del 17,4% fins al 27,6% ($p < 0,001$). Finalment, l'anàlisi de regressió multivariant va mostrar que la SAF (juntament amb el gènere, el IMC, l'hàbit tabàquic i l'HbA1c) predia de manera independent tant la CVF ($R^2 = 0,122$, $\beta = -0,076$) com el VEMS ($R^2 = 0,121$, $\beta = -0,102$).

Conclusions: Aquesta és la primera evidència clínica que correlaciona els AGEs amb una disminució dels valors espiromètrics en subjectes sense patologia pulmonar de base. Aquesta associació va ser més forta en el subgrup de pacients amb DM2. Els nostres resultats suggereixen que l'acumulació d'AGEs en el parènquima pulmonar i la paret toràctica pot ser afegit com un dels mecanismes implicats en l'efecte perjudicial que la DM2 exerceix sobre la funció pulmonar.

Accepted Manuscript



Title: Subcutaneous advanced glycation end-products and lung function according to glucose abnormalities: The ILERVAS Project

Authors: Enric Sánchez Albert Lecube Àngels Betriu Cristina Hernández Carolina López-Cano Liliana Gutiérrez-Carrasquilla Mohsen Kerkeni Andree Yeramian Francesc Purroy Reinald Pamplona Cristina Farràs Elvira Fernández Ferrán Barbé Rafael Simó, on behalf of the ILERVAS project

PII: S1262-3636(18)30079-X
DOI: <https://doi.org/doi:10.1016/j.diabet.2018.04.002>
Reference: DIABET 1002

To appear in: *Diabetes & Metabolism*

Received date: 14-3-2018
Accepted date: 10-4-2018

Please cite this article as: Sánchez E, Lecube A, Betriu À, Hernández C, López-Cano C, Gutiérrez-Carrasquilla L, Kerkeni M, Yeramian A, Purroy F, Pamplona R, Farràs C, Fernández E, Barbé F, Simó R, on behalf of the ILERVAS project, Subcutaneous advanced glycation end-products and lung function according to glucose abnormalities: The ILERVAS Project, *Diabetes and Metabolism* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2018.04.002>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Subcutaneous advanced glycation end-products and lung function according to glucose abnormalities: The ILERVAS Project

Enric Sánchez ^{1*}, Albert Lecube ^{1,2*}, Àngels Betriu ³, Cristina Hernández ^{2,4}, Carolina López-Cano ¹, Lilianna Gutiérrez-Carrasquilla ¹, Mohsen Kerkeni ⁵, Andree Yeramian ¹, Francesc Purroy ⁶, Reinald Pamplona ⁷, Cristina Farràs ⁸, Elvira Fernández ³, Ferrán Barbé ^{9,10}, and Rafael Simó ^{2,4} on behalf of the ILERVAS project

* E.S. and A.L. contributed equally to this work.

ILERVAS Project: Marta Hernández ^{1,2}, Ferran Rius ^{1,2}, Dinora Polanco ⁹, Manuel Sánchez de la Torre ^{9,10}, Gerard Torres ^{9,10}, Pere Godoy ^{9,10}, Manuel Portero-Otin ⁷, Marióna Jové ⁷, Laura Colàs-Compàs ⁶, Ikram Benabdelhak ⁶, Eva Miquel ⁸, Marta Ortega ⁸, José Manuel Valdivielso ³, Marcelino Beramúdez ³, Montse Martínez-Alonso ³

¹ Endocrinology and Nutrition Department, University Hospital Arnau de Vilanova Obesity, Diabetes and Metabolism research group, IRBLLeida, University of Lleida, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

³ Unit for the Detection and Treatment of Atherothrombotic Diseases (UDETMA V&R), University Hospital Arnau de Vilanova Vascular and Renal Translational Research Group, IRBLLeida, University of Lleida, Spain

⁴ Endocrinology and Nutrition Department, University Hospital Vall d'Hebron Diabetes and Metabolism Research Unit, VHIR, Autonomous University of Barcelona, Spain

⁵ Higher Institute of Biotechnology, Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Monastir, Monastir, Tunisia

⁶ Stroke Unit, University Hospital Arnau de Vilanova Clinical Neurosciences Group, IRBLLeida, University of Lleida, Spain

⁷ Metabolic Pathophysiology Group, IRBLLeida, University of Lleida, Spain

⁸ Borges Blanques Primary Health Care Unit, Spain

⁹ Respiratory Department, University Hospital Arnau de Vilanova-Santa María Translational Research in Respiratory Medicine, IRBLLeida, University of Lleida, University Hospital Arnau de Vilanova, Spain

¹⁰ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

Received 14 March 2018; Accepted 10 April 2018

Corresponding authors:

Albert Lecube M.D., Ph.D
Endocrinology and Nutrition Department
Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida
Avda Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain
Tel: +34 973 70 51 83; Fax: +34 973 70 51 89
Email: alecube@gmail.com

Rafael Simó M.D., Ph.D
Endocrinology and Nutrition Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron Diabetes and Metabolism Research Unit, Vall d'Hebron Institut de Recerca
Pg Vall d'Hebron 119-129, 08024 Barcelona, Spain
Tel: +34 93; Fax: +34 93
Email: rafael.simo@vhebron.net

Keywords: Advanced glycation end-products; Pulmonary function; Skin autofluorescence; Spirometry; Type 2 diabetes

The lung is not usually included in the list of organs that might be affected by type 2 diabetes (T2D). However, its abundance of collagen and elastin fibres, crucial proteins in the extracellular matrix, together with its vascularization reach, make the lung parenchyma a potential target for chronic hyperglycaemia [1]. Indeed, cross-sectional studies conducted during the past few decades have shown that adults with T2D have lower forced vital capacity (FVC) and forced expiratory volume in the first second (FEV1) than adults without T2D [2]. A few pathophysiological mechanisms have also been well documented, including insulin and leptin resistance, low-grade chronic inflammatory status, microvascular lung damage and autonomic neuropathy [1].

However, little is known of the potential relationship between advanced glycation end-products (AGEs) and lung function, and what scarce information there is has been focused on patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), in which higher skin AGE deposition and plasma AGE concentrations have been reported [3]. Yet, the relationship between AGEs and pulmonary function, taking into account the presence of glucose abnormalities, has not been previously examined. For this reason, skin AGE accumulation and spirometric manoeuvres were assessed in a large population with no known pulmonary disease according to the presence of glucose abnormalities.

Both our control and prediabetes populations were recruited from a total of 1924 Caucasian subjects enrolled between July 2015 and May 2017 into the ILERVAS project (ClinTrials.gov Identifier: NCT03228459). This ongoing randomized interventional study is concerned with early diagnosis of subclinical vascular and 'hidden' kidney diseases [4]. Inclusion criteria were: age between 45–70 years; no history of cardiovascular disease or T2D; and at least one cardiovascular risk factor (obesity, hypertension, dyslipidaemia, smoking or first-degree relative with premature cardiovascular disease). Exclusion criteria were: COPD; T2D; chronic kidney disease; active neoplasia; life expectancy < 18 months; pregnancy; and darker skin colour (Fitzpatrick scale types > 5). Smokers who had stopped smoking ≥ 1 year prior to recruitment were considered former smokers. Prediabetes was diagnosed in 34.6% (n = 660) of subjects according to American Diabetes Association criteria [glycosylated haemoglobin (HbA1c): 39–47 mmol/mol or 5.7–6.4%]. Also, 79 age-matched T2D patients

were recruited from the outpatients diabetic clinic of University Hospital Arnau de Vilanova in July 2017. Informed consent was obtained from all participants, and the protocol was approved by the Arnau de Vilanova University Hospital ethics committee.

Anthropometric data were obtained by standardized protocols. Glycosylated haemoglobin was determined using the cobas b 101[®] system (Roche Diagnostics International, Rotkreuz, Switzerland). Dry samples of capillary blood were used for analyses of values of total cholesterol and serum creatinine.

Forced spirometry was performed using a portable ultrasonic spirometer (Sibelmed DATOSPIR, Sibel S.A., Barcelona, Spain). Subjects were required to have at least three reproducible measurements, and the output with the highest total FEV1 and FVC scores was used for analyses. Various spirometric parameters were measured as a percentage of predicted values. 'Normal' FEV1 was defined as a value $\geq 80\%$ of that predicted, a 'non-obstructive ventilatory defect' as an FVC < 80% of predicted value with an FEV1/FVC ratio $\geq 70\%$, and an 'obstructive ventilatory defect' as an FEV1/FVC ratio < 70%, as per criteria of the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD).

Skin autofluorescence (AF) was measured on the left forearm using the AGE Reader[™] (DiagnOptics, Groningen, Netherlands), a fully automated, non-invasive, non-operator-dependent desktop device that uses ultraviolet A (UVA) spectrum wavelengths. The mean AF value of three readings, expressed in arbitrary units (AU), was recorded. The same device was used for measurements in all participants.

Normally distributed variables were evaluated using the Shapiro–Wilk test. Given their skewed distribution, quantitative data were expressed as medians (interquartile range, IQR). Comparisons between groups were made using the Mann–Whitney U test or Pearson's chi-squared test, and the relationship between continuous variables was assessed by Spearman's correlation test.

Accuracy of skin AF as a measurement of interest to discriminate patients with FEV1 scores $\leq 80\%$ of predicted from normal cases was evaluated using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis and a complete sensitivity/specificity report. In addition, comparisons between area under the ROC (AUROC) of skin AF and HbA1c were performed using the Hanley and McNeil test.

Stepwise multivariate regression analysis explored the variables independently associated with FVC and FEV1, including age, gender, body mass index (BMI), tobacco use (number of pack-years), HbA1c and skin AF. Statistical significance was accepted at the level of $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, version 20.0, software (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

The main clinical characteristics of the study population are shown in Table I. Skin AF was significantly higher in patients with T2D than in those with either prediabetes [2.5 (2.0–3.0) vs 1.9 (1.7–2.2) AU; $P < 0.001$] or no glucose abnormalities [1.9 (1.7–2.2) AU; $P < 0.001$]. No differences in skin AF levels were observed between the latter two groups. In addition, patients with T2D showed significantly lower FEV1 and FVC scores, and a greater prevalence of FEV1 scores $< 80\%$ than either prediabetes or non-diabetes subjects (Table S1; see supplementary materials associated with this article online). Those with prediabetes showed significantly lower FVC scores than those with no glucose abnormalities ($P = 0.046$).

When skin AGE deposition was evaluated according to ventilatory pattern, patients with respiratory (non-obstructive or obstructive) defects exhibited significantly increased skin AF in comparison to subjects with normal pulmonary function (all $P < 0.001$). When the entire study population was evaluated, positive correlations were found between skin AF and age, HbA1c, tobacco packs/year and estimated glomerular filtration rate (eGFR) on univariate analysis (Table S2; see supplementary materials associated with this article online). In addition, a significant but negative correlation between skin AF and pulmonary parameters, such as FVC ($r = -0.114$, $P < 0.001$) and FEV1 ($r = -0.212$, $P < 0.001$), was observed. Moreover, these correlations became even stronger when only T2D patients were analyzed (FVC: $r = -0.453$, $P < 0.001$; FEV1: $r = -0.393$, $P < 0.001$).

ROC analysis revealed that the optimal cut-off point for skin AF was 2.05 AU: at this point, the AUROC was 0.614 (0.582–0.646), with a sensitivity of 53.5% and specificity of 63.3% (Fig. 1). The percentage of subjects with FEV1 $< 80\%$ increased from 17.4% in those with skin AF < 2.05 AU to 27.6% in those with skin AF ≥ 2.05 AU ($P < 0.001$). These data indicate a twofold greater risk of having an abnormal FEV1 (mean difference: 1.9, 95% CI: 1.5–2.3; $P < 0.001$) compared with subjects with lower skin AF values. In addition, skin AF significantly improved the AUROC curve obtained with HbA1c measurement [0.614

(0.582–0.646) vs 0.555 (0.521–0.589); $P = 0.014$]. Furthermore, stepwise multivariate regression analysis revealed that skin AF (along with gender, BMI, tobacco use and HbA1c) was independently associated with predicted measures of FEV1 ($R^2 = 0.121$) and FVC ($R^2 = 0.122$) (Table S3; see supplementary materials associated with this article online).

To the best of our knowledge, this is the first-ever study of subjects without pulmonary disease to demonstrate that skin AGE deposition is related to a decrease in spirometric values and a larger percentage of abnormal ventilatory patterns. In addition, this negative association was more aggravated among patients with T2D.

AGE formation increases with age and is accelerated by chronic hyperglycaemia, chronic inflammation and oxidative stress [5]. Skin AF is also associated with several clinical variables (for example, age, creatinine clearance), lifestyle factors (smoking status, coffee consumption), and genetic polymorphisms [6]. Our present data from a large population are in concordance with those findings. As AGEs are mainly irreversibly linked to tissue proteins, its accumulation is greater with slow turnover rates, as seen in subcutaneous tissue, lens and cartilage [5,6].

Similar to other cross-sectional studies, our present study has shown how patients with T2D exhibit a 13% decrease in FEV1 and 14% decrease in FVC of a theoretical value compared with non-diabetes subjects [1, 2]. On this basis, it has been suggested that non-enzymatic glycosylation of pulmonary parenchymal proteins and chest wall cartilage may favour the development of less-compliant lung parenchyma and, thus, limit chest mobility, an underlying factor in the restrictive respiratory pattern described in T2D [1]. Our results, with skin AF as an independent risk factor for spirometric values, support the potentially deleterious impact of AGEs on pulmonary function.

The role of AGEs in the genesis and rapid progression of both macro- and microvascular chronic T2D complications has been suggested previously [7]. Likewise, descriptions of messenger RNA (mRNA) expression of AGE receptor (RAGE) by type-II alveolar epithelial cells are worthy of attention [8]. Indeed, AGE–RAGE interactions in the lungs might trigger pathophysiological cascades, leading to impaired pulmonary function through lung endothelial cell

dysfunction, proinflammatory effects and cell apoptosis [8]. It is also worth mentioning that our data revealed that prediabetes has a negative impact on FVC in comparison to subjects with normal glucose metabolism but similar skin AF. This finding suggests that mechanisms (such as insulin resistance) other than AGE accumulation might be playing a primary role in initiating the lung impairment seen in T2D.

The involvement of AGEs in patients with COPD has also been previously evaluated, and skin AF was significantly higher in 202 patients with mild-to-very-severe COPD compared with 193 old and young healthy controls [3]. Similar results were also observed in a smaller group of patients, with skin AF proving to be a negative determinant of FEV1 even after adjusting for age, gender and pack-years of smoking [9]. In fact, our present study demonstrates that the negative correlation between skin AF and pulmonary function is not restricted to COPD, as the association was stronger among patients with T2D than in non-diabetes subjects.

Nevertheless, our study has a few limitations. First, it would have been of interest to compare skin AF data with plasma AGE concentrations. Second, as skin AF mainly provides information on AGEs linked to fluorescent proteins, the role of other compounds was not evaluated and, third, the cross-sectional nature of the study does not permit causality to be established.

In conclusion, the present study has provided the first clinical evidence that, in people with no known pulmonary disease, AGEs, as measured by skin AF, are correlated with a decline in spirometric values. The link was even stronger among patients with T2D, suggesting that the accumulation of AGEs in lung parenchyma and the chest wall may now be added to the mechanisms involved in the deleterious effects of T2D on lung function.

Disclosure: The authors report no conflicts of interest in this work.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Lleida Provincial Council, Renal Foundation Jaume Amó, ISCIII (PI 12/00803 and PI 15/00260) and European Union [European Regional Development Fund (Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Una manera de hacer Europa)]. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas and CIBER de Enfermedades Respiratorias are initiatives of the Instituto Carlos III. These funders had no role in the study design, data collection or analysis, the decision to publish or preparation of the manuscript. Also, the authors would like to thank Eva Castro, Virtudes María, Teresa Molí, Teresa Vidal, Cristina Dominguez, Marta Elias, Núria Sans and Meritxell Soria for their efforts in the accurate development of the ILERVAS project.

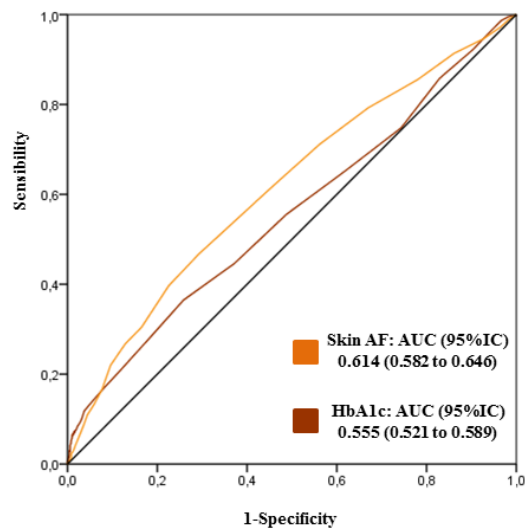
Appendix supplementary material

Supplementary materials (Tables S1–S3) associated with this article can be found at <http://www.sciencedirect.com> at doi . . .

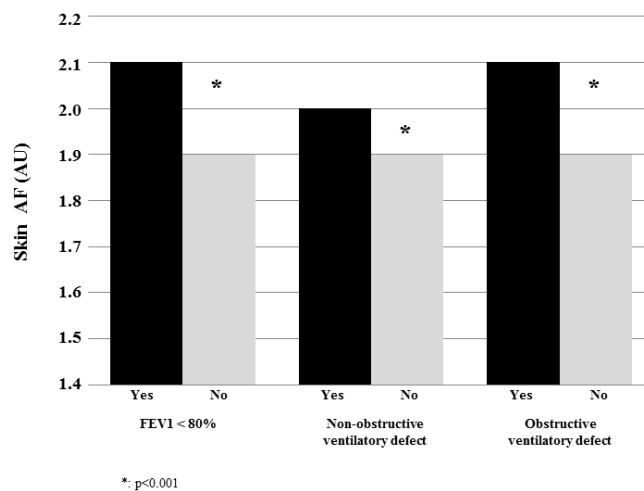
Figure legend

Fig. 1. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to evaluate the accuracy of HbA1c and skin autofluorescence (AF) as a measurement of interest to discriminate between disease cases [patients with forced expiratory volume in the first second (FEV1) < 80% of predicted value] and normal cases, together with a sensitivity/specificity report for the entire study population. Total area under the ROC curve value was interpreted as: 0.9–1.0, excellent; 0.8–0.9, good; 0.7–0.8, fair; 0.6–0.7, poor; and 0.5–0.6, not useful.

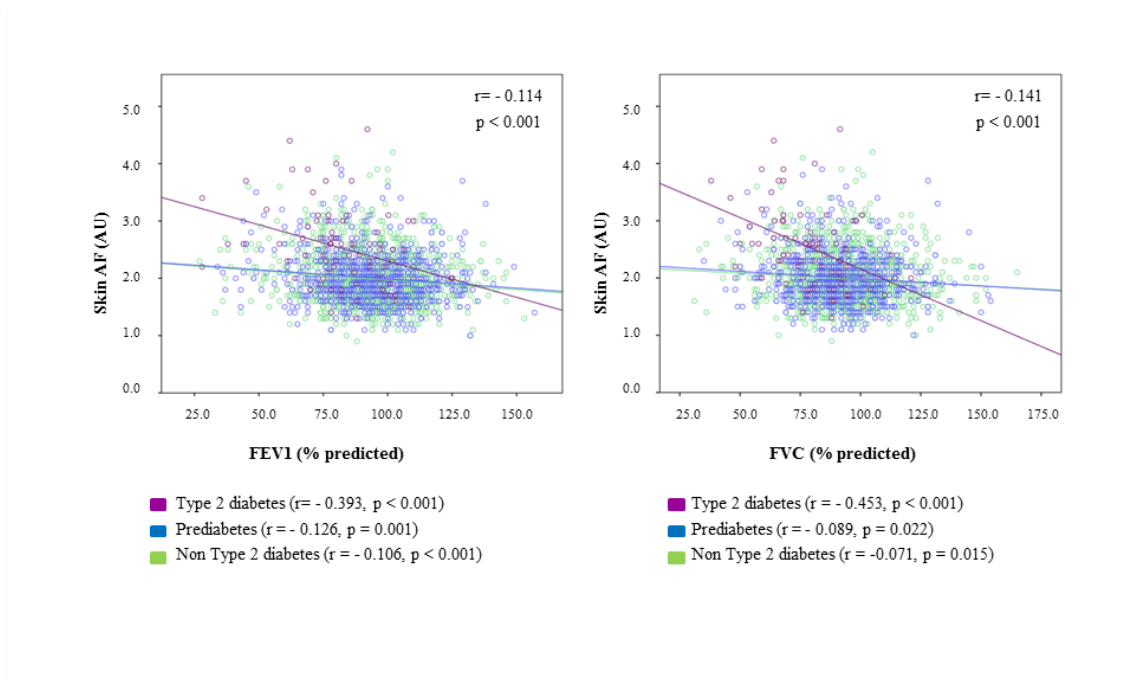
Figure 1. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis to evaluate the accuracy of HbA1c and skin AF as a measurement of interest to discriminate diseased cases (patients with forced expiratory volume in the first second lower than 80% of predicted) from normal cases, together with a sensitivity / specificity report for the entire population.



Supplemental Figure 1. Comparison of skin AF between different respiratory patterns among all subjects included in the study.



Supplemental Figure S2. Scatter plot showing the linear correlation between skin AF and pulmonary parameters according to glucose abnormalities.



ACCEPTED MANUSCRIPT

References

1. Lecube A, Simó R, Pallayova M, Punjabi NM, López-Cano C, Turino C, et al. Pulmonary function and sleep breathing: two new targets for type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2017; 38: 550-73.
2. van den Borst B, Gosker HR, Zeegers MP, Schols AMWJ. Pulmonary function in diabetes. A metaanalysis. *Chest* 2010; 138: 393-406.
3. Hoonhorst SJ, Lo Tam Loi AT, Hartman JE, Telenga ED, van den Berge M, Koenderman L et al. Advanced glycation end products in the skin are enhanced in COPD. *Metabolism* 2014; 63:1149-56.
4. Betriu À, Farràs C, Abajo M, Martínez-Alonso M, Arroyo D, Barbe F et. al. Randomised intervention study to assess the prevalence of subclinical vascular disease and hidden kidney disease and its impact on morbidity and mortality: The ILERVAS project. *Nefrologia* 2016; 36: 389-96.
5. Ajith TA, Vinodkumar P. Advanced glycation end products: association with the pathogenesis of diseases and the current therapeutic approaches. *Curr Clin Pharmacol* 2016; 11: 118-27.
6. van Waateringe RP, Slagter SN, van der Klauw MM, van Vliet-Ostapchouk JV, Graaff R, Paterson AD, et al. Lifestyle and clinical determinants of skin autofluorescence in a population-based cohort study. *Eur J Clin Invest* 2016; 46:481-90.
7. Bentata R, Cougnard-Grégoire A, Delyfer MN, Delcourt C, Blanco L, Pupier E, et al. Skin autofluorescence, renal insufficiency and retinopathy in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 2017; 31: 619-23.
8. Ota C, Ishizawa K, Yamada M, Tando Y, He M, Takahashi T, et al. Receptor for advanced glycation end products expressed on alveolar epithelial cells is the main target for hyperoxia-induced lung injury. *Respir Investig* 2016; 54: 98-108.

9. Hoonhorst SJ, Lo Tam Loi AT, Pouwels SD, Faiz A, Telenga ED, van den Berge M. Advanced glycation end-products and their receptor in different body compartments in COPD. *Respir Res* 2016; 17: 46.

Table I. Main clinical characteristics, metabolic data, pulmonary function and breathing pattern parameters in the study population according to glucose abnormalities

	T2D patients	Prediabetes	Non-T2D patients
n	79	660	1170
Women, n (%)	39 (49.4)	393 (59.5)	567 (48.5)
Age (years)	61 (55–65)	59 (54–64)	57 (52–62)
Known T2D duration (years)	12 (8–15)	–	–
Body mass index (kg/m ²)	30.8 (27.8–35.6)	29.6 (26.9–33.2)	28.1 (25.3–31.4)
Current smoker, n (%)	18 (22.7)	155 (23.4)	387 (33.0)
Tobacco (n, pack-years)	21.0 (15.0–42.8)	20.9 (10.1–34.8)	20.5 (9.0–32.0)
HbA1c (%)	8.4 (6.7–9.6)	5.8 (5.7–6.0)	5.4 (5.2–5.5)
HbA1c (mmol/mol)	67 (50–81)	40 (39–42)	36 (33–37)
Total cholesterol (mg/dL)	185 (159–213)	203 (182–229)	201 (180–227)
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	90.0 (74.7–94.9)	95.8 (85.9–101.9)	97.1 (87.7–103.3)
Skin autofluorescence (AU)	2.5 (2.0–3.0)	1.9 (1.7–2.2)	1.9 (1.7–2.2)

Data are expressed as medians (IQR) or as n (%);

T2D: type 2 diabetes; eGFR: estimated glomerular filtration rate by Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation

Table S1. Main pulmonary function parameters and breathing patterns in the study population according to glucose abnormalities (GAs)

	T2D patients	With GAs	Without GAs	P*	P**
n	79	660	1170	–	–
FEV1 (% predicted)	82 (74–97)	93 (82–106)	95 (83–106)	< 0.001	< 0.001
FVC (% predicted)	80 (68–91)	92 (81–103)	94 (83–103)	< 0.001	< 0.001
FEV1/FVC	82 (74–85)	79 (75–83)	79 (74–83)	0.061	0.020
FEV1 < 80% predicted, n (%)	35 (44.3)	135 (20.5)	211 (18.0)	< 0.001	< 0.001
Non-obstructive ventilatory defect, ^a n (%)	32 (40.5)	127 (19.2)	186 (15.9)	< 0.001	< 0.001
Obstructive ventilatory pattern, ^a n (%)	11 (13.9)	74 (11.2)	129 (11.0)	0.475	0.429

Data are expressed as medians (IQR) or as n (%);

* T2D vs prediabetes; ** T2D vs normal glucose metabolism;

T2D: type 2 diabetes; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in the first second; ^a as per Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)

Table S2. Correlation of skin autofluorescence (AF) with clinical characteristics, metabolic data and pulmonary parameters

	Skin AF	
	<i>r</i>	<i>P</i>
Age (years)	0.232	< 0.001
T2D duration (years)	-0.120	0.423
Body mass index (kg/m ²)	-0.004	0.854
Tobacco use (n, pack-years)	0.277	< 0.001
HbA1c (% or mmol/mol)	0.086	< 0.001
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.156	< 0.001
FEV1 (% predicted)	-0.212	< 0.001
FVC (% predicted)	-0.114	< 0.001
FEV1/FVC	-0.103	< 0.001

T2D: type 2 diabetes; HbA1c: glycosylated haemoglobin; eGFR: estimated glomerular filtration rate by Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in the first second

Table S3. Stepwise multivariate regression analysis of variables associated with forced vital capacity (FVC) and forced expiratory volume in the first second (FEV1)

		β	B (95% CI)	<i>P</i>
FEV ₁ (% predicted)	Gender (male/female)	0.139	4.944 (2.968 to 6.950)	< 0.001
	HbA1c (%)	-0.092	-2.675 (-4.295 to -1.056)	0.001
	Skin autofluorescence (AU)	-0.102	-3.739 (-5.875 to -1.602)	0.001
	Body mass index (kg/m ²)	-0.116	-0.400 (-0.591 to -0.209)	< 0.001
	Tobacco use (n, packs-year)	-0.200	-0.195 (-0.252 to -0.138)	< 0.001
	Age (years)	-0.027	–	0.356
	R² = 0.121	<i>Constant</i>	–	–
FVC (% predicted)	Gender (male/female)	0.180	6.231 (4.276 to 8.187)	< 0.001
	Skin autofluorescence (AU)	-0.076	-2.741 (-4.823 to -0.659)	0.010
	HbA1c (%)	-0.103	-2.923 (-4.501 to -1.344)	< 0.001
	Tobacco use (n, packs-year)	-0.117	-0.111 (-0.166 to -0.056)	< 0.001
	Body mass index (kg/m ²)	-0.187	-0.630 (-0.816 to -0.443)	< 0.001
	Age (years)	-0.054	–	0.061
	R² = 0.122	<i>Constant</i>	–	–

HbA1c: glycosylated haemoglobin

CONTRIBUCIÓ CIENTÍFICA COM A PUBLICACIÓ

Sánchez E, Lecube A, Betriu À, Hernández C, López-Cano C, Gutiérrez-Carrasquilla L, Kerkeni M, Yeramian A, Purroy F, Pamplona R, Farràs C, Fernández E, Barbé F and Simó R on behalf of the ILERVAS project. Subcutaneous advanced glycation end-products and lung function according to glucose abnormalities: The ILERVAS Project. *Diabetes Metab.* 2018 [Epub ahead of print] (ISSN: 1262-3636. France).

Factor d'impacte: 4.101

CONTRIBUCIÓ CIENTÍFICA COM A COMUNICACIONS ORALS

Santos MD, **Sánchez E**, Seminario A, Gutiérrez L, López C, Turino C, Betriu À, Lecube A. Mecanismos implicados en la lesión pulmonar en la diabetes mellitus tipo 2: productos finales de glicación avanzada. En el 58 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición, Málaga 2016.

Sánchez E, Betriu À, Gutiérrez L, Elías M, Barbé F, Portero M, Purroy F, Buti M, Fernández E, Lecube A. Mecanismes implicats en la lesió pulmonar a la diabetis tipus 2: productes finals de glicació avançada. En el 19è Congrés de la Societat Catalana d'Endocrinologia i Nutrició, Barcelona 2016.

Lecube A, Betriu À, Elías M, Barbé F, Purroy F, Fernández E, **Sánchez E**. Relación entre la autofluorescencia de la piel y la función pulmonar en la diabetes tipo 2. En el XXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Diabetes, Barcelona 2017.

Gutiérrez L, Betriu À, **Sánchez E**, Elías M, Barbé F, Portero M, Purroy F, Carmona P, Fernández E, Lecube A. Els productes finals de glicació avançada i la funció pulmonar en la diabetis mellitus tipus 2: dades finals del projecte ILERVAS. En el 20è Congrés de la Societat Catalana d'Endocrinologia i Nutrició, Barcelona 2017.

CONTRIBUCIÓ CIENTÍFICA COM A PÓSTER

Sánchez E, Betriu À, Gutiérrez L, Elías M, Barbé F, Portero M, Purroy F, Buti M, Fernández E, López-Cano C, Lecube A. Skin autofluorescence and pulmonary function in type 2 diabetes. En el American Diabetes Association's 77th Scientific Sessions, San Diego 2017.

4. Quart Estudi: AGEs i obesitat mòrbida

Introducció: Els AGEs han estat proposats com un indicador de memòria metabòlica. La seva concentració s'incrementa en la hiperglucèmia crònica, però també en situacions on existeix estrès oxidatiu i inflamació. S'ha descrit una correlació entre els AGEs i tant el perímetre de cintura com el IMC en subjectes amb DM2 i MRC. Però no s'ha avaluat la influència de l'obesitat mòrbida sobre els nivells d'AGEs. I tampoc l'efecte de la cirurgia bariàtrica, tant a nivell ponderal com metabòlic, sobre la seva concentració.

Material i mètodes: Es tracta d'un estudi observacional amb tres cohorts equiparades per edat i sexe: 52 pacients en protocol de cirurgia bariàtrica, 46 pacients que han estat sotmesos a cirurgia bariàtrica en els darrers 5 anys, i 47 pacients controls no obesos (IMC <30 kg/m²). Es van mesurar la SAF mitjançant el AGE Reader, un dispositiu no invasiu que mesura l'acumulació dels AGEs a l'avantbraç.

Resultats: Els pacients obesos, tant abans com després de la cirurgia, mostren un increment significatiu de la SAF en comparació amb la població no obesa (2,14±0,65, 2,18±0,40 i 1,81±0,22 unitats arbitràries; p<0,001 per a ambdues comparacions). Aquest increment de la SAF en la població obesa va ser a costa d'aquells subjectes amb síndrome metabòlica (2,44 ± 0,67 vs. 1,86 ± 0,51 AU, p=0,001). Quan tota la població va ser avaluada de forma conjunta (n=145) no es va observar cap correlació entre la SAF i el IMC (r=0,089, p=0,288), però sí amb l'edat (r=0,451, p<0,001), la glucèmia basal en dejú (r=0,295, p<0,001) i l'HbA1c (r=0,496, p<0,001). D'altra banda, l'estudi de regressió lineal múltiple pas a pas va posar de manifest que l'edat i la presència de síndrome metabòlica (però no el sexe ni el IMC) podien predir de forma independent la SAF (R²=0,320). Quan la síndrome metabòlica va ser substituïda pels seus components, van ser l'edat i la DM2 (però no el sexe, el IMC, la hipertensió arterial ni la dislipèmia) les variables associades de forma independent amb la SAF. Finalment, en els pacients obesos sotmesos a CB, la concentració dels AGEs no es va mantenir estable durant els següents 5 anys, tot i la marcada pèrdua de pes i la disminució en la prevalença de DM2.

Conclusió: L'increment en la concentració d'AGEs en la població obesa candidata a cirurgia bariàtrica és a costa d'aquells amb alteracions metabòliques. Per això, la seva determinació és una forma senzilla d'identificar als subjectes amb obesitat mòrbida "metabòlicament sans". No obstant això, el decalatge observat entre la pèrdua ponderal i la resolució de les comorbiditats metabòliques després de la cirurgia, i el descens dels AGEs (que es mantenen estables després de 5 anys), fa que la "memòria metabòlica" dels AGEs deixi de ser útil en aquest període.



ORIGINAL

Productos finales de glicación avanzada en la obesidad mórbida y tras la cirugía bariátrica: cuando la memoria glucémica empieza a fallar



Enric Sánchez^a, Juan Antonio Baena-Fustegueras^b, María Cruz de la Fuente^b,
Liliana Gutiérrez^a, Marta Bueno^a, Susana Ros^b y Albert Lecube^{a,c,*}

^a Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Institut de Recerca Biomèdica (IRB) de Lleida, Universitat de Lleida, Lleida, España

^b Departamento de Cirugía General, Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Institut de Recerca Biomèdica (IRB) de Lleida, Universitat de Lleida, Lleida, España

^c CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, España

Recibido el 9 de mayo de 2016; aceptado el 19 de septiembre de 2016

Disponible en Internet el 18 de enero de 2017

PALABRAS CLAVE

Productos finales de glicación avanzada;
Obesidad mórbida;
Síndrome metabólico;
Cirugía bariátrica

Resumen

Antecedentes y objetivo: Los productos finales de glicación avanzada (AGE) son un indicador de memoria metabólica. Su concentración se incrementa cuando existe estrés oxidativo, inflamación o hiperglucemia crónica. Se desconoce el papel de la obesidad mórbida en su concentración, así como la influencia que la cirugía bariátrica ejerce sobre ellos.

Pacientes y método: Estudio observacional con 3 cohortes equiparadas por sexo y edad: 52 pacientes con obesidad, 46 sometidos a cirugía bariátrica en los últimos 5 años y 46 sujetos control. La determinación de los AGE se realizó mediante autofluorescencia cutánea (SAF) del antebrazo con un AGE Reader™ (DiagnOptics Technologies, Groningen, Países Bajos). Se evaluó la presencia de síndrome metabólico.

Resultados: Los sujetos con obesidad mórbida presentaron una SAF ($2,14 \pm 0,65$ AU) superior a la de la población no obesa ($1,81 \pm 0,22$ AU; $p < 0,001$). Este incremento fue a expensas de aquellos sujetos obesos con síndrome metabólico ($2,44 \pm 0,67$ vs. $1,86 \pm 0,51$ AU; $p < 0,001$). Tras la cirugía bariátrica, la SAF se mantuvo elevada ($2,18 \pm 0,40$ AU) y superior a la de la población no obesa ($p < 0,001$). El análisis multivariante mostró que la edad y la presencia de síndrome metabólico (pero no el sexo, ni el índice de masa corporal) se asociaron independientemente con la SAF ($R^2 = 0,320$).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: alecube@gmail.com (A. Lecube).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.endinu.2016.09.009>

2530-0164/© 2016 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Advanced glycation end-products;
Morbid obesity;
Metabolic syndrome;
Bariatric surgery

Conclusiones: En la obesidad mórbida acompañada de síndrome metabólico existe un incremento de la SAF, a expensas principalmente de la presencia de diabetes tipo 2. En los primeros 5 años tras la cirugía, la pérdida ponderal y la mejoría metabólica no se acompañan de un descenso paralelo de la concentración tisular de AGE.

© 2016 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Advanced glycation end-products in morbid obesity and after bariatric surgery: When glycemic memory starts to fail

Abstract

Background and objective: Advanced glycation end-products (AGEs) are a marker of metabolic memory. Their levels increase when oxidative stress, inflammation, or chronic hyperglycemia exists. The role of morbid obesity in AGE levels, and the impact of bariatric surgery on them are unknown.

Patients and method: An observational study with three sex- and age-matched cohorts: 52 patients with obesity, 46 patients undergoing bariatric surgery in the last 5 years, and 46 control subjects. AGE were measured using skin autofluorescence (SAF) in the forearm with an AGE Reader™ (DiagnOptics Technologies, Groningen, The Netherlands). Presence of metabolic syndrome was assessed.

Results: Patients with morbid obesity had higher SAF levels (2.14 ± 0.65 AU) than non-obese subjects (1.81 ± 0.22 AU; $P < .001$), which was mainly attributed to obese subjects with metabolic syndrome (2.44 ± 0.67 vs. 1.86 ± 0.51 AU; $P < .001$). After bariatric surgery, SAF continued to be high (2.18 ± 0.40 AU), and greater as compared to the non-obese population ($P < .001$). A multivariate analysis showed that age and presence of metabolic syndrome (but not sex or body mass index) were independently associated to SAF ($R^2 = 0.320$).

Conclusion: SAF is increased in patients with morbid obesity and metabolic syndrome, mainly because of the existence of type 2 diabetes mellitus. In the first 5 years following bariatric surgery, weight loss and metabolic improvement are not associated with a parallel decrease in subcutaneous AGE levels.

© 2016 SEEN. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Los productos finales de glicación avanzada (AGE, del inglés *advanced glycation end-products*) representan un grupo de compuestos heterogéneos que se forman a través de la glicación no enzimática de las proteínas después de la exposición a azúcares¹. La acumulación de los AGE aumenta de forma fisiológica con la edad, pero se ha descrito también una producción acelerada en diabetes mellitus (DM) tipo 2 asociado a la hiperglucemia crónica², así como en enfermedad renal crónica avanzada, relacionado tanto con la falta de eliminación como con el estado aumentado de estrés oxidativo³. Sin embargo, es poco conocida la influencia de la obesidad mórbida en la concentración de los AGE.

La obesidad afecta prácticamente a un cuarto de la población española, de forma similar a lo que se ha descrito en todo el mundo, y se asocia a una gran comorbilidad metabólica^{4,5}. Ante los continuos fracasos de la dieta hipocalórica y la ausencia de fármacos disponibles en nuestro medio, la cirugía bariátrica surge como el único método eficaz para alcanzar y mantener una pérdida ponderal significativa en los sujetos con obesidad mórbida⁶. La relación entre los AGE y el índice de masa corporal (IMC) ha sido evaluada principalmente en población con sobrepeso u obesidad

leve, encontrando una correlación entre los AGE y: (i) el IMC en población general, (ii) el IMC en pacientes con DM tipo 2, (iii) el IMC en estadios finales de la enfermedad renal crónica y (iv) la presencia de obesidad abdominal^{2,7-9}. Sin embargo, desconocemos la relación entre los AGE y la obesidad grave, así como si la pérdida ponderal asociada a la cirugía bariátrica ejerce algún efecto sobre su concentración.

La posibilidad de estudiar la concentración de los AGE mediante la autofluorescencia cutánea (SAF, del inglés *skin autofluorescence*) ha permitido superar la dificultad inicial de su determinación a nivel tisular y facilitar así el estudio de grandes poblaciones¹⁰. En este trabajo, nuestro objetivo fue investigar la acumulación de los AGE estimados mediante la SAF en pacientes con obesidad mórbida en espera de cirugía bariátrica, así como tras la pérdida ponderal inducida por la cirugía realizada en un periodo de seguimiento de 5 años.

Material y métodos**Diseño del estudio**

Estudio observacional transversal que incluye a 144 pacientes separados en 3 grupos equiparados por sexo y edad:

(i) 52 sujetos con obesidad mórbida en protocolo de cirugía bariátrica, (ii) 46 pacientes sometidos a cirugía bariátrica en los últimos 5 años y (iii) grupo control con 46 sujetos con un IMC < 30 kg/m² y un factor de riesgo cardiovascular. Los objetivos y el diseño del estudio fueron aprobados por el Comité de Evaluación de la Investigación Clínica de nuestro centro. Todos los pacientes incluidos aceptaron voluntariamente participar en el estudio tras recibir la información necesaria y firmar el consentimiento informado.

Población estudiada

Pacientes caucásicos controlados de forma habitual en la Unidad de Obesidad del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida. Los pacientes fueron reclutados entre junio de 2015 y febrero de 2016. El diagnóstico y la clasificación de la obesidad siguieron los estándares establecidos por la SEEDO¹¹, mientras que el diagnóstico de síndrome metabólico (SM) se realizó mediante las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud¹². La técnica quirúrgica empleada incluye bypass gástrico en Y-de-Roux y gastrectomía vertical. El seguimiento tras la cirugía se limita a 5 años, acorde con la antigüedad del programa de cirugía bariátrica en nuestro centro. Los pacientes del grupo control se reclutaron en la Unidad de detección y tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Fueron pacientes no obesos (IMC < 30 kg/m²), de ambos sexos y con ninguno o solo un factor de riesgo cardiovascular (DM tipo 2, hipertensión arterial o dislipidemia). Se excluyeron pacientes de cualquier grupo con insuficiencia renal (filtrado glomerular \leq 60 ml/min/1,73m² calculado mediante la fórmula CKD-EPI), menores de edad o mayores de 65 años, raza no caucásica, mujeres embarazadas, y aquellos sujetos con una enfermedad grave que condicionara su supervivencia. Las características principales de la población estudiada se pueden observar en la tabla 1. Los datos clínicos y analíticos de todos los pacientes se recogieron tras la revisión de la historia clínica informatizada. Los datos antropométricos se recabaron mediante protocolos estandarizados en el mismo momento en que se realizó la medición de la SAF.

Medición de la autofluorescencia cutánea

Para la medición de la SAF se utilizó un AGE Reader™ (DiagnOptics, Groningen, Países Bajos). Se trata de un dispositivo no invasivo, completamente automatizado, que mide la concentración de los AGE en el antebrazo dominante utilizando un espectro de luz ultravioleta-A. Este dispositivo ha sido validado previamente en pacientes con DM tipo 2 y en sujetos en hemodiálisis^{10,13}. La SAF se calcula a partir de la relación entre la fluorescencia emitida en un rango de longitud de onda entre 420 y 600 nm y la luz recibida como consecuencia de la excitación producida en los AGE subcutáneos, utilizando un espectrofotómetro y un software especializado. La longitud de onda recibida oscila entre 300 y 420 nm. Se utilizó la media de 3 lecturas en todos los sujetos, pudiéndose completar toda la exploración en poco más de un minuto por paciente (coeficiente de variación de 0,24). Finalmente, ya que la SAF no se puede medir de forma fiable en personas con una piel oscura debido a la excesiva absorción de la luz en estos pacientes, solo se reclutaron sujetos de raza caucásica.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar para las variables continuas. Las variables categóricas se plasmaron en porcentaje. La distribución normal de las variables se confirmó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de χ^2 para las variables categóricas, así como el test t de Student y ANOVA para las variables continuas. La relación entre las variables continuas y la SAF se examinó mediante la prueba de correlación lineal de Pearson. También se llevó a cabo una regresión lineal múltiple por pasos para explorar las variables independientemente relacionadas con la SAF. Las variables independientes incluidas en el análisis fueron la edad, el sexo, el IMC y la presencia de SM en el primer modelo, mientras que en un segundo modelo la presencia de SM fue sustituida por sus componentes (DM tipo 2, hipertensión arterial y dislipidemia). Todos los valores de «p» se basaron en una

Tabla 1 Características clínicas principales y los datos metabólicos de la población

	Control	Obesidad mórbida	Post-CB	p
N	46	52	46	
Mujeres (%)	65,2	67,3	76,1	0,483
Edad (años)	47,6 \pm 10,0	48,6 \pm 10,7	47,6 \pm 9,5	0,800
IMC (kg/m ²)	27,5 \pm 2,2	47,0 \pm 7,1	32,2 \pm 5,7	< 0,001
DM tipo 2 (%)	8,7	42,3	22,7	< 0,001
HTA (%)	32,6	55,8	20,9	0,001
DLP (%)	41,3	50,0	21,7	0,014
SAOS (%)	-	48,1	6,5	< 0,001
SM (%)	0	38,5	19,6	< 0,001
GBA (mg/dl)	92,8 \pm 11,8	116,2 \pm 40,7	88,5 \pm 24,5	< 0,001
HbA1c (%)	4,8 \pm 0,8	6,1 \pm 1,1	5,5 \pm 0,9	< 0,001

CB: cirugía bariátrica; DLP: dislipidemia; DM: diabetes mellitus; GBA: glucemia basal en ayunas; HbA1c: hemoglobina glucosilada; HTA: hipertensión arterial; IMC: índice de masa corporal; SAOS: síndrome de apnea obstructiva del sueño; SM: síndrome metabólico
Datos expresados mediante media \pm desviación estándar o porcentaje.

prueba bilateral de significación estadística. La significación se aceptó al nivel de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS (SPSS Chicago, IL, EE. UU.).

Resultados

En su conjunto, los sujetos con obesidad mórbida tuvieron una SAF ($2,14 \pm 0,65$ unidades arbitrarias (AU, del inglés *arbitrary units*) significativamente superior a la de la población no obesa ($1,81 \pm 0,22$ AU; $p < 0,001$). Cuando en el grupo de sujetos obesos la medición de la SAF se evaluó en función de la presencia o ausencia de SM, esta fue significativamente mayor en los primeros ($2,44 \pm 0,67$ vs. $1,86 \pm 0,51$ AU; $p < 0,001$) (fig. 1). Adicionalmente, los valores de la SAF fueron similares entre los pacientes obesos sin SM y el grupo control ($1,86 \pm 0,51$ vs. $1,81 \pm 0,22$ AU; $p = 0,540$).

Por otra parte, los sujetos intervenidos de cirugía bariátrica presentaban también una SAF superior a la de la población no obesa ($2,18 \pm 0,40$ vs. $1,81 \pm 0,22$ AU; $p < 0,001$), aunque similar a la de los pacientes con obesidad mórbida ($p = 0,732$). Cuando en esta población de pacientes intervenidos de cirugía bariátrica se analizó la SAF en función de la presencia o ausencia de SM, persistía cierta diferencia aunque sin alcanzar la significación estadística ($2,13 \pm 0,37$ vs. $2,43 \pm 0,48$ AU; $p = 0,051$). Finalmente, en la figura 2 se observa cómo la SAF no disminuye de forma significativa a lo largo del seguimiento ($r = -0,072$; $p = 0,634$). Así, al comparar a los sujetos intervenidos antes y después de la máxima pérdida ponderal se observó cómo los valores de SAF se mantienen relativamente estables ($2,32 \pm 0,48$ vs. $2,11 \pm 0,34$ AU; $p = 0,099$).

Cuando se evaluaron de forma conjunta todos los sujetos incluidos en el estudio no se encontró correlación entre la SAF y el IMC ($r = 0,089$; $p = 0,288$), pero sí que se percibió una correlación positiva con la edad ($r = 0,451$; $p < 0,001$),

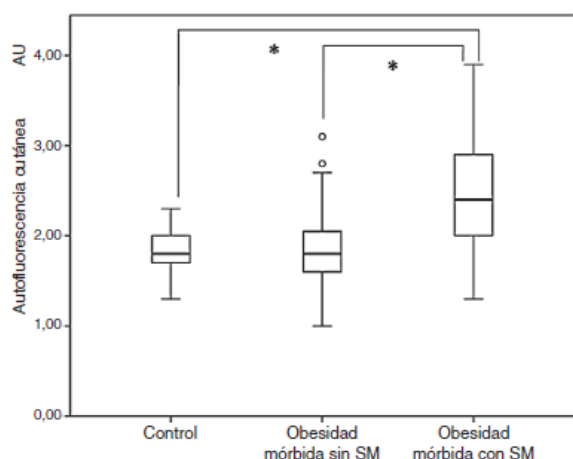


Figura 1 Diagrama de cajas con la concentración de autofluorescencia cutánea en el grupo control y en los pacientes con obesidad mórbida en función de la presencia o no de síndrome metabólico. AU: unidades arbitrarias; SM: síndrome metabólico. * $p < 0,001$.

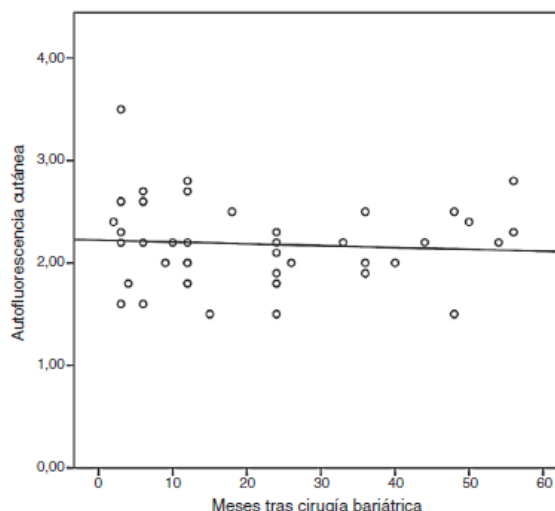


Figura 2 Relación entre la autofluorescencia cutánea y los meses tras la cirugía bariátrica.

la glucemia basal en ayunas ($r = 0,295$; $p < 0,001$) y la cifra de HbA1c ($r = 0,496$; $p < 0,001$). Finalmente, el análisis de regresión lineal múltiple por pasos (tabla 2) mostró que la edad y la presencia de SM (pero no el sexo ni el IMC) predecían de forma independiente la SAF ($R^2 = 0,320$). Cuando la presencia de SM fue sustituida por sus componentes, fueron la edad y la presencia de DM tipo 2 (pero no el sexo, el IMC ni la presencia de hipertensión arterial ni dislipidemia) las variables que predecían de forma independiente la concentración subcutánea de AGE. Así, la SAF en los pacientes con DM tipo 2 fue significativamente mayor en comparación con los sujetos sin diabetes, tanto en los individuos con obesidad mórbida ($2,51 \pm 0,65$ vs. $1,88 \pm 0,52$ AU; $p < 0,001$), como en los sujetos ya intervenidos ($2,50 \pm 0,41$ vs. $2,09 \pm 0,35$ AU; $p = 0,004$).

Discusión

Presentamos el primer estudio que evalúa la medición del depósito subcutáneo de los AGE en pacientes con obesidad mórbida, observando una concentración incrementada en comparación con los sujetos no obesos. Estudios previos han comunicado también, aunque en poblaciones con menores grados de obesidad, la existencia de una correlación positiva entre los niveles de SAF y el IMC. Así por ejemplo, en un reciente estudio poblacional con 9.009 sujetos provenientes del estudio *Lifelines Cohort Study*, el valor de la SAF se asoció de forma independiente no solo con la edad y la cifra de HbA1c, sino también con el IMC⁷. De forma similar, el IMC se asoció de forma independiente con la SAF en una cohorte de 973 sujetos con DM tipo 2, junto con otros parámetros como el tiempo de evolución de la diabetes, la edad, el hábito tabáquico y la HbA1c².

Por su parte, y confirmando nuestros resultados, también se han encontrado mayores concentraciones séricas del receptor soluble de los AGE en sujetos con obesidad mórbida¹⁴. Sin embargo, nuestro estudio también pone de manifiesto que el incremento de los AGE en los sujetos con

Tabla 2 Análisis de regresión lineal múltiple por pasos de las variables asociadas con la autofluorescencia cutánea

		β	IC 95% de β	p
SAF	Edad (años)	0,024	0,015-0,033	< 0,001
	Sexo (H/M)	-0,024	-	0,762
	IMC (kg/m ²)	-0,104	-	0,206
	SM (sí/no)	0,264	0,066-0,461	0,009
	Constante	0,911	0,489-1,333	< 0,001
R ² = 0,320				
SAF	Edad (años)	0,023	0,015-0,032	< 0,001
	Sexo (H/M)	-0,074	-	0,362
	IMC (kg/m ²)	-0,070	-	0,378
	DM tipo 2 (sí/no)	0,301	0,115-0,488	0,002
	Dislipidemia (sí/no)	-0,048	-	0,574
	Hipertensión arterial (sí/no)	0,009	-	0,918
R ² = 0,339	Constante	0,896	0,485-1,307	< 0,001

β : coeficiente de regresión parcial normalizada; DM: diabetes mellitus; H: hombre; IC: intervalo de confianza; IMC: índice de masa corporal; M: mujer; SAF: autofluorescencia cutánea; SM: síndrome metabólico.

obesidad mórbida se produce a expensas de aquellos individuos en los que el exceso de peso condiciona la aparición de comorbilidades metabólicas. Así, los valores de la SAF en los pacientes con obesidad mórbida sin SM fueron similares a los de los sujetos no obesos. Es decir, el aumento de la SAF en el grupo de pacientes con obesidad mórbida debería atribuirse a las consecuencias metabólicas asociadas con el incremento ponderal. Apoya nuestros resultados el estudio de Den Engelsen et al. en el que se utiliza la SAF para evaluar los AGE en función del grado de obesidad visceral⁹. Así, la media de la SAF fue mayor en los 816 individuos con obesidad central que en los 431 sin obesidad central, y mayor aún en el subgrupo de sujetos con obesidad central con comorbilidades que en aquellos sin repercusión metabólica. En este estudio, el valor de la SAF se incrementa de forma progresiva y significativa desde el grupo sin obesidad ni factores de riesgo ($1,63 \pm 0,37$ AU), pasando por los sujetos solo con obesidad central ($1,74 \pm 0,44$ AU), hasta llegar a la obesidad central con comorbilidades ($1,87 \pm 0,43$ AU; $p < 0,001$). En este escenario y de confirmarse estos hallazgos, el estudio de los AGE a nivel subcutáneo mediante la SAF podría ser considerado una herramienta útil en el estudio e identificación de los sujetos obesos «metabólicamente sanos». Si bien existen criterios clínicos para el correcto diagnóstico de esta situación, distinguir a esta población requiere tiempo y exploraciones complementarias¹⁵⁻¹⁹. Es entonces cuando disponer de un instrumento fiable, de pequeño tamaño y fácil manejo, no invasivo, y que proporciona un resultado en poco más de un minuto, puede convertirse en un valor añadido en la toma de decisiones clínicas y terapéuticas en el manejo de la obesidad.

El efecto beneficioso que ejerce sobre la comorbilidad metabólica la pérdida ponderal conseguida mediante la cirugía bariátrica es ampliamente conocido²⁰. Sin embargo, desconocemos la evolución del depósito tisular de los AGE durante este periodo, y lo reportado sobre la evolución del receptor soluble de los AGE es contradictoria. Por una parte, el trabajo de Lorenzi et al. estudió, en 69 pacientes con obesidad mórbida sometidos a un bypass gástrico, los cambios en la concentración de los receptores solubles de los AGE tras un año de la cirugía, describiendo un descenso significativo de los mismos¹⁴. Si bien este resultado puede

interpretarse como el reflejo en la mejoría metabólica condicionada por la reducción ponderal, contrasta frontalmente con lo observado por Brix et al. un par de años antes²¹, donde la concentración de los receptores solubles de los AGE aumentó, también de forma significativa, tras la cirugía bariátrica.

Nuestro trabajo es el primero en utilizar la medición de la SAF para evaluar la evolución del depósito de AGE a nivel subcutáneo tras la cirugía bariátrica, observando cómo su concentración parece no disminuir tras un seguimiento de 5 años tras la intervención. Este resultado indica que la velocidad con que se produce el recambio proteico es un factor determinante en el depósito tisular de los AGE. El recambio del colágeno de la piel puede alcanzar los 14,8 años²², por lo que parece lógico pensar que 5 años no es un periodo de tiempo suficientemente prolongado como para conseguir un descenso marcado de la concentración tisular de los AGE. Este decaje entre la resolución del SM y la normalización de la SAF provoca que la determinación de los AGE, un parámetro útil para evaluar el riesgo cardiovascular antes de la cirugía²³, pierda su validez clínica los primeros años tras esta. También siembra la duda sobre si la rápida mejoría metabólica descrita tras la cirugía bariátrica, incluso antes de conseguir una pérdida ponderal significativa en el caso de la DM tipo 2, se traduce realmente en una mejoría biológica también a nivel tisular en estos primeros años²⁴. Podemos insinuar mediante nuestros datos que el daño tisular no se corrige tan rápidamente como los valores analíticos o la cifras de presión arterial.

Al analizar de forma conjunta a todos los pacientes incluidos en el estudio hemos observado que tanto la edad como la presencia de SM, especialmente cuando entre sus componentes se encuentra la DM tipo 2, condiciona de forma independiente la concentración subcutánea de los AGE.

Nuestro estudio presenta limitaciones que es conveniente resaltar. Primero, se trata de un estudio transversal, por lo que no es posible establecer ninguna relación causal entre la presencia de SM y la concentración de los AGE estudiada mediante la SAF. Segundo, no hemos evaluado a los mismos pacientes antes y tras la cirugía bariátrica, por lo que aunque asumimos que la pérdida ponderal conseguida mediante la cirugía gastrointestinal no condiciona un descenso en la

SAF, faltan estudios que confirmen esta hipótesis mediante el seguimiento de la misma cohorte de pacientes a lo largo del tiempo. Tercero, al incluir a pacientes con pocos meses de seguimiento tras la cirugía se observa todavía una prevalencia elevada de DM tipo 2, lo que podría contribuir a dificultar el descenso de los AGE en este grupo. Cuarto, las características de la medición de la SAF solo permite la evaluación de los individuos con un tono de piel claro, ya que la variación en la reflectancia de la piel de los sujetos de piel más oscura invalida su lectura. Por último y aunque las poblaciones están equiparadas por edad, carecemos de otras variables que deberían tenerse en consideración al evaluar el depósito de los AGE como por su prolongada vida media, el filtrado glomerular, el hábito tabáquico o el consumo de café⁷.

En conclusión, el incremento en la concentración de los AGE a nivel subcutáneo en la población con obesidad mórbida y síndrome metabólico se produce a expensas de aquellos individuos con DM tipo 2. Tras la cirugía, y a pesar de la pérdida ponderal y la resolución de comorbilidades inducida por esta, las cifras de SAF se mantienen elevadas al menos durante los primeros 5 años. Por lo tanto, la determinación de la concentración de los AGE a nivel subcutáneo calculado mediante la SAF puede ayudarnos a discriminar de forma eficaz a los sujetos obesos que basalmente se presentan con mayor afectación metabólica, aunque tras la cirugía esta misma técnica dejaría de ser clínicamente útil.

Financiación

Este trabajo fue apoyado por el del Instituto de Salud Carlos III (Plan de acción II14//00008). Este organismo gestor no tuvo ningún papel en el diseño del estudio, en la recopilación, el análisis y la interpretación de los datos, en la redacción del informe, ni en la decisión de presentar el artículo para su publicación.

Conflicto de intereses

No existe ningún conflicto de intereses respecto a este artículo.

Agradecimientos

Agradecemos a todo el equipo multidisciplinar de la Unidad de Obesidad del Hospital Universitario Arnau de Vilanova haber permitido realizar este trabajo. Especialmente a J.A. Baena-Fustegueras, M.C. de la Fuente y S. Ros, por realizar la intervención de cirugía bariátrica y multitud de visitas de seguimiento. Y a L. Gutiérrez y M. Bueno por la colección de datos.

Bibliografía

- 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.
- Lutgers HL, Graaff R, Links TP, Ubink-Veltmaat LJ, Bilo HJ, Gans RO, et al. Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:2654-9.
- Miyata T, Wada Y, Cai Z, Iida Y, Horie K, Yasuda Y, et al. Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int*. 1997;51:1170-81.
- Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Graciani A, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008-2010: the ENRICA study. *Obes Rev*. 2012;13:388-92.
- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384:766-81.
- Sundbom M. Laparoscopic revolution in bariatric surgery. *World J Gastroenterol*. 2014;20:15135-43.
- Van Waateringe RP, Slagter SN, van der Klauw MM, van Vliet-Ostapchouk JV, Graaff R, Paterson AD, et al. Lifestyle and clinical determinants of skin autofluorescence in a population-based cohort study. *Eur J Clin Invest*. 2016;46:481-90.
- Arsov S, Trajceska L, van Oeveren W, Smit AJ, Dzekova P, Stegmayr B, et al. The influence of body mass index on the accumulation of advanced glycation end products in hemodialysis patients. *Eur J Clin Nutr*. 2015;69:309-13.
- Den Engelsen C, van den Donk M, Gorter KJ, Salomé PL, Rutten GE. Advanced glycation end products measured by skin autofluorescence in a population with central obesity. *Dermatoendocrinol*. 2012;4:33-8.
- Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:3687-93.
- Rubio MA, Salas J, Barbany M, Moreno B, Aranceta J, Bellido D, et al. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Rev Esp Obes*. 2007;5:135-71.
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120:1640-5.
- Meerwaldt R, Links T, Graaff R, Thorpe SR, Baynes JW, Hartog J, et al. Simple noninvasive measurement of skin autofluorescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:290-8.
- Lorenzi R, Pattou F, Beuscart JB, Grossin N, Lambert M, Fontaine P, et al. Anti-sRAGE autoimmunity in obesity: downturn after bariatric surgery is independent of previous diabetic status. *Diabetes Metab*. 2014;40:356-62.
- Sims EAH. Characterization of the syndromes of obesity. En: Brodoff BN, Bleicher SJ, editores. *Diabetes mellitus and obesity*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1982. p. 219-26.
- Primeau V, Coderre L, Karelis AD, Brochu M, Lavoie ME, Messier V, et al. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35:971-81.
- Samocha-Bonet D, Chisholm DJ, Tonks K, Campbell LV, Greenfield JR. Insulin-sensitive obesity in humans—a 'favorable fat' phenotype? *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23:116-24.
- Stefan N, Häring H-U, Hu FB, Schulze MB. Metabolically healthy obesity: Epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013;1:152-62.

19. Roberson LL, Aneni EC, Maziak W, Agatston A, Feldman T, Rouseff M, et al. Beyond BMI: The "Metabolically healthy obese" phenotype & its association with clinical/subclinical cardiovascular disease and all-cause mortality - a systematic review. *BMC Public Health*. 2014;14:14.
20. Ramos-Leví AM, Rubio Herrera MA. Metabolic surgery: quo vadis? *Endocrinol Nutr*. 2014;61:35-46.
21. Brix JM, Höllner F, Kopp HP, Schernthaner GH, Schernthaner G. The soluble form of the receptor of advanced glycation end-products increases after bariatric surgery in morbid obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36:1412-7.
22. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2000;275:39027-31.
23. Sirinopol D, Hogas S, Veisa G, Mititiuc I, Volovat C, Apetrii M, et al. Tissue advanced glycation end products (AGEs), measured by skin autofluorescence, predict mortality in peritoneal dialysis. *Int Urol Nephrol*. 2015;47:563-9.
24. Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG, Long SB, Morris PG, Brown BM, et al. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg*. 1995;222:339-52.

CONTRIBUCIÓ CIENTÍFICA COM A PUBLICACIÓ

Sánchez E., Baena-Fustegueras JA., De La Fuente MC., Gutiérrez L., Bueno M., Ros S., Lecube A. Productos finales de glicación avanzada en la obesidad mórbida y tras la cirugía bariátrica: cuando la memoria glucémica empieza a fallar *Endocrinol. Nutr*. 2017; 64:4-10. (ISSN 1575-0922. ESPAÑA)

Factor d'impacte: 1.314 (Q4)

CONTRIBUCIÓ CIENTÍFICA COM A PÒSTER

Baena-Fustegueras JA, **Sánchez E**, Gutiérrez L, de la Fuente M, Bueno M, Ros S, González M, Lecube A. Productos finales de glicación avanzada en la obesidad mórbida y tras la cirugía bariátrica: cuando la memoria metabólica empieza a fallar. En el 18º Congreso Sociedad Española de Cirugía de la Obesidad Mórbida y de las Enfermedades Metabólicas, Barcelona 2016.

Discussió

1. Comentari general

Amb els quatre estudis d'aquesta Tesi Doctoral hem presentat noves evidències que refermen el concepte que els AGEs es poden considerar un bon marcador de situacions clíniques estretament relacionades amb la malaltia ateromatosa subclínica, la MRC, les complicacions de la DM2 (especialment el deteriorament de la funció pulmonar) i l'obesitat mòrbida. Al mateix temps, hem constatat les dificultats que suposa modificar la seva concentració tissular, al menys en un màxim de 5 anys, període en el qual hi ha una intensa millora metabòlica, reafirmant el concepte de marcador de “memòria metabòlica” que alguna vegada els ha estat atribuït.

En tots aquests estudis s'ha utilitzat una tècnica no invasiva com és la SAF, basada en la capacitat d'excitació dels AGEs envers una ona de llum ultraviolada. Val la pena recordar que aquesta tècnica sorgeix amb força per l'oportunitat d'estudiar grans poblacions gràcies a la seva rapidesa, sent independent de l'operador, econòmica i gens invasiva. Tot i haver estat prèviament validada en estudis poblacionals que avaluaven el paper de la SAF com a marcador de risc cardiovascular, la tècnica presenta un inconvenient evident: tan sols aporta informació dels AGEs que posseeixen la capacitat fluorescent, especialment la pentosidina, a la qual es pot atribuir el 76% de la variabilitat de la tècnica. I per aquest motiu, no ens dona informació sobre el dipòsit d'AGEs no fluorescents, com ara el ALI, ni d'AGEs no entrecreuat amb proteïnes com ara el CML.

Un altre comentari que val la pena realitzar abans de procedir a la discussió per separat de cada un dels estudis, és el fet de que la hiperglucèmia crònica no és l'únic estímul que genera la formació d'AGEs ⁸⁸. Així, d'altres situacions com l'estrès oxidatiu, l'estat proinflamatori, el tabac, la composició de la dieta i el propi procés fisiològic d'envelliment afavoreixen la seva formació i dipòsit tissular ⁸⁹⁻⁹¹. Per tant, les troballes presentades no han de centrar-se, de fet ja no ho fan, tan sols en l'estudi de pacients amb DM2, sinó que han de ser interpretats en un concepte molt més ampli de malaltia.

Finalment, també volem remarcar que presentem resultats que provenen d'un total de 4.811 subjectes (alguns dels quals han participat en més d'un estudi), amb característiques bastant homogènies, la qual cosa ajuda a enfortir el valor de les conclusions. El fet de tenir contacte amb el projecte ILERVAS, el que coneixem com a Bus de la Salut, ens ha facilitat sobre manera l'accés a una població tan ampla, i la possibilitat de disposar d'un nombre tant alt d'exploracions complementàries. Però també dona idea de que el treball presentat fins ara és sols una petita mostra del veritable potencial d'aquest projecte, i un cop hagi finalitzat la fase de reclutament a finals de desembre de 2019, ha de posar-se de manifest en la multitud de projectes relacionats que poc a poc s'estan posant en marxa, i en els que continuem participant de forma activa.

2. Discussió del Primer Estudi: AGEs i malaltia ateromatosa subclínica

En aquest treball hem aprofundit en la rellevància de la SAF com a marcador de la malaltia ateromatosa subclínica avaluant una gran cohort de subjectes sense esdeveniments cardiovasculars previs. En la nostra població, asimptomàtica i de mitjana edat, hem posat de manifest que no tan sols els AGEs es relacionen clarament amb la presència de plaques d'ateroma, sinó també amb un nou concepte com és el de la "càrrega ateromatosa". Així, els nivells de la SAF es relacionen de forma positiva amb el nombre de territoris afectats i l'àrea total de placa.

La prevalença de la malaltia ateromatosa subclínica en subjectes de baix-moderat risc cardiovascular a la província de Lleida va ser del 70,4%, percentatge superior al 63% descrit en una altra població espanyola, també sense antecedents de malaltia vascular i de mitjana edat, inclosa a l'estudi PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis)²⁵¹. En ambdós casos, la presència de placa ateromatosa en pacients asimptomàtics però vulnerables apareix com un problema clínic que cal resoldre. Però com identificar els subjectes amb malaltia ateromatosa d'una forma eficaç, segura i eficient?

En aquest sentit, les classificacions basades en factors de risc tradicionals no són totalment d'utilitat, ja que infraestimen el risc cardiovascular en població amb baix-moderat risc CV. Tan sols així s'explica que gairebé un terç dels participants de l'estudi PESA classificats amb baix risc per les escales tradicionals (Framingham Heart Study i European Systematic Risk Assessment) presentin, quan són sotmesos a un estudi vascular carotídi, una malaltia ateromatosa intermediària o generalitzada²⁵¹. Amb els resultats comunicats, suggerim que la SAF pot ser un nou indicador que complementi l'avaluació del risc cardiovascular en la població general, i especialment en aquells individus asimptomàtics en qui semblaria més important proporcionar la base per a futures accions preventives.

A més, el nostre estudi també va demostrar que si volem realitzar un cribatge de la malaltia ateromatosa mitjançant una exploració ecogràfica, no ens podem limitar sols a l'estudi dels territoris carotidis. De fet, si ens limitem als quatre territoris carotidis, deixem de detectar un 12% de pacients amb malaltia ateromatosa restringida als territoris femorals. Aquest missatge està en concordança amb les dades de l'estudi Carotid-Femoral Ultrasound Morphology and Cardiovascular Events (CAFES-CAVE), que va demostrar que l'exploració ecogràfica limitada a caròtida o femoral preduïu un 15% i un 13% menys, respectivament, d'esdeveniments vasculars que l'examen d'ambdós territoris després d'un període de deu anys de seguiment²⁵². Això és important si recordem que estudis demogràfics previs, com el Multi Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), the US High Risk Plaque Study, and the Northern Manhattan Study van establir associacions consolidades entre la presència de malaltia ateromatosa carotídea i coronària subclíniques i els futurs esdeveniments cardiovasculars²⁵³⁻²⁵⁶.

Estudis previs han mostrat que els nivells de SAF augmenten en pacients amb patologia isquèmia coronària i perifèrica, així com el seu valor augmenta de forma

progressiva a mesura que es sumen components de la síndrome metabòlica²⁶⁹⁻²⁷¹. A més, el valor clínic afegit de la SAF és compatible amb dades que reflecteixen la seva mesura com a fort predictor de complicacions cardiovasculars i la mortalitat en poblacions amb major risc cardiovascular, com ara pacients amb diabetis i malaltia renal^{95, 183, 272}. El que aporta de diferencial el nostre estudi és que avalua la SAF en una població asimptomàtica amb un risc cardiovascular de lleu a moderat, i que inclou en l'estudi de la malaltia ateromatosa el concepte de l'àrea de placa total. Per tant, creiem que implementar aquesta exploració complementària, que no dura més d'un minut, pot ser de gran utilitat en la nostra pràctica clínica diària per tal d'identificar els subjectes més "cardio-vulnerables". Com a treball de futur ens quedaria avaluar les característiques diferencials que determinen l'afectació ateromatosa limitada al territori carotídi o al territori femoral, per poder ser encara més precisos en el diagnòstic.

S'han descrit alguns dels mecanismes pels quals els AGEs afavoririen el desenvolupament de la malaltia ateromatosa i la formació de plaques. Entre aquests mecanismes s'inclouen: **(i)** la seva capacitat d'augmentar l'estrès oxidatiu; **(ii)** produir modificacions de les fibres de col·lagen i també d'altres proteïnes que constitueixen la matriu extracel·lular de la paret arterial i la seva membrana basal, incrementant així la rigidesa vascular, i **(iii)** la introducció de molècules de LDL cap al compartiment subendotelial²⁵⁵⁻²⁵⁸. De més a més, la vinculació d'AGEs al seu receptor activaria el factor nuclear kappa B, entre d'altres vies pro-oxidants i proinflamatòries²⁵⁹⁻²⁶⁰. En conseqüència, els AGEs afavoririen la formació de plaques ateromatoses causant danys generalitzats a les artèries mitjançant l'augment de la inflamació, l'estrès oxidatiu i la reticulació del col·lagen i altres proteïnes de la paret arterial. Cal remarcar que els AGEs també actuen sobre les plaques d'ateroma ja establertes, mitjançant el seu creixement i també en la seva ruptura¹²⁵.

Pel que fa a la mesura de la "superfície total de placa" d'ateroma en un determinat subjecte, creiem que es tracta d'un enfocament més fiable per al pacient en situació de risc degut a que la malaltia ateromatosa és un procés difús, on la placa creix més ràpid longitudinalment, al llarg de l'eix de flux carotídi, que en espessor²⁶¹. Per tant, sembla raonable suggerir que els pacients amb plaques més petites tindran un menor risc cardiovascular en comparació amb aquells amb la mateixa quantitat de plaques però amb dimensions més grans. Seria important trobar eines que ens ajudessin a estudiar a fons aquesta hipòtesi.

L'associació entre els AGEs circulants i la mortalitat per a totes les causes, inclosa la d'origen vascular, ha estat avaluada amb resultats dispars en estudis epidemiològics de grandària moderada, i que s'han centrat especialment en poblacions d'edat avançada, dones amb DM2 i pacients amb diabetis mellitus tipus 1^{95, 183, 272}. Així, en una població de majors de 65 anys, els nivells sèrics de CML es van associar amb una major incidència de cardiopatia coronària i accident cerebrovascular, de forma independent a la presència d'altres factors de risc més tradicionals²⁶⁶. Per contra, Hanssen et al. va mostrar en dos estudis realitzats en 1.291 subjectes holandesos que les concentracions plasmàtiques d'AGEs no diferien entre individus amb i sense malaltia

cardiovascular ²⁶⁷. De manera semblant, en pacients amb MRC en tractament substitutiu, no es va detectar cap associació entre els nivells circulants de CML i la incidència de malaltia cardiovascular ²⁶⁸. Les nostres mostren l'increment significatiu dels nivells circulants de CML en els pacients amb malaltia ateromatosa generalitzada, tot i que la petita difència numèrica fa pensar que la seva determinació en la pràctica clínica habitual serà de poca utilitat.

Els nostres resultats també ajuden a continuar obrint la porta a una potencial i innovadora diana terapèutica: la possibilitat d'incidir en la concentració, sèrica i/o tissular dels AGEs. De fet, ja hi ha dades disponibles sobre intervencions destinades a reduir les concentracions d'AGEs i RAGE, i a incrementar els nivells dels sRAGE en el contexte de la malaltia cardiovascular ²⁷². L'aminoguanidina es un bon exemple d'inhibidor específic d'AGEs, bloquejant la seva síntesi mitjançant la unió a la 3-deoxi-glucosona, un intermediari en la reacció de glicació no enzimàtica. També amb l'alimentació es pot intentar reduir els nivells d'AGEs: disminuir el consum d'aliments rics en AGEs, cuinar els aliments a baixa temperatura i al vapor i menys temps. La formació d'AGEs es pot reduir amb certs medicaments, vitamines i deixant de fumar. Les estatines, el telmisartán i la curcumina s'han utilitzat per suprimir RAGE ²⁷³. Les estatines, els inhibidors de l'enzim convertidor de l'angiotensina, la rosiglitazona i la vitamina D s'han utilitzat per augmentar els nivells de sRAGE ²⁷².

Hi ha limitacions que volem destacar en el nostre estudi sobre els AGEs i la malaltia ateromatosa subclínica. En primer lloc, com a estudi transversal, no podem establir una relació causal entre els nivells d'AGEs i la presència de lesions ateromatoses. A dia d'avui, tampoc podem assegurar, i amb l'alta prevalença de malaltia ateromatosa que hem descrit, que aquells subjectes amb una SAF més alta siguin també els que desenvolupin esdeveniments cardiovasculars durant els propers anys. Tanmateix, el problema és clínicament rellevant ja que la prevalença de l'ateromatosi subclínica afecta més de la meitat de la població estudiada, i es necessita ajuda per identificar millor els subjectes en risc. En segon lloc, la SAF pot ser poc fiable en subjectes amb pell fosca a causa d'una excessiva absorció de la llum. Hem intentat resoldre aquesta limitació seleccionant només els subjectes caucàsics i exclouent aquells amb una tonalitat de pell més fosca. En tercer lloc, la comparació entre la SAF i els nivells d'AGEs circulants tan sols s'ha realitzat en una petita part de la població de base, pel que no podem concloure grans resultats.

En conclusió, hi ha una clara necessitat d'identificar els subjectes asimptomàtics amb major risc de patir malaltia cardiovascular. En general, els clínics utilitzen classificacions que combinen múltiples factors de risc cardiovascular tradicionals per catalogar els pacients, però degut a que el nostre estudi mostra que la SAF s'associa amb un augment de la càrrega ateromatosa (major nombre de plaques i major àrea total de placa), suggerim la seva inclusió en les estratègies d'avaluació de risc cardiovasculars en població general.

3. Discussió del Segon Estudi: AGEs i malaltia renal crònica

En aquest treball hem comunicat, mitjançant un estudi cas-control, una major acumulació d'AGEs en una població amb MRC en estadis de lleu a moderat sense DM2. Més concretament, l'augment de la SAF en els pacients amb MRC és gràcies a aquelles persones amb evidència d'ateromatosi subclínica. Cal remarcar que la SAF es correlaciona negativament amb la taxa de filtració glomerular, el que suggereix que disminucions lleus de la funció renal són també un factor clau per augmentar la deposició d'AGEs en el teixit subcutani.

En el nostre estudi comuniquem com la SAF es correlaciona negativament amb el filtrat glomerular, dada no descrita prèviament en la literatura. Aquest resultat suggereix que la disfunció renal és un factor clau per augmentar la deposició d'AGEs en el teixit subcutani i al mateix temps uneix els conceptes de la SAF i la davallada del filtrat glomerular amb la malaltia vascular. Convé destacar que en un estudi poblacional amb dades provinents de més d'un milió de subjectes adults, la OR per a esdeveniments cardiovasculars va ser de 1,4 en aquells amb un filtrat estimat entre 45 i 59 ml/min/per 1.73m^2 augmentant fins a 2,0 quan el filtrat disminuïa entre 30 i 44 ml/min/per 1.73m^2 ²⁷⁴. De la mateixa manera, en pacients amb MRC i que són tractats amb diàlisi peritoneal, la SAF es va correlacionar amb la durada de la dosi d'exposició als nivells de glucosa i de la diàlisi peritoneal, i tots ells es van associar de forma independentment amb la morbiditat cardiovascular²⁷⁵.

Reforçant el comentat en el paràgraf anterior, val la pena comparar les nostres dades amb les comunicades en pacients que requereixen hemodiàlisi. Així, en el nostre grup de pacients amb MRC de lleu a moderada (filtrat glomerular 60.8 ± 18.3 mL/min/ 1.73m^2) el valor de la SAF de 2.5 ± 0.6 UA està molt allunyat del comunicat en pacients amb MRC avançada (filtrat glomerular 5,70 [4,88-6,80] mL/min/ 1.73m^2) amb una SAF de 3.5 ± 0.8 AU²⁷⁶. Convé destacar que l'edat dels participants amb MRC en tots dos estudis va ser similar ($58,1\pm 10,6$ anys en el nostre estudi i $59,6\pm 11,6$ anys en l'estudi de Wang CC et al.), i que la SAF en tots dos grups control va ser pràcticament igual ($2,2\pm 0,4$ i $2,2\pm 0,4$ AU, respectivament).

El nostre estudi convergeix amb les troballes descrites en subjectes amb un filtrat glomerular estimat >60 ml/min/per $1,73\text{m}^2$, en els que la SAF va ser significativament més elevada en aquells amb malaltia arterial establerta en comparació als que no la presentaven¹⁷⁹. Els efectes biològics dels AGEs, a través de la seva unió als receptors situats en la paret dels grans vasos, acceleren la formació de la placa d'ateroma²⁷. En pacients amb MRC terminal s'ha comunicat un increment del dipòsit de pentosidina al llarg de les fibres d'elastina de l'aorta, fet que està associat amb la calcificació de la capa mèdia arterial²⁷¹. Aquestes dades confirmen que la deposició d'AGEs acompanya l'aterosclerosi subclínica més enllà, i de forma independent, de la presència de DM2²⁷⁷.

A més, també s'ha descrit que els AGEs s'acumulen en la microvasculatura del parènquima renal, promovent la filtració glomerular i la proteïnúria²⁷⁹. De fet, estudis

clínic en pacients amb diabetis mellitus tipus 1 revelen un augment significatiu de la concentració d'AGEs subcutanis quan l'albumina urinària progressava des de normal fins a microalbuminúria i macroalbuminúria ²⁸⁰. La concentració plasmàtica d'AGEs en la DM2 normoalbuminúric també identifica aquells pacients amb un major augment de la membrana basal glomerular ²⁸¹. Més recentment, Luo et al. van comunicar que en un medi no hiperglucèmic, els AGEs augmentaven la permeabilitat de les cèl·lules endotelials glomerulars ²⁸².

Com a dada innovadora d'aquest estudi, volem destacar la possibilitat d'utilitzar la SAF per establir una determinada edat vascular. Sabem que l'envelliment vascular es produeix juntament amb la disfunció endotelial, la remodelació vascular, la inflamació i l'augment de la rigidesa de la paret arterial ²⁸³. Sabent el valor de la SAF podem calcular una edat que anomenem vascular i que és diferent a la edat cronològica. Així, en els pacients amb MRC poc evolucionada hi ha un marcat augment de l'edat vascular, més de 10 anys superior a la seva edat cronològica. De forma global, l'edat del grup amb MRC de lleu a moderada augmentava fins els 70,3±25,5 anys, quan la seva edat cronològica era de 58,1±10,6 anys. Aquest es el primer estudi que intenta quantificar l'envelliment accelerat que tenen els pacients amb MRC. Aquest resultat ens obre més preguntes que haurem d'intentar respondre en el futur: **(i)** els pacients amb MRC tenen els mateixos esdeveniments cardiovasculars que les persones de població general amb 10 anys mes?; **(ii)** es pot alentir, o fins i tot frenar, aquest envelliment accelerat?; **(iii)** l'edat vascular incrementa també de forma progressiva a mesura que es deteriora la funció renal?

Les limitacions del estudi que voldríem remarcar, com ja vam fer al manuscrit, són les següents. Primerament, el disseny del nostre estudi no pot esclarir si l'acumulació renal d'AGEs promou la disfunció renal, o si bé al contrari, la disminució de filtrat desencadena l'acumulació d'AGEs. No obstant, quan el receptor d'AGE s'elimina en un model de ratolí, hi ha un augment del 29% en el filtrat glomerular acompanyat de canvis estructurals com la reducció del gruix de la membrana basal glomerular i l'esclerosi mesangial ²⁸⁴. Malgrat els avenços científics, molts aspectes importants dels AGEs i el seu paper en la biologia renal encara no estan clars ²⁸⁵. Per exemple, les interaccions d'altres sistemes homeostàtics implicats en la patologia renal, com ara el sistema renina-angiotensina, el òxid nítric, o els sistemes de l'endotelina amb l'eix d'AGE-RAGE no es coneixen perfectament. Tanmateix, el problema és clínicament rellevant, ja que la prevalença de la MRC arriba al 20,4% entre els participants del *National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)*, del 2005-2006, perquè es necessita ajuda per identificar als subjectes amb MRC que presentin un major risc vascular ²⁸⁶. En segon lloc, no hem pogut estudiar en els pacients d'aquest estudi les concentracions sèriques d'AGEs circulants, com sí es va fer al primer estudi. Suposem que la SAF roman estable durant molt de temps a l'estar menys influenciada per factors com el tabaquisme o la nutrició ja que en un treball previ, Ueno et al. van mostrar que en els pacients amb MRC, tant la SAF però no els nivells sèrics de la pentosidina es correlacionaven amb el gruix íntima-mitja a nivell de la caròtida ²⁸⁷⁻²⁸⁸.

En conclusió, la SAF es troba elevada en pacients amb MRC de lleu a moderada en comparació amb els subjectes de control. Aquesta troballa està relacionada amb la presència de malaltia ateromatosa subclínica i està associada de forma independent amb la taxa de filtrat glomerular. Per tant, la SAF és un mètode fàcil, ràpid i no invasiu que pot ajudar a avaluar amb precisió el risc cardiovascular real en les primeres etapes de la MRC.

4. Discussió del Tercer Estudi: AGEs, diabetis mellitus tipus 2 i funció pulmonar

Segons el nostre coneixement, aquest és el primer estudi en què s'utilitza la SAF cutània com a marcador de la funció pulmonar en una gran cohort de subjectes sense una malaltia pulmonar coneguda i proporcionem evidències que la deposició d'AGEs a la pell està relacionada amb una disminució dels valors espiromètrics i un major percentatge de patrons ventilatoris anormals. A més, aquesta associació negativa s'agreuja més entre els subjectes amb DM2.

La formació d'AGEs augmenta amb l'edat i s'accelera amb la hiperglucèmia crònica, la inflamació crònica i l'estrès oxidatiu ²⁴⁵. La SAF també està associada a diverses variables clíniques (per exemple, l'edat, el IMC, l'HbA1c i l'aclariment de creatinina), el nostre estil de vida (per exemple, la manera de cuinar els aliments, l'hàbit tabàquic i el consum de cafè), i alguns polimorfismes genètics ²⁸⁹. Les nostres dades, a partir d'una gran població amb almenys un factor de risc vascular, coincideixen amb aquesta informació. D'altra banda, degut a que els AGEs estan relacionats de forma irreversible amb les proteïnes d'un determinat teixit, la seva acumulació serà major en aquells òrgans i teixits que es caracteritzin per un baix recanvi tisular. Així, teixits amb un *turnover* més lent (com ara el teixit subcutani, el cristal·lí o el cartílag) capturen l'efecte de la hiperglucèmia durant dècades, mentre que teixits amb un *turnover* més ràpid (com ara el plasma, l'epidermis o les mucoses) acumulen AGEs amb menor mesura. En aquests darrers teixits, els AGEs seran descompostos a pèptids AGE o AGEs lliures, i excretats a través del ronyó ^{290, 291}.

La prevalença de malaltia pulmonar desconeguda que es descriu a la nostra població és similar a la descrita en altres estudis transversals com la *National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)* ²⁸⁶. La idea que la funció pulmonar disminueix al llarg de la vida està generalment acceptada ²⁹². Tot i així, no hi ha estudis que hagin avaluat l'associació entre l'acumulació d'AGEs i la funció pulmonar en població general ni en els pacients amb DM2. La implicació pulmonar subjacent en la DM2 és una complicació relativament freqüent, però generalment poc reconeguda. Encara que aquest impacte negatiu sembla estar mediat principalment per mecanismes patològics associats a un patró pulmonar restrictiu, també s'han implicat mecanismes obstructius ^{293, 294}. El parènquima pulmonar és ric en proteïnes de teixit connectiu, en especial amb col·lagen, però també amb elastina i fibronectina, i també presenta una vascularització considerable, raons suficients per proposar que els mateixos trastorns

fisiològics i histològics implicats en el desenvolupament de les complicacions tardanes de la diabetis en altres sistemes d'òrgans també poden afectar a la funció pulmonar^{295, 296}. Igual que altres estudis transversals, el nostre també mostra com els pacients amb DM2 presenten una disminució del valor teòric d'un 13% del VEMS i un 14% de la CVF en comparació amb els subjectes sense diabetis. En aquest sentit, s'ha suggerit que la glicosilació no enzimàtica de les proteïnes del parènquima pulmonar i dels cartílags de paret toràcica podria afavorir el desenvolupament d'un parènquima pulmonar menys elàstic i limitar la mobilitat de la caixa toràcica, característiques subjacent al patró respiratori restrictiu anteriorment descrit en pacients amb DM2^{293, 296}. En un petit estudi que va avaluar a 23 pacients amb diabetis dependents d'insulina, la limitació de la mobilitat articular es va associar de forma significativa amb la disminució de la capacitat pulmonar total (CVF i VEMS), el que es va interpretar com una manifestació més d'un trastorn generalitzat en el metabolisme del col·lagen²⁹⁷. Els nostres resultats, on la SAF esdevé com a factor de risc independent per a valors espiromètrics com la CVF i el VEMS, proporcionen proves addicionals que donen suport a l'impacte negatiu dels AGEs sobre la funció pulmonar. Cal esmentar que en el present estudi també vam trobar que la prediabetes té un impacte negatiu en la CVF en comparació amb els subjectes amb un metabolisme normal de la glucosa, tot i que els valors de SAF no van arribar a ser diferents entre tots dos grups. Aquesta troballa suggereix que altres mecanismes, com ara la resistència a la insulina, poden jugar també un paper fonamental en el inici de la disfunció pulmonar present en la DM2.

El paper dels AGEs en la gènesi i la progressió de les complicacions tardanes, tant micro com macrovasculars, de la DM2 ha estat prèviament suggerida²⁹⁸. Així, la mesura de la SAF és un predictor independent d'esdeveniments cardiovasculars i mort en pacients amb DM2^{95, 299-301}. Els AGEs també s'acumulen a la microcirculació del ronyó, on promouen increments de la filtració glomerular i la proteïnúria^{276, 302, 303}. De la mateixa manera, els nivells intravitrins d'AGEs estan augmentats precedint el desenvolupament de retinopatia diabètica proliferativa i l'edema macular, al temps que els valors de la SAF augmenten de forma paral·lela a la severitat de la retinopatia diabètica^{304, 305}. Finalment, la SAF també s'ha associat amb la neuropatia i el peu diabètic³⁰⁶.

El nostre estudi avalua subjectes, amb i sense DM2, tots ells sense patologia respiratòria, i els resultats indiquen un impacte negatiu de l'acumulació dels AGEs en la funció pulmonar. La participació dels AGEs en pacients amb malaltia pulmonar obstructiva crònica sí havia estat avaluada prèviament. Per una banda, Hoonhorst et al. van demostrar que els valors de la SAF eren significativament majors en un grup de 202 pacients amb malaltia pulmonar obstructiva crònica en comparació a 193 controls sans³⁰⁷. Resultats similars es van observar en dos estudis més, amb un grup menor de pacients, on la SAF es descriu com un determinant negatiu del VEMS (% del predit) fins i tot després d'ajustar-se per edat, sexe i la xifra de paquet de tabac/any³⁰⁸⁻³¹⁰. El nostre estudi demostra que aquesta correlació negativa entre la SAF i la funció

pulmonar no està restringida a subjectes amb malaltia pulmonar obstructiva crònica, i que sembla ser més intensa entre els pacients amb DM2 que en pacients sense diabetis.

Les concentracions sèriques d'alguns AGEs com la pentosidina, el CML i CEL han estat mesurats en el context de la malaltia pulmonar^{307, 310}. Però els resultats són més consistents quan s'investiga la presència d'AGEs i RAGE en el parènquima pulmonar i les vies respiratòries de petit tamany. En el teixit pulmonar provinent de lobectomies per carcinoma bronquial, la immuntinció d'AGEs va ser major en les vies respiratòries i paret alveolar de pacients amb malaltia pulmonar obstructiva crònica que en el grup de control, mentre que la intensitat de tinció per RAGE també es va incrementar significativament a la paret alveolar³¹¹. El punt més destacable és que la intensitat de la tinció d'AGEs en els alvèols i les vies respiratòries es va correlacionar amb el VEMS (% del predit) previ a la cirurgia³¹¹.

S'ha suggerit que els efectes biològics pels quals els AGEs acceleren el desenvolupament i la progressió de les complicacions de la DM2 són desencadenats per la unió al seu receptor³¹². En aquest context, la descripció de l'expressió del ARNm de RAGE per cèl·lules epitelials alveolars del tipus II mereix atenció³¹³. La interacció AGEs-RAGE en el pulmó pot provocar cascades fisiopatològiques que condueixen al deteriorament de la funció pulmonar a través de la disfunció de la cèl·lula endotelial pulmonar, els efectes proinflamatoris i l'apoptosis cel·lular³¹³⁻³¹⁵. En aquest sentit, en un model animal de ratolins, s'ha mostrat que els RAGE contribueixen a la patogènia de l'asma, independentment de la identitat dels al·lèrgens implicats³¹⁶.

D'aquest tercer estudi també es poden ressaltar limitacions, algunes d'elles comunes amb els estudis previs. En primer lloc, hauria estat interessant comparar dades de la SAF amb concentracions plasmàtiques d'AGEs. Tanmateix, la deposició d'AGEs sembla una mesura més fiable de l'impacte negatiu d'aquests compostos en la salut humana, ja que la SAF roman estable durant molt de temps a causa del lent *turnover* dels AGEs a nivell subcutani. En segon lloc, la SAF proporciona informació, principalment, sobre els AGEs lligats a proteïnes fluorescents, el que no ens permet establir el paper d'altres compostos no fluorescents. En tercer lloc, la naturalesa de l'estudi (transversal) no ens permet establir la causalitat dels AGEs com un dels mecanismes etiopatològics implicats en el impacte negatiu de la DM2 sobre la funció pulmonar.

En conclusió, proporcionem la primera evidència clínica en pacients sense malaltia pulmonar coneguda de que els AGEs, mesurats via SAF, estan correlacionats amb una disminució dels valors espiromètrics. Aquest resultat va ser més marcat entre els pacients amb DM2, el que suggereix que l'acumulació d'AGEs en el parènquima pulmonar i la paret toràcica podria afegir-se als mecanismes implicats en l'efecte perjudicial de la DM2 en la funció pulmonar. Es necessiten estudis addicionals amb un nombre més elevat de pacients amb DM2 per avaluar si la SAF pot ser útil per identificar aquells pacients més vulnerables al desenvolupament d'anomalies respiratòries.

5. Discussió del Quart Estudi: AGEs i obesitat mòrbida.

Aquest és el més petit dels quatre estudis que presentem, però creiem que aporta evidències interessants. Hem mesurat el dipòsit subcutani dels AGEs en pacients amb obesitat mòrbida, observant una concentració incrementada en comparació amb els subjectes no obesos. També aporten dades que recolzen la idea dels AGEs com un indicador de memòria metabòlica, ja que la pèrdua ponderal i la millora metabòlica aconseguides al llarg de 5 anys no semblen suficients per disminuir els nivells d'AGEs en els pacients amb obesitat mòrbida de base.

Estudis previs han comunicat, en subjectes amb menors graus d'obesitat, l'existència d'una correlació positiva entre els nivells de SAF i el IMC. Així per exemple, en un recent estudi poblacional amb 9.009 individus provinents de l'estudi *Lifelines Cohort Study*, el valor de la SAF es va associar de forma independent no només amb l'edat i la xifra de HbA1c, sinó també amb l'IMC ^{235, 271, 317}. De manera similar, la SAF es va associar de forma independent amb el IMC en una cohort de 973 subjectes amb DM2, juntament amb altres paràmetres com el temps d'evolució de la diabetis, l'edat, l'hàbit tabàquic i l'HbA1c ^{90, 318}.

Al analitzar de forma conjunta tots els pacients inclosos en l'estudi, tant l'edat com la presència de síndrome metabòlica, especialment quan entre els seus components es troba la DM2, condicionen de forma independent la concentració subcutània dels AGEs.

Per la seva banda, i confirmant els nostres resultats, també s'han trobat majors concentracions sèriques del sRAGE en subjectes amb obesitat mòrbida ³¹⁹. No obstant això, el nostre estudi també posa de manifest que l'increment dels AGEs es a costa dels subjectes en els que l'excés de pes condiciona l'aparició de comorbiditats metabòliques. Així, els valors de la SAF en els pacients amb obesitat mòrbida sense síndrome metabòlica van ser similars a la dels subjectes no obesos. De forma similar, l'estudi de den Engelsen et al., la mitjana de la SAF va ser més gran en els 816 individus amb obesitat central que en els 431 sense obesitat central; i major també en el subgrup de subjectes amb obesitat central amb comorbiditats que en aquells sense repercussió metabòlica ³²⁰. En aquest estudi, la SAF augmenta de forma progressiva i significativa des del grup sense obesitat ni factors de risc ($1,63 \pm 0,37$ AU) fins al grup amb obesitat central i comorbiditats ($1,87 \pm 0,43$ AU; $p < 0,001$), passant pels subjectes amb obesitat sense comorbiditat ($1,74 \pm 0,44$ AU) ³²⁰.

En aquest escenari, l'estudi dels AGEs a nivell subcutani mitjançant la SAF podria ser considerat una eina útil en l'estudi i identificació dels subjectes obesos "metabòlicament sans". Si bé hi ha criteris clínics per al correcte diagnòstic d'aquesta situació, distingir a aquesta població requereix temps i exploracions complementàries ³²¹⁻³²⁵. És llavors quan disposar d'un instrument fiable, de mida petita i fàcil maneig, no invasiu, i que proporciona un resultat en poc més d'un minut, pot esdevenir un valor afegit en la presa de decisions clíniques i terapèutiques en el maneig de la obesitat.

Unes de les qüestions que també ha volgut respondre aquest estudi es si l'acumulació dels AGEs i el seu potencial efecte advers pot ser revertit. I es que sabem dels beneficis de la pèrdua ponderal mitjançant canvis en l'estil de vida, i com perdre entre un 5 i un 10% del pes redueix fins a un 1,0% l'HbA1c i les necessitats farmacològiques per a la DM2, així com la pressió arterial sistòlica i diastòlica, i l'ús de tractament antihipertensiu. Més marcats són els beneficis aconseguits mitjançant la CB, amb una reducció de pes d'un 23% a l'any de la intervenció ³²⁶. A més, l'efecte beneficiós que exerceix la CB sobre la comorbiditat metabòlica és àmpliament conegut, amb resultats favorables en la DM2, factors de risc cardiovascular, càncer, síndrome d'apnea hipoapnea del son, dolor articular, qualitat de vida i mortalitat per qualsevol causa ³²⁷. No obstant això, desconeixem l'evolució del dipòsit tissular dels AGEs després de la CB, i el reportat sobre l'evolució del sRAGE és contradictori. D'una banda, el treball de Lorenzi et al., en 69 pacients amb obesitat mòrbida sotmesos a un bypass gàstric, els canvis en la concentració dels sRAGE als 12 mesos de la cirurgia disminueixen de forma significativa ³²⁸. Si bé aquest resultat es pot interpretar com el reflex en la millora metabòlica condicionada per la reducció ponderal, contrasta frontalment amb l'observat per Brix et al. un parell d'anys abans, on la concentració dels sRAGE va augmentar, també de forma significativa, després de la CB ³²⁹.

El nostre treball és el primer a utilitzar el mesurament de la SAF per avaluar l'evolució del dipòsit de AGEs a nivell subcutani després de la CB, observant com la seva concentració sembla no disminuir després d'un seguiment de 5 anys després de la intervenció. Aquest resultat suggereix que la velocitat amb què es produeix el recanvi proteic és un factor determinant en el dipòsit tissular dels AGEs. El recanvi del col·lagen de la pell pot arribar a necessitar 14,8 anys, pel que sembla lògic pensar que 5 anys no és un període de temps prou prolongat com per aconseguir un descens marcat de la concentració tissular dels AGEs ³³⁰. Aquest decalatge entre la resolució de la síndrome metabòlica i la normalització de la SAF provoca que la determinació dels AGEs, un paràmetre útil per avaluar el risc cardiovascular abans de la cirurgia, perdi la seva validesa clínica els primers anys després d'aquesta ³³¹. També sembla el dubte sobre si la ràpida millora metabòlica descrita després de la CB, fins i tot abans d'aconseguir una pèrdua ponderal significativa en el cas de la DM2, es tradueix també en una millora biològica a nivell tissular en aquests primers anys ³³². Podem insinuar, mitjançant les nostres dades, que el dany tissular no es corregeix tan ràpidament com els valors analítics o la xifres de pressió arterial. Certament aquests resultats són els únics que no han complert la hipòtesi inicial. Pensar que hem d'esperar quasi 15 anys per intentar resoldre aquest problema quan sabem que els AGEs tenen tants efectes adversos com hem explicat anteriorment, es una mica descoratjador per les persones que tractem l'obesitat ³³⁰.

El nostre estudi presenta limitacions que és convenient remarcar. Primer, es tracta d'un estudi transversal, de manera que no és possible establir cap relació causal entre la presència de síndrome metabòlica i la concentració dels AGEs estudiada mitjançant la SAF. Segon, no hem avaluat als mateixos pacients abans i després de la

CB, de manera que encara que assumim que la pèrdua ponderal aconseguida mitjançant la cirurgia gastrointestinal no condiciona un descens en la SAF, falten estudis que confirmen aquesta hipòtesi mitjançant el seguiment de la mateixa cohort de pacients al llarg del temps. Tercer, a l'incloure pacients amb pocs mesos de seguiment després de la cirurgia, s'observa encara una prevalença elevada de DM2, el que podria contribuir a dificultar el descens dels AGEs en aquest grup. Quart, les característiques del mesurament de la SAF només permet l'avaluació dels individus amb un to de pell clar, ja que la variació en la reflectància de la pell dels subjectes de pell més fosca invalida la seva lectura. Finalment i tot i que les poblacions estan equiparades per edat, no tenim altres variables que cal tenir en consideració a l'avaluar la futura modificació dels AGEs, com ara el filtrat glomerular, l'hàbit tabàquic o el consum de cafè^{235, 333}.

En conclusió, el increment en la concentració dels AGEs a nivell subcutani en la població amb obesitat mòrbida es produeix a costa d'aquells individus amb síndrome metabòlica, i especialment d'aquells amb DM2. Després de la cirurgia, i malgrat la pèrdua ponderal i la resolució de comorbiditats induïda per la CB, les xifres de SAF es mantenen elevades almenys durant els primers 5 anys. Per tant, si bé la determinació de la concentració dels AGEs a nivell subcutani calculat mitjançant la SAF pot ajudar-nos a discriminar de manera eficaç als subjectes obesos que inicialment es presenten amb major afectació metabòlica, després de la cirurgia aquesta mateixa tècnica deixaria de ser clínicament útil.

Conclusions

Dilucidar la importància fisiològica de la glicació de proteïnes està sent actualment motiu d'intensa activitat científica. Aquestes reaccions de glicació són un dels mecanismes fisiopatològics en què les proteïnes de vida llarga i de baixa rotació, com el col·lagen, es veuen deteriorades amb el pas del temps, més encara en els individus que presenten situacions patològiques paral·leles. Retornant a la teoria del AGE'ing, la major acumulació dels AGEs degut a la hiperglucèmia característica de la DM2 donaria lloc a un envelliment accelerat en aquests pacients, amb major predisposició a l'aparició i progressió de les complicacions tardanes. Aquest fet seria més marcat en aquells pacients amb un mal control metabòlic mantingut en el temps. Aquesta hiperglucèmia crònica, sumada a al estrès oxidatiu, dona lloc un nou fenomen conegut com a glicoxidació, que de forma sinèrgica amb els AGEs estarà implicat en nombroses condicions patològiques associades amb l'envelliment prematur i la malaltia cardiovascular.

De forma esquematitzada, els resultats que es deriven dels quatre estudis que conformen aquesta Tesi Doctoral ens permeten concloure que:

1. Primer Estudi: AGEs i malaltia ateromatosa subclínica

1.1. En població general amb baix-moderat risc cardiovascular, els valors més elevats de la SAF permeten identificar aquells pacients amb malaltia ateromatosa subclínica, i

1.2. L'acumulació d'AGEs s'associa a una major càrrega ateromatosa, definida per un major nombre de territoris afectats i una major àrea total de la placa.

2. Segon Estudi: AGEs i malaltia renal crònica

2.1. Els pacients amb malaltia renal crònica poc evolucionada (estadis lleu a moderat), la disminució del filtrat glomerular està associat a un augment de la SAF,

2.2. També en aquest grup de pacients amb major risc vascular, l'aglomeració d'AGEs està lligada a presència de malaltia ateromatosa subclínica, i

2.3. L'envelliment vascular associat a la malaltia renal crònica pot ser quantificat, i es tradueix en un decalatge de 12 anys entre edat cronològica i edat biològica.

3. Tercer Estudi: AGEs, DM2 i funció pulmonar

3.1. En la població general l'acumulació d'AGEs es correlaciona amb una menor funció pulmonar, amb descens de paràmetres espiromètrics com la CVF i el VEMS,

- 3.2. Aquest impacte negatiu es més marcat en els pacients amb DM2, i
- 3.3. El dipòsit d'AGEs en el teixit pulmonar i la paret toràcica seria un nou mecanisme fisiopatològic implicat en l'efecte negatiu que exerceix la DM2 sobre el pulmó.

4. Quart Estudi: AGEs i obesitat mòrbida

- 4.1. Els pacients amb obesitat mòrbida tenen una major acumulació d'AGEs que la població control no obesa,
- 4.2. Aquest increment està estretament relacionat a una major afectació metabòlica, especialment a la presència de DM2, i
- 4.3. La millora ponderal i metabòlica aconseguida amb la cirurgia bariàtrica no condueix a un descens en la concentració d'AGEs, al menys durant un període de seguiment de 5 anys, pel que la seva determinació deixaria de ser clínicament útil en aquesta població.

Creiem que aquesta Tesi Doctoral proporciona una informació abundant i rellevant sobre el paper dels AGEs en les fases inicials de la malaltia ateromatosa i de la malaltia renal. A més a més, afegeix informació a la encara poc coneguda relació entre DM2 i funció pulmonar. I per últim, esclareix alguns dels mecanismes pels que els pacients amb obesitat mòrbida tenen un major risc cardiovascular. Tot junt, posiciona a la mesura dels AGEs mitjançant la SAF com una mesura clínica que pot tenir força repercussió en el maneig de la salut de la població general, pel que suggerim la seva inclusió dintre de les avaluacions de salut habituals.

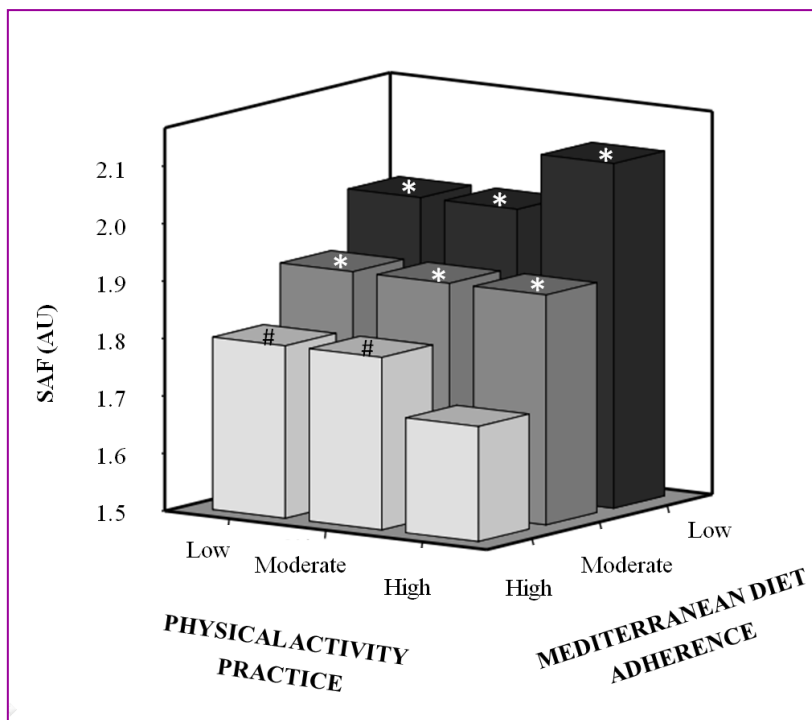
Investigacions futures

Tenint en compte els resultats obtinguts en els estudis que acabem d'exposar, la línia de recerca iniciada amb aquesta Tesi Doctoral tindrà continuïtat. Així, exposem a continuació, i de forma molt esquematitzada, dos dels treballs que ja estem duent a terme:

a) Analitzar l'impacte de l'estil de vida sobre la concentració tissular dels AGEs.

Per aquest objectiu hem utilitzat de nou les dades provinents del Bus de la Salut, on els pacients responen qüestionaris sobre el seu grau d'adherència a la dieta mediterrània i els nivells d'activitat física realitzada. Els qüestionaris utilitzats són l'enquesta d'adherència de la dieta mediterrània adaptada de l'estudi PREDIMED³³⁴ i el qüestionari internacional d'activitat física (IPAQ)³³⁵. A la **Figura 19** podem observar dades preliminars de 2.646 subjectes, i com la sinèrgia d'una dieta molt saludable i major activitat física aconsegueix la menor SAF de totes les combinacions possibles. A més, l'anàlisi de regressió multivariant pas a pas mostra que la dieta mediterrània i l'activitat física s'afegeixen a l'edat i l'hàbit tabàquic per predir de forma independent els valors de la SAF ($R^2=0,122$, $p<0,001$).

Figura 19. Autofluorescència de la pell (eix y) en funció de l'adherència a la dieta (eix z) i de l'actiuat física (eix x).



* $p \leq 0.021$

$p = ns$

Resultats parcials d'aquest treball ja han estat difosos en reunions científiques en forma de comunicació oral (Premi a la millor comunicació oral en l'àrea clínica) i pòster, respectivament:

Sánchez E, Betriu À, Purroy F, Fernández E, Barbé F, Gutiérrez-Carrasquilla L, Domínguez C, Lopez-Cano C, Lecube A. Adherència a la dieta mediterrània i productes finals de glicació avançada; un camí per descobrir, en el 20è Congrés Societat Catalana d'Endocrinologia i Nutrició, Barcelona 2017

López-Cano C, **Sánchez E**, Betriu À, Barbé F, Purroy F, Miquel E, Pamplona R, Lecube A. Adherència a la dieta mediterrània, productos finales de glicación avanzada y enfermedad ateromatosa, en el XIV Congreso SEEDO Sociedad Española para el estudio de la Obesidad, Lleida 2018

b) Analitzar la relació entre els AGEs i la circulació intracranial

Fins ara em avaluat la relació dels AGEs amb la malaltia ateromatosa subclínica en els territoris carotidi i femoral. Però disposem també de les dades provinents dels subjectes avaluats en el Bus de la Salut mitjançant una ecografia doppler transcraneal. Podem així passar del risc coronari o vascular perifèric al risc de malaltia vascular cerebral.

Així, utilitzarem els criteris de Baumgartner, et al per definir una estenosi intracraneal greu (>50%): velocitat del pis sistòlic ≥ 220 cm/s en l'arteria cerebral mitja, o ≥ 155 cm/s en l'arteria cerebral anterior, o ≥ 145 cm/s en l'arteria cerebral posterior³³⁶. Per la seva banda, l'estenosi lleu es determinarà per velocitats de entre 155-220 cm/s, 120-155 cm/s, i 100-145 cm/s, respectivament.

Els objectius secundaris d'aquest estudi serà relacionar els AGEs amb altres variables de l'ecografia intracraneal com l'índex de pulsabilitat, la velocitat màxima de l'arteria, la velocitat diastòlica i la velocitat mitja de l'arteria.

Publicacions addicionals en les que el Doctorand ha participat durant el període de formació

- 1.- Babio N, Alcázar M, Castillejo G, Recasens M, Martínez-Cerezo F, Gutiérrez-Pensado V, Masip G, Vaqué C, Vila-Martí A, Torres-Moreno M, **Sánchez E**, Salas-Salvadó J. Patients with coeliac disease reported higher consumption of added sugar and total fat than healthy individuals. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017; 64: 63-9.
- 2.- Lecube A, Romero O, Sampol G, Mestre O, Ciudin A, **Sánchez E**, Hernández C, Caixàs A, Vigil L, Simó R. Sleep biosignature of Type 2 diabetes: a case-control study. *Diabet Med.* 2017; 34: 79-85.
- 3.- Lecube A, **Sánchez E**, Gómez-Peralta F, Abreu C, Valls J, Mestre O, Romero O, Martínez MD, Sampol G, Ciudin A, Hernández C, Simó R. Global Assessment of the Impact of Type 2 Diabetes on Sleep through Specific Questionnaires. A Case-Control Study. *PLoS one.* 2016; 11: e0157579.
- 4.- Lecube A, **Sánchez E**, López-Cano C, Hernández C, Simó R. Type 2 diabetes, risk of sleep apnea-hypopnea syndrome, and quality of life associated to sleep breathing disorders. *Endocrinol. Nutr.* 2017; 64:174-76.
- 5.- Babio N, Alcázar M, Castillejo G, Recasens M, Martínez-Cerezo F, Gutiérrez-Pensado V, Vaqué C, Vila-Martí A, Torres-Moreno M, **Sánchez E**, Barrubés L, Salas-Salvadó J. Risk of eating disorders in patients with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018; 66:53-57.
- 6.- López-Cano C, Lecube A, García-Ramírez M, Muñoz X, **Sánchez E**, Seminario A. Serum surfactant protein D as a biomarker for measuring lung involvement in obese type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102: 4109-16.

Bibliografia

- 1.- Maillard LC. Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoides par voie methodique. CR Acad Sci. 1912; 154:66.
- 2.- 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.
- 3.- Njorge FG, Monnier VM. The chemistry of the maillard reaction under physiological conditions: A review. Prog Clin Biol Res. 1989; 304: 85-107
- 4.- Chuyen NV. Maillard reaction and food processing–application aspects. Adv Exp Med Biol. 1998, 434, 213-35.
- 5.- Amadori M. The condensation product of glucose and p-anisidine. Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. 1929; 9: 226–30.
- 6.- Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. Cardiovasc Res. 1998; 37:586-600.
- 7.- Chuyen NV. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. Mol Nutr Food Res. 2006; 50: 1140-49.
- 8.- Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of carboxymethyllysine as a degradation product of fructose–lysine in glycosylated protein. J Biol Chem. 1986; 261: 4889-94.
- 9.- Dyer D, Blackledge J, Thorpe S, et al. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose: identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. J Biol Chem. 1991; 266: 11654-60.
- 10.- Daffu G, del Pozo CH, O'Shea KM, et al. Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond Int J Mol Sci. 2013; 14:19891–910.
- 11.- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. Circulation. 2006; 114:597–605.
- 12.- Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I, et al. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. Biochim Biophys Acta. 2013; 1833:101–9.
- 13.- Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE): a novel therapeutic target for diabetic vascular complication. Curr Pharm Des. 2008; 14:487–95.
- 14.- Abe R, Yamagishi S. AGE-RAGE system and carcinogenesis. Curr Pharm Des. 2008; 14:940–45.

- 15.- Takeuchi M, Yamagishi S. Involvement of toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009; 16:845–58.
- 16.- Prasad K. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and cardiovascular disease. *Int J Angiol.* 2006; 15:57–68.
- 17.- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, et al. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1498:99–111.
- 18.- Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, et al. 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.
- 19.- Chen J, Song M, Yu S, et al. Advanced glycation endproducts alter functions and promote apoptosis in endothelial progenitor cells through receptor for advanced glycation endproducts mediate overpression of cell oxidant stress. *Mol Cell Biochem.* 2010; 335:137–46.
- 20.- Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S-I, et al. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *The J Biol Chem.* 2000; 275:25781–90.
- 21.- Basta G, Lazzerini G, Massaro M, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation.* 2002; 105:816–22.
- 22.- Soro-Paavonen A, Watson AMD, Li J, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes.* 2008; 57:2461–69.
- 23.- Maeda S, Matsui T, Ojima A, et al. Sulforaphane inhibits advanced glycation end product-induced pericyte damage by reducing expression of receptor for advanced glycation end products. *Nutr Res.* 2014; 34:807–13.
- 24.- Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis.* 2008; 196: 9-21.
- 25.- Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM, et al. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): a formidable force in the pathogenesis of the cardiovascular complications of diabetes & aging. *Curr Mol Med.* 2007; 7:699-710.
- 26.- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J.* 2003; 370:1097–109.

- 27.-** Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. The role of AGEs in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 2008; 14:979–86.
- 28.-** Tesch GH, Lim KH. Recent insights into diabetic renal injury from the db/db mouse model of type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; 300: F301–F310.
- 29.-** Choi KM, Yoo HJ, Kim HY, et al. Association between endogenous secretory RAGE, inflammatory markers and arterial stiffness. *Int J Cardiol.* 2009; 132:96–101.
- 30.-** Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* 2008; 22:3716–27.
- 31.-** Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, et al. Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms—a result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1630:1–6.
- 32.-** Cai W, Torreggiani M, Zhu L, et al. AGER1 regulates endothelial cell NADPH oxidase-dependent oxidant stress via PKC-delta: implications for vascular disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010; 298:C624–C634.
- 33.-** Zhu W, Sano H, Nagai R, et al. The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280:1183–88.
- 34.-** Henle T. AGEs in foods: Do they play a role in uremia? *Kidney Int.* 2003; 63:S145 –S147.
- 35.-** Takata K, Horiuchi S, Araki N, et al. Endocytic uptake of nonenzymatically glycosylated proteins is mediated by a scavenger receptor for aldehyde-modified proteins. *J Biol Chem.* 1988; 263:14819-25.
- 36.-** Araki N, Higashi T, Mori 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.
- 37.-** Horiuchi S, Higashi T, Ikeda K, et al. Advanced glycation end products and their recognition by macrophage and macrophage-derived cells. *Diabetes.* 1996; 45 Suppl 3:S73-76.
- 38.-** Svistounov D, Smedsrod B. Hepatic clearance of advanced glycation end products (AGEs): myth or truth? *J Hepatol.* 2004; 41: 1038-40.
- 39.-** Lapolla A, Fedele D, Seraglia R, et al. The role of mass spectrometry in the study of non-enzymatic protein glycation in diabetes: an update. *Mass Spectrom Rev.* 2006; 25: 775-97.

- 40.-** Gugliucci A, Mehlhaff K, Kinugasa E, 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.
- 41.-** Bucala R, Makita Z, Vega G, 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; 91:9441-45.
- 42.-** Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, et al. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *J Biol Chem*. 2002; 277:20309–15.
- 43.-** Ghayur MN, Krepinsky JC, Janssen LJ. Contractility of the renal glomerulus and mesangial cells: Lingering doubts and strategies for the future. *Med Hypotheses Res*. 2008; 4:1–9.
- 44.-** Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, et al. Advanced glycation end products inhibit de novo protein synthesis and induce TGF-beta overexpression in proximal tubular cells. *Kidney Int*. 2003; 63:464–73.
- 45.-** 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.
- 46.-** Kohn RR, Cerami A, Monnier VM. Collagen aging in vitro by nonenzymatic glycosylation and browning. *Diabetes*. 1984; 33:57-59.
- 47.-** Yamagishi S-C, Yonekura H, Yamamoto Y, et al. Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. *J Biol Chem*. 1997; 272:8723-30.
- 48.-** Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, 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.
- 49.-** Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) induced activation of NF- κ B is suppressed by α -lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*. 1997; 46:1481–90.
- 50.-** Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, et al. Vascular hypertrophy in experimental diabetes — Role of advanced glycation end products. *J Clin Invest*. 1997; 99: 1016-27.
- 51.-** Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, et al. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 6434-38.
- 52.-** Bucala R, Makita Z, Vega G, et al. Modification of LDL by advanced glycosylation endproducts contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:9441-45.

- 53.-** Dobrian A, Lazar V, Tirziu D, et al. Increased macrophage uptake of irreversibly glycated albumin modified-low density lipoproteins of normal and diabetic subjects is mediated by non-saturable mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1317: 5-14.
- 54.-** Miyata S, Liu BP, Shoda H, et al. Accumulation of pyrrolidine modified albumin in phagocytes due to reduced degradation by lysosomal enzymes. *J Biol Chem*. 1997; 272: 4037-42.
- 55.-** Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, et al. Advanced glycation endproducts induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:11704-08.
- 56.-** Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988; 318:1315-21.
- 57.-** 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*. 1996; 97:1422-28.
- 58.-** Kirstein M, Aston C, Hintz R, et al. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycation end product-modified proteins. *J Clin Invest*. 1992; 90:439-46.
- 59.-** Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, et al. Cachectin/TNF and IL1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodelling. *Science*. 1988; 240: 1546-48.
- 60.-** Yang CW, Vlassara H, Peten EP, et al. Advanced glycation endproducts upregulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:9436-40.
- 61.-** Imani F, Horii Y, Suthanthiran M, et al. Advanced glycosylation endproduct-specific receptors on human and rat T-lymphocytes mediate synthesis of interferon gamma: role in tissue remodeling. *J Exp Med*. 1993; 178:2165-72.
- 62.-** Esposito C, Gerlach H, Brett J, et al. Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med*. 1989; 170:1387-407.
- 63.-** Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation*. 1997; 96:2262-71.
- 64.-** Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*. 1992; 267:14987-97.

- 65.-** Prasad K, Mishra M. AGE-RAGE Stress, Stressors, and Antistressors in Health and Disease. *Int J Angiol.* 2018; 27:001-12.
- 66.-** Hogan M, Cerami A, Bucala R. Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. *J Clin Invest.* 1992; 90:1110-15.
- 67.-** Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biological and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest.* 1994; 70:138-51.
- 68.-** Ahmad MS, Kimhofer T, Ahmad S, et al. Ethnicity and skin autofluorescence-based risk-engines for cardiovascular disease and diabetes mellitus. *PLoS One.* 2017; 12:e0185175.
- 69.-** Schmidt AM, Hori O, Chen JX, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. *J Clin Invest.* 1995; 96: 1395-403.
- 70.-** Vlassara H, Fuh H, Donnelly T, et al. Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med.* 1995; 1:447-56.
- 71.-** Skolnik EY, Yang Z, Makita Z, et al. Human and rat mesangial receptors for glucose-modified proteins: potential role in kidney tissue remodelling and diabetic nephropathy. *J Exp Med.* 1991; 174:931-39.
- 72.-** Doi T, Vlassara H, Kirsstein M, et al. Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:2873-77.
- 73.-** Ducrocq R, Bachour H, Belkhodja R, et al. Evidence for nonenzymatic glycation of antithrombin III in diabetic patients. *Clin Chem.* 1985; 31:338-39.
- 74.-** Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycation endproducts quench nitrite oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest.* 1991; 87:432-38.
- 75.-** Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, 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 USA.* 1994; 91:7742-46.
- 76.-** Kirsstein M, Brett J, Radoff S, et al. Advanced protein glycosylation induced transendothelial monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease and diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 9010-14.

- 77.-** Schmidt AM, Yan SD, Brett J, et al. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest.* 1993; 91:2155-68.
- 78.-** Bierhaus A, Zhang Y, Deng Y, et al. Mechanism of the tumor necrosis factor alpha-mediated induction of endothelial tissue factor. *J Biol Chem.* 1995; 270:26419-32.
- 79.-** Bann HF, Higgins PJ. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science.* 1981; 213:222-24.
- 80.-** Reiser KM, Amigable MA, Last JA. Nonenzymatic glycation of type I collagen: the effects of aging on preferential glycation sites. *J Biol Chem.* 1992; 267:24207-16.
- 81.-** Stitt AW. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Exp Mol Pathol.* 2003; 75:95-108.
- 82.-** Daamen WF, Veerkamp JH, van Hest JCM, et al. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials.* 2007; 28:4378-98.
- 83.-** Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J.* 1993; 7:1208-18.
- 84.-** Powell JT, Vine N, Crossman M. On the accumulation of D -aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta. *Atherosclerosis.* 1992; 97:201-08.
- 85.-** Sohal RS. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging Clin Exp Res.* 1993; 5:3-17.
- 86.-** Sohal RS, Orr WC. The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52:539-55.
- 87.-** Sohal RS, Allen RG. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging; a unifying hypothesis. *Exp Ger.* 1990; 25:499-522.
- 88.-** Wells-Knecht M, Thorpe SR, Baynes JW. Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry.* 1995; 34: 15134-41.
- 89.-** Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, et al. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther.* 2010; 12:399-403.
- 90.-** Lutgers HL, Graaff R, Links TP, et al. Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2006; 29:2654-59.
- 91.-** Miyata T, Wada Y, Cai Z, et al. Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int.* 1997; 51:1170-81.

- 92.-** Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, et al. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1993; 91: 2463-69.
- 93.-** Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PH, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia.* 2004; 47:1324–30.
- 94.-** den Hollander NC, Mulder DJ, Graaff R, et al. Advanced glycation end products and the absence of premature atherosclerosis in glycogen storage disease Ia. *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30:916–923.
- 95.-** Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:3687–93.
- 96.-** Meerwaldt R, Links T, Graaff R, et al. Simple noninvasive measurement of skin autofluorescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1043:290-98.
- 97.-** McIntyre NJ, Fluck RJ, McIntyre et al. Skin autofluorescence and the association with renal and cardiovascular risk factors in chronic kidney disease stage 3. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6:2356–63.
- 98.-** Smit AJ, Gerrits EG. Skin autofluorescence as a measure of advanced glycation endproduct deposition: a novel risk marker in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010; 19:527–33.
- 99.-** Banegas JR, Villar F, Graciani A, et al. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España. *Rev Esp Cardiol.* 2006; 6:3-12.
- 100.-** Villar AF. Cardiovascular prevention in Spain. Promoting the use of recommendations. *Rev Esp Salud Publica.* 2004; 78:421-34.
- 101.-** Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J.* 2003; 24:987-1003.
- 102.-** De Backer G, Ambrosioni E, Broch-Johnsen K, et al. Executive summary. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J.* 2003; 24:1601-10.
- 103.-** Brotons C, Royo-Bordonada MA, Álvarez-Sala L, et al. Comité Español Interdisciplinario para la Prevención Cardiovascular (CEIPC). Adaptación española de la Guía Europea de Prevención Cardiovascular. *Rev Esp Salud Pública.* 2004; 78:435-38.
- 104.-** Marrugat J, Subirana I, Comín E et al. Validity of an adaptation of the Framingham cardiovascular risk function: the VERIFICA Study. *J Epidemiol Community Health.* 2007; 61: 40-47.

- 105.-** Mulder DJ, van Haelst PL, Graaff R, et al. Skin autofluorescence is elevated in acute myocardial infarction and is associated with the one-year incidence of major adverse cardiac events. *Netherlands Heart Journal*. 2009;17:162-68.
- 106.-** Bos DC, de Ranitz-Greven WL, de Valk HW. Advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence and diabetes complications: a systematic review. *Diabetes Technol Ther*. 2011; 13:773-79.
- 107.-** Fraser SDS, Roderick PJ, McIntyre NJ, et al. Skin Autofluorescence and All-Cause Mortality in Stage 3 CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014; 9:1361-68.
- 108.-** Siriopol D, Hogas S, Veisa G, et al. Tissue advanced glycation end products (AGEs), measured by skin autofluorescence, predict mortality in peritoneal dialysis. *Int Urol Nephrol*. 2015; 47:563-69.
- 109.-** Mácsai E, Benke A, Kiss I. Skin Autofluorescence and Mortality in Patients on Peritoneal Dialysis. *Medicine*. 2015; 94:e1933.
- 110.-** Kume S, Takeya M, Mori T, et al. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol*. 1995; 147:654–67.
- 111.-** Nerlich AG, Schleicher ED. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in atherosclerotic vascular lesions as a marker for local oxidative stress. *Atherosclerosis*. 1999; 144:41–47.
- 112.-** Zhou YJ, Wang JH, Zhang J. Hepatocyte growth factor protects human endothelial cells against advanced glycation end products-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 344:658–66.
- 113.-** Li Y, Li J, Cui L, et al. Inhibitory effect of atorvastatin on AGE-induced HCAEC apoptosis by upregulating HSF-1 protein. *Int J Biol Macromol*. 2013; 57:259–64.
- 114.-** Chen J, Song M, Yu S, et al. Advanced glycation endproducts alter functions and promote apoptosis in endothelial progenitor cells through receptor for advanced glycation endproducts mediate overexpression of cell oxidant stress. *Mol Cell Biochem*. 2010; 335:137–46.
- 115.-** Inagaki Y, Yamagishi S, Okamoto T, et al. Pigment epithelium-derived factor prevents advanced glycation end products-induced monocyte chemoattractant protein-1 production in microvascular endothelial cells by suppressing intracellular reactive oxygen species generation. *Diabetologia*. 2003; 46:284–87.
- 116.-** Vlassara H, Fuh H, Donnelly T, et al. Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med*. 1995; 1:447–56.

- 117.-** Wautier JL, Wautier MP. Blood cells and vascular cell interactions in diabetes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2001; 25:49-53.
- 118.-** Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced up-regulation of VCAM-1 mRNA levels in endothelial cells by suppressing AGE receptor (RAGE) expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391:1405–08.
- 119.-** Ishibashi Y, Matsui T, Maeda S, et al. Advanced glycation end products evoke endothelial cell damage by stimulating soluble dipeptidyl peptidase-4 production and its interaction with mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Cardiovasc. Diabetol.* 2013; 12:125–25.
- 120.-** Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, et al. Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia.* 1998; 41:1435–41.
- 121.-** Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, et al. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor- κ B in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes.* 2000; 49:1561–70.
- 122.-** Stitt AW, Jenkins AJ, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002; 11:1205-23.
- 123.-** Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, et al. Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes.* 1998; 47:945–52.
- 124.-** Barbato JE, Tzeng E. Nitric oxide and arterial disease. *J. Vasc. Surg.* 2004; 40:187–93.
- 125.-** Hanssen NM, Wouters K, Huijberts MS, et al. Higher levels of advanced glycation endproducts in human carotid atherosclerotic plaques are associated with a rupture-prone phenotype. *Eur Heart J.* 2014; 35:1137-46.
- 126.-** Furber JD. Extracellular glycation crosslinks: prospects for removal. *Rejuvenation Res* 2006; 9:274–78.
- 127.-** Loomans CJ, Dao HH, van Zonneveld AJ, et al. Is endothelial progenitor cell dysfunction involved in altered angiogenic processes in patients with hypertension? *Curr Hypertens Rep.* 2004; 6:51–54.
- 128.-** Thomas MC, Forbes JM, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy. *Am J Ther* 2005; 12:562-72.
- 129.-** Kalousova M, Zima T, Tesar V, et al. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutat Res.* 2005; 579:37-46.

- 130.-** Saito A, Takeda T, Sato K, et al. Significance of proximal tubular metabolism of advanced glycation end products in kidney diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1043:637-43.
- 131.-** Jensen LJ, Ostergaard J, Flyvbjerg A. AGE-RAGE and AGE Cross-link interaction: important players in the pathogenesis of diabetic kidney disease. *Horm Metab Res.* 2005; 37:26-34.
- 132.-** Bohlender JM, Franke S, Stein G, et al. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289:F645-659.
- 133.-** Agalou S, Ahmed N, Babaei-Jadidi R, et al. Profound mishandling of protein glycation degradation products in uremia and dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1471–85.
- 134.-** Šebeková K, Faist V, Hofmann T, et al. Effects of a diet rich in advanced glycation end products in the rat remnant kidney model. *Am. J. Kidney Dis.* 2003; 41:S48–S51.
- 135.-** Šebeková K, Hofmann T, Boor P, et al. Renal effects of oral Maillard reaction product load in the form of bread crusts in healthy and subtotaly nephrectomized rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1043:482–91.
- 136.-** Zheng F, He C, Cai W, et al. Prevention of diabetic nephropathy in mice by a diet low in glycooxidation products. *Diabetes Metab Res Rev.* 2002; 18:224–37.
- 137.-** Somoza V, Lindenmeier M, Hofmann T, et al. Dietary bread crust advanced glycation end products bind to the receptor for AGEs in HEK-293 kidney cells but are rapidly excreted after oral administration to healthy and subtotaly nephrectomized rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1043:492–500.
- 138.-** Khan ZA, Farhangkhoe H, Chakrabarti S. Towards newer molecular targets for chronic diabetic complications. *Curr Vasc Pharmacol.* 2006; 4:45-57.
- 139.-** Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J.* 2003; 375:581–92.
- 140.-** Throckmorton DC, Brogden AP, Min B, et al. PDGF and TGF- β mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. *Kidney Int.* 1995; 48:111–17.
- 141.-** Sasai Y, Iwakawa K, Yanagida K, et al. Advanced glycation endproducts stimulate renal epithelial cells to release chemokines that recruit macrophages, leading to renal fibrosis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76:1741–45.

- 142.-** Yang CW, Vlassara H, Peten EP, et al. Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:9436–40.
- 143.-** Feng JX, Hou FF, Liang M, et al. Restricted intake of dietary advanced glycation end products retards renal progression in the remnant kidney model. *Kidney Int*. 2007; 71:901–11.
- 144.-** Stenvinkel P, Alvestrand A. Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. *Semin Dial*. 2002; 15:329–37.
- 145.-** Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, et al. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med*. 2004; 164:659-63.
- 146.-** Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013; 3:1-150.
- 147.-** Sicree R, Shaw JE, Zimmet PZ. The global burden of diabetes En: Gan D, editor. *Diabetes Atlas*. 2nd ed., Brussels: International Diabetes Federation; 2003; 15-71.
- 148.-** The global challenge of diabetes. *Lancet*. 2008; 371:23.
- 149.-** Soriguer F, Goday A, Boch A, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain. The Di@bet.es Study. *Diabetologia* 2012; 55:88-93.
- 150.-** Muggeo M. Accelerated complications in type 2 diabetes mellitus: the need for greater awareness and earlier detection. *Diabet Med*. 1998; 15:60-62.
- 151.-** Crespo C, Brosa M, Soria-Juan A, et al. Costes directos de la diabetes mellitus y de sus complicaciones en España (Estudio SECCAID: Spain estimated cost Ciberdem-Cabimer in Diabetes). *Av Diabetol*. 2013; 29:182-89
- 152.-** Monnier VM, Sell DR, Genuth S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. *Ann. NY Acad. Sci*. 2005; 1043:567–81.
- 153.-** Gerrits EG, Lutgers HL, Kleefstra N, et al. Skin autofluorescence: a tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications. *Diabetes Care*. 2008; 31:517–21.
- 154.-** Wautier M, Massin P, Guillausseau P, et al. N(carboxymethyl) lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab*. 2003; 29:44–52.
- 155.-** Furst J, Bandeira L, Fan W, et al. Advanced Glycation Endproducts and Bone Material Strength in Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016; 101:2502-10.

- 156.-** Fosmark DS, Torjesen PA, Kilhovd BK, et al. Increased serum levels of the specific advanced glycation end product methylglyoxal-derived hydroimidazolone are associated with retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2006; 55:232–36.
- 157.-** Ono Y, Aoki S, Ohnishi K, et al. Increased serum levels of advanced glycation end-products and diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 1998; 41:131–37.
- 158.-** Peng X, Ma J, Chen F, et al. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food Funct* 2011; 2:289-301.
- 159.-** Jack M, Wright D. Role of advanced glycation endproducts and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. *Transl Res*. 2012; 159:355-65.
- 160.-** Karmakar PS, Goswami RP. Advanced glycation end products (AGEs): it's role in the pathogenesis of diabetic complications. *Med Update* 2012; 22:277-82.
- 161.-** Boehm B, Schilling S, Rosinger S, et al. Elevated serum levels of Nε-carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, are associated with proliferative diabetic retinopathy and macular oedema. *Diabetologia*. 2004; 47:1376–79.
- 162.-** Kandarakis SA, Piperi C, Topouzis F, et al. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2014; 42:85-102.
- 163.-** Kakehashi A, Inoda S, Mameuda C, et al. Relationship among VEGF, VEGF receptor, AGEs, and macrophages in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008; 79:438-45.
- 164.-** Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Poc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:6474–79.
- 165.-** He C, Sabol J, Mitsuhashi T, et al. Dietary glycotoxins: inhibition of reactive products by aminoquanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. *Diabetes*. 1999; 48:1308–15.
- 166.-** Bailey AJ. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev*. 2001;122:735-55.
- 167.-** Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; 67:3–21.
- 168.-** Hitsumoto T. Clinical impact of skin autofluorescence on high-sensitivity troponin T in hypertensive patients. *Clin Hypertens*. 2017; 23:19.
- 169.-** Stamler J, Vaccaro O, Neaton J, et al. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care*. 1993; 16: 434-444.

- 170.-** Collaboration E.R.F. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010; 375:2215–22.
- 171.-** American Diabetes Association. Consensus Statement. Role of cardiovascular risk factors in prevention and treatment of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care*. 1993; 16: 72-78.
- 172.-** Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the second joint task force of European and other societies on coronary prevention. *Eur Heart J*. 1998; 19:1434-1503.
- 173.-** Joint British recommendations on prevention of coronary heart disease in clinical practice. British Cardiac Society, British Hyperlipidaemia Association, British Hypertension Society, endorsed by the British Diabetic Association. *Heart*. 1998; 80:S1-29.
- 174.-** Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, et al. Diabetes and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 1999; 100:1134-46.
- 175.-** Wilson PWF, D’Agostino RB, Levy D, et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998; 97:1837-47.
- 176.-** Lutgers HL, et al. Skin autofluorescence provides additional information to the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) risk score for the estimation of cardiovascular prognosis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2009; 52:789-97.
- 177.-** Olansky L. Advances in diabetes for the millennium: chronic microvascular complications of diabetes. *MedGenMed*. 2004; 6:14.
- 178.-** Noordzij MJ, Mulder DJ, Oomen PH, et al. Skin autofluorescence and risk of micro- and macrovascular complications in patients with Type 2 diabetes mellitus-a multi-centre study. *Diabet Med*. 2012; 29:1556-61.
- 179.-** den Dekker MA, Zwieters M, van den Heuvel ER, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive marker for AGE accumulation, is associated with the degree of atherosclerosis. *PloS one*. 2013; 8:e83084.
- 180.-** Del Turco S, Basta G. An update on advanced glycation endproducts and atherosclerosis. *BioFactors*. 2012; 38:266–274.
- 181.-** Aso Y, Inukai T, Tayama K, et al. Serum concentrations of advanced glycation endproducts are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2000; 37:87–92.

- 182.-** Kiuchi K, Nejima J, Takano T, et al. Increased serum concentrations of advanced glycation end products: A marker of coronary artery disease activity in type 2 diabetic patients. *Heart*. 2001; 85:87–91.
- 183.-** Meerwaldt R, Lutgers HL, Links TP, et al. Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes. *Diabetes Care*. 2007; 30:107–112.
- 184.-** Vracko R, Thorning D, Huang TW. Basal lamina of alveolar epithelium and capillaries: quantitative changes with aging and in diabetes mellitus. *Am Rev Respir Dis*. 1979; 120:973-83.
- 185.-** Kodolova IM, Lysenko IV, Saltykov BB. Changes in the lung in diabetes mellitus. *Arkh Patol*. 1982; 44:35-40.
- 186.-** Sandler M. Is the lung a “target organ” in diabetes mellitus?”. *Arch Intern Med*. 1990; 150:1385-1388.
- 187.-** Fariña J, Furió V, Fernández-Acereño MJ, et al. Nodular fibrosis of the lung in diabetes mellitus. *Virchows Arch*. 1995; 427:61-63.
- 188.-** Nicolaie T, Zavoianu C, Nuta P. Pulmonary involvement in diabetes mellitus. *Rom J Intern Med*. 2003; 41:365-74.
- 189.-** Weynand B, Jonckheere A, Frans A, et al. Diabetes mellitus induces a thickening of the pulmonary basal lamina. *Respiration*. 1999; 66:14-19.
- 190.-** Barrett-Connor E, Frette C. NIDDM, impaired glucose tolerance, and pulmonary function in older adults. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care*. 1996; 19:1441-1444.
- 191.-** Davis TME, Knuiman M, Kendall P, et al. Reduced pulmonary function and its associations in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000; 50:153–59.
- 192.-** Walter RE, Beiser A, Givelber RJ, et al. Association between glycemic state and lung function. The Framingham Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167:911-16.
- 193.-** Lange P, Parner J, Schnohr P, et al. Copenhagen City Heart Study: longitudinal analysis of ventilatory capacity in diabetic and non diabetic adults. *Eur Respir J*. 2002; 20:1406-12.
- 194.-** Yeh HC, Punjabi NM, Wang NY, et al. Cross-sectional and prospective study of lung function in adults with type 2 diabetes. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Diabetes Care*. 2008; 31:741-46.
- 195.-** Chance WW, Rhee C, Yilmaz C, et al. Diminished alveolar microvascular reserves in type 2 diabetes reflect systemic microangiopathy. *Diabetes Care*. 2008; 31:1596-601.

- 196.-** Sun Z, Liu L, Liu N, et al. Muscular response and adaptation to diabetes mellitus. *Front Biosci.* 2008; 13:4765-94.
- 197.-** Lazarus R, Sparrow D, Weiss ST. Handgrip strength and insulin levels: cross-sectional and prospective associations in the Normative Aging Study. *Metabolism.* 1997; 46:1266-69.
- 198.-** Sin DD, Man SF. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation.* 2003; 107:1514-19.
- 199.-** Lecube A, Sampol G, Muñoz X, et al. TNF- α system and lung function impairment in obesity. *Cytokine.* 2011; 54:121-24.
- 200.-** Lecube A, Sampol G, Muñoz X et al. Insulin resistance is related to impaired lung function in morbidly obese women: a case-control study. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010; 26:639-45.
- 201.-** Fernández-Real JM, Chico B, Shiratori M, et al. Circulating surfactant protein A (SP-A), a marker of lung injury, is associated with insulin resistance. *Diabetes Care.* 2008; 31:958-63.
- 202.-** Lecube A, Simó R, Pallayova M, et al. Pulmonary Function and Sleep Breathing: Two New Targets for Type 2 Diabetes Care. *Endocr Rev.* 2017; 38:550-73.
- 203.-** Schnapf BM, Banks RA, Silverstein JH, et al. Pulmonary function in insulin-dependent diabetes mellitus with limited joint mobility. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 130:930-2.
- 204.-** Ramirez LC, Dal Nogare A, Hsia C, et al. Relationship between diabetes control and pulmonary function in insulin-independent diabetes mellitus. *Am J Med.* 1991; 91:371-76.
- 205.-** Popov D, Simionescu M. Alterations of lung structure in experimental diabetes, and diabetes associated with hyperlipidaemia in hamsters. *Eur Respir J.* 1997; 10:1850-1858.
- 206.-** Mir SH, Darzi MM. Histopathological abnormalities of prolonged alloxan-induced diabetes mellitus in rabbits. *Int J Exp Pathol.* 2009; 90:66-73.
- 207.-** Schinder SL, Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glycosylation of human skin collagen. *J Clin Invest.* 1981; 67:1630-5.
- 208.-** Reddy GK. Cross-linking in collagen by nonenzymatic glycation increases the matrix stiffness in rabbit Achilles tendon. *Exp Diabetes Res.* 2004; 5:143-53.
- 209.-** Laurent GJ. Lung collagen: More than scaffolding. *Thorax.* 1986; 41:418-28.

- 210.-** Kohn RR, Schnider SL. Glycosylation of human collagen. *Diabetes*.1982; 31:47–51.
- 211.-** Throckmorton DC, Brogden AP, Min B, et al. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. *Kidney Int*. 1995; 48:111–117.
- 212.-** Twigg SM, Cao Z, McLennan SV, et al. Renal connective tissue growth factor induction in experimental diabetes is prevented by aminoguanidine. *Endocrinology* 2002; 143:4907–15.
- 213.-** Yuen A, Laschinger C, Talior I, et al. Methylglyoxal-modified collagen promotes myofibroblast differentiation. *Matrix Biol*. 2010; 29:537–48.
- 214.-** Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54:1615–25.
- 215.-** Ota C, Ishizawa K, Yamada M, et al. Receptor for advanced glycation end products expressed on alveolar epithelial cells is the main target for hyperoxia-induced lung injury. *Respir Investig*. 2016; 54:98–108.
- 216.-** Mukherjee TK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR. Implication of receptor for advanced glycation end product (RAGE) in pulmonary health and pathophysiology. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 162:210–215.
- 217.-** Obesity and overweight. World health organization. (Accessed in May 2016, 20, at <http://www.who.int/topics/obesity/en>).
- 218.-** James WPT. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med* 2008; 263:336-52.
- 219.-** Nguyen DM, El-Serag HB. The epidemiology of obesity. *Gastroenterol Clin North Am*. 2010; 39:1-7.
- 220.-** Stice E, Shaw H, Marti CN. A Meta-Analytic Review of Obesity Prevention Programs for Children and Adolescents: The Skinny on Interventions that Work. *Psychol Bull* 2006; 132:667-91.
- 221.-** The GBD 2013 Obesity Collaboration, Ng M, Fleming T, et al. Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. *Lancet*. 2014; 384:766-81.
- 222.-** Aranceta-Bartrina J, Pérez-Rodrigo C, Alberdi-Aresti G, et al. Prevalence of General Obesity and Abdominal Obesity in the Spanish Adult Population (Aged 25-64 Years) 2014-2015: The ENPE Study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016; 69:579-87.
- 223.-** Félix-Redondo FJ, Grau M, Baena-Díez JM, et al. Prevalence of obesity and associated cardiovascular risk: the DARIOS study. *BMC Public Health*. 2013; 13:542.

- 224.-** Lau DC, Douketis JD, Morrison KM, et al. 2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children (summary) CMAJ. 2007; 176:S1–S13.
- 225.-** Lecube A, Monereo S, Rubio M, et al. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la obesidad. Posicionamiento de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad de 2016. Endocrinol Diabetes Nutr. 2017; 64:15-22.
- 226.-** Blackburn GL, Walker WA. Science-based solutions to obesity: What are the roles of academia, government, industry, and health care? Am J Clin Nutr. 2005; 82:207S–210S.
- 227.-** Sundbom M. Laparoscopic revolution in bariatric surgery. World J Gastroenterol. 2014; 20:15135-43.
- 228.-** Paluszkiwicz R, Kalinowski P, Wroblewski T, et al. Prospective randomized clinical trial of laparoscopic sleeve gastrectomy versus open Roux-en-Y gastric bypass for the management of patients with morbid obesity. Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne. 2012;7:225-32.
- 229.-** Lecube A, de Hollanda A, Calañas A, et al. Trends in bariatric surgery in Spain in the twenty-first century: Baseline results and 1-month follow up of the RICIBA, a national registry. Obes Surg. 2016; 26:1836-42.
- 230.-** Puzziferri N, Roshek 3rd TB, Mayo HG, et al. Livingston Long-term follow-up after bariatric surgery: A systematic review. JAMA. 2014; 312:934-42.
- 231.-** Benaiges D, Más-Lorenzo A, Goday A, et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy: More than a restrictive bariatric surgery procedure? World J Gastroenterol. 2015; 21:11804-14.
- 232.-** Blüher M. The distinction of metabolically «healthy» from «unhealthy» obese individuals. Curr Opin Lipidol. 2010; 21:38-43.
- 233.-** Succurro E, Marini MA, Frontoni S, et al. Insulin secretion in metabolically obese, but normalweight, and in metabolically healthy but obese individuals. Obesity(Silver Spring). 2008;16:1881-1886.
- 234.-** Griera Borrás JL, Contreras Gilbert J. Síndrome metabólico: ¿finde la controversia? Rev Esp Obes. 2010; 8:69-74.
- 235.-** van Waateringe RP, Slagter SN, van der Klauw MM, et al. Lifestyle and clinical determinants of skin autofluorescence in a population-based cohort study. Eur J Clin Invest. 2016; 46:481-490.
- 236.-** Arsov S, Trajceska L, van Oeveren W, et al. The influence of body mass index on the accumulation of advanced glycation end products in hemodialysis patients. Eur J Clin Nutr. 2015; 69:309-313.

- 237.-** den Engelsen C, van den Donk M, Gorter KJ, et al. Advanced glycation end products measured by skin autofluorescence in a population with central obesity. *Dermato endocrinol.* 2012; 4:33-38.
- 238.-** Betriu À, Farràs C, Abajo M, et al. Randomised intervention study to assess the prevalence of subclinical vascular disease and hidden kidney disease and its impact on morbidity and mortality: The ILERVAS project. *Nefrologia.* 2016 vol: 36 (4) pp: 389-96.
- 239.-** Vilahur G, Badimon J, Bugiardini R, et al. Perspectives: the burden of cardiovascular risk factors and coronary heart disease in Europe and worldwide. *Eur Heart J Supplements.* 2014; 16. A7-A11.
- 240.-** McMahan CA, Gidding SS, Viikari JS, et al. Association of pathobiologic determinants of atherosclerosis in youth risk score and 15-year change in risk score with carotid artery intima-media thickness in young adults (from the Cardiovascular Risk in Young Finns Study). *Am J Cardiol.* 2007; 100:1124-29.
- 241.-** Berry JD, Liu K, Folsom AR, et al. Prevalence and progression of subclinical atherosclerosis in younger adults with low short-term but high lifetime estimated risk for cardiovascular disease: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study and Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation.* 2009; 119:382-89.
- 242.-** Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA Guideline for Assessment of Cardiovascular Risk in Asymptomatic Adults: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines developed in collaboration with the American Society. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 56:e50-103.
- 243.-** Zavodni AE, Wasserman BA, McClelland RL, et al. Carotid artery plaque morphology and composition in relation to incident cardiovascular events: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Radiology.* 2014; 271:381-389.
- 244.-** Gibson AO, Blaha MJ, Arnan MK, et al. Coronary artery calcium and incident cerebrovascular events in an asymptomatic cohort: the MESA study. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2014; 7:1108–1115.
- 245.-** Ajith TA, Vinodkumar P. Advanced glycation end products: association with the pathogenesis of diseases and the current therapeutic approaches. *Curr Clin Pharmacol* 2016; 11:118-127.
- 246.-** Sabetai MM, Tegos TJ, Nicolaidis AN, et al. Reproducibility of computer-quantified carotid plaque echogenicity: can we overcome the subjectivity? *Stroke.* 2000; 31:2189-96.
- 247.-** Touboul PJ, Hennerici G, Meairs S, et al. Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc Dis.* 2004; 18: 346-9.

- 248.-** Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American society of echocardiography carotid intima-media thickness task force endorsed by the society for vascular medicine. *J Am Soc Echocardiogr.* 2008; 21:93-111.
- 249.-** Tiozzo E, Gardener H, Hudson BI, et al. High-density lipoprotein subfractions and carotid plaque: The Northern Manhattan Study. *Atherosclerosis* 2014; 237:163-168.
- 250.-** Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009; 150:604-12.
- 251.-** Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, et al. Prevalence, vascular distribution, and multiterritorial extent of subclinical atherosclerosis in a middle-aged cohort: the PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) study. *Circulation.* 2015; 131:2104-13.
- 252.-** Belcaro G, Nicolaidis AN, Ramaswami G, et al. Carotid and femoral ultrasound morphology screening and cardiovascular events in low risk subjects: a 10-year follow-up study (the CAFES-CAVE study). *Atherosclerosis.* 2001; 156:379-87.
- 253.-** Rundek T, Arif H, Boden-Albala B, et al. Carotid plaque, a subclinical precursor of vascular events: the Northern Manhattan Study. *Neurology.* 2008; 70:1200-07.
- 254.-** Baber U, Mehran R, Sartori S, et al. Prevalence, impact and predictive value of detecting subclinical coronary and carotid atherosclerosis in asymptomatic adults: the BioImage Study. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 65:1065-74.
- 255.-** Janda K, Krzanowski M, Gajda M, et al. Vascular effects of advanced glycation end-products: content of immunohistochemically detected AGEs in radial artery samples as a predictor for arterial calcification and cardiovascular risk in asymptomatic patients with chronic kidney disease. *Dis Markers.* 2015; 2015:78.
- 256.-** van Eupen MG, Schram MT, van Sloten TT, et al. Skin autofluorescence and pentosidine are associated with aortic stiffening: The Maastricht study. *Hypertension.* 2016; 68:956-63.
- 257.-** Saremi A, Howell S, Schwenke DC, et al. VADT Investigators. Advanced Glycation End Products, Oxidation Products, and the Extent of Atherosclerosis During the VA Diabetes Trial and Follow-up Study. *Diabetes Care.* 2017; 40:591-98.
- 258.-** Xu L, Wang YR, Li PC, et al. Advanced glycation end products increase lipids accumulation in macrophages through upregulation of receptor of advanced glycation end products: increasing uptake, esterification and decreasing efflux of cholesterol. *Lipids Health Dis.* 2016; 15:161.

- 259.-** Schmidt AM, Hasu M, Popov D, et al. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:8807-11.
- 260.-** Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008; 196:9-21.
- 261.-** Barnett PA, Spence JD, Manuck SB, et al. Psychological stress and the progression of carotid artery disease. *J Hypertens*. 1997; 15:49-55.
- 262.-** Semba RD, Bandinelli S, et al. Plasma carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, and all-cause and cardiovascular disease mortality in older community-dwelling adults. *J Am Geriatr*. 2009; 57:1874-80.
- 263.-** Semba RD, Ferrucci L, Sun K, et al. Advanced glycation end products and their circulating receptors predict cardiovascular disease mortality in older community-dwelling women. *Aging Clin Exp Res*. 2009; 21:182-90.
- 264.-** Kilhovd BK, Juutilainen A, et al. Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes: A population-based 18 year follow-up study. *Diabetologia*. 2007; 50:1409-1417.
- 265.-** Nin JW, Jorsal A, Ferreira I, et al. Higher plasma levels of advanced glycation end products are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes: A 12-year follow-up study. *Diabetes Care*. 2011; 34:442-47.
- 266.-** Kizer JR, Benkeser D, Arnold AM, et al. Advanced glycation/glycoxidation endproduct carboxymethyl-lysine and incidence of coronary heart disease and stroke in older adults. *Atherosclerosis*. 2014; 235:116-21.
- 267.-** Hanssen NM, Engelen L, Ferreira I, et al. Plasma levels of advanced glycation endproducts N ϵ -(carboxymethyl)lysine, N ϵ -(carboxyethyl)lysine, and pentosidine are not independently associated with cardiovascular disease in individuals with or without type 2 diabetes: the Hoorn and CODAM studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98:E1369-E1373.
- 268.-** Busch M, Franke S, Muller A, et al. Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: Ages, total homocysteine and metabolites, and the c-reactive protein. *Kidney Int*. 2004; 66:338-47.
- 269.-** Mulder DJ, van Haelst PL, Gross S, et al. Skin autofluorescence is elevated in patients with stable coronary artery disease and is associated with serum levels of neopterin and the soluble receptor for advanced glycation end products. *Atherosclerosis*. 2008; 197:217-23.

- 270.-** de Vos LC, Noordzij MJ, Mulder DJ, et al. Skin autofluorescence as a measure of advanced glycation end products deposition is elevated in peripheral artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33:131-38.
- 271.-** van Waateringe RP, Slagter SN, van Beek AP, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive biomarker for advanced glycation end products, is associated with the metabolic syndrome and its individual components. *Diabetol Metab Syndr.* 2017; 9:42.
- 272.-** Velayoudom-Cephise FL, Rajaobelina K, Helmer C, et al. Skin autofluorescence predicts cardio-renal outcome in type 1 diabetes: a longitudinal study. *Cardiovasc Diabetol.* 2016; 15:127.
- 269.-** den Dekker MA, Zwiers M, van den Heuvel ER, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive marker for AGE accumulation, is associated with the degree of atherosclerosis. *PLoS One.* 2013; 8:e83084.
- 270.-** Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. The role of AGEs in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2008; 14:979–86.
- 271.-** Sakata N, Noma A, Yamamoto Y, et al. Modification of elastin by pentosidine is associated with the calcification of aortic media in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18:1601-09.
- 272.-** Loomis SJ, Chen Y, Sacks DB, et al. Cross-sectional Analysis of AGE-CML, sRAGE, and esRAGE with Diabetes and Cardiometabolic Risk Factors in a Community-Based Cohort. *Clin Chem.* 2017; 63:980-89.
- 273.-** Prasad K, Mishra M. Do Advanced Glycation End Products and Its Receptor Play a Role in Pathophysiology of Hypertension? *Int J Angiol.* 2017; 26:1-11.
- 274.-** Go AS, Chertow GM, Fan D, et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004; 351:1296–305.
- 275.-** Jiang J, Chen P, Chen J, et al. Accumulation of tissue advanced glycation end products correlated with glucose exposure dose and associated with cardiovascular morbidity in patients on peritoneal dialysis. *Atherosclerosis* 2012; 224:187–94.
- 276.-** Wang CC, Wang YC, Wang GJ, et al. Skin Autofluorescence Is Associated with Endothelial Dysfunction in Uremic Subjects on Hemodialysis. *PLoS One.* 2016 Jan 25;11(1):e0147771.
- 277.-** Lutgers HL, Graaff R, de Vries R, et al. Carotid artery intima media thickness associates with skin autofluorescence in non-diabetic subjects without clinically manifest cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest* 2010; 40: 812–7.
- 279.-** Rojas A, Morales MA. Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci.* 2004; 76:715–30.

- 280.-** Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, et al. Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes*. 1995; 44:824–29.
- 281.-** Beisswenger PJ, Howell SK, Russell GB, et al. Early progression of diabetic nephropathy correlates with methylglyoxal-derived advanced glycation end products. *Diabetes Care*. 2013; 36:3234–9.
- 282.-** Luo P, Peng H, Li C, et al. Advanced glycation end products induce glomerular endothelial cell hyperpermeability by upregulating matrix metalloproteinase activity. *Mol Med Rep*. 2015; 11:4447–53.
- 283.-** Senatus LM, Schmidt AM. The AGE-RAGE Axis: Implications for Age-Associated Arterial Diseases. *Front Genet*. 2017; 8:187.
- 284.-** Reiniger N, Lau K, McCalla D, et al. Deletion of the receptor for advanced glycation end products reduces glomerulosclerosis and preserves renal function in the diabetic OVE26 mouse. *Diabetes*. 2010; 59:2043–54.
- 285.-** Arsov S, Graaff R, van Oeveren W, et al. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin Chem Lab Med*. 2014; 52:11-20.
- 286.-** Tilert T, Dillon C, Paulose-Ram R, et al. Estimating the U.S. prevalence of chronic obstructive pulmonary disease using pre- and post-bronchodilator spirometry: the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2010. *Respiratory Research* 2013; 14:103.
- 287.-** Ueno H, Koyama H, Fukumoto S, et al. Advanced glycation end products, carotid atherosclerosis, and circulating endothelial progenitor cells in patients with end-stage renal disease. *Metabolism*. 2011; 60:453–59.
- 288.-** Fokkens BT, Smit AJ. Skin fluorescence as a clinical tool for non-invasive assessment of advanced glycation and long-term complications of diabetes. *Glycoconj J*. 2016; 33:527-35.
- 289.-** Da Moura Semedo C, Webb M, Waller H, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive marker of advanced glycation end products: clinical relevance and limitations. 2017; 93:289-94.
- 290.-** Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation end-products. *J Intern Med* 2002; 251: 87–101.
- 291.-** Vlassara H, Striker GE. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7: 526-39.
- 292.-** Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J*. 1977; 1:1645-48.

- 293.-** Lecube A, Simó R, Pallayova M, et al. Pulmonary function and sleep breathing: two new targets for type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2017; 38:550-73.
- 294.-** López-Cano C, Lecube A, García-Ramírez M, et al. Serum surfactant protein D as a biomarker for measuring lung involvement in obese type 2 diabetic patients. *JCEM.* 2017; 102:4109-16.
- 295.-** van den Borst B, Gosker HR, Zeegers MP, et al. Pulmonary function in diabetes. A metaanalysis. *Chest* 2010; 138: 393–406.
- 296.-** Klein OL, Krishnan JA, Glick S, et al. Systematic review of the association between lung function and Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2010; 27:977-87.
- 297.-** Schnapf BM, Banks RA, Silverstein JH et al. Pulmonary function in insulin-dependent diabetes mellitus with limited joint mobility. *Am Rev Respir Dis* 1984;130: 930–2.
- 298.-** Bentata R, Cougnard-Grégoire A, Delyfer MN, et al. Skin autofluorescence, renal insufficiency and retinopathy in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2017; 31:619-23.
- 299.-** Kerkeni M, Weiss IS, Jaisson S, et al. Increased serum concentrations of pentosidine are related to presence and severity of coronary artery disease. *Thromb Res.* 2014; 134:633-38.
- 300.-** Temma J, Matsuhisa M, Horie T, et al. Non-invasive measurement of skin autofluorescence as a beneficial surrogate marker for atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *J Med Invest* 2015; 62:126-29.
- 301.-** Chilelli NC, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a "glycoxidation-centric" point of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013; 23:913–19.
- 302.-** Lu J, Randell E, Han Y, et al. Increased plasma methylglyoxal level, inflammation, and vascular endothelial dysfunction in diabetic nephropathy. *Clin Biochem. The Canadian Society of Clinical Chemists.* 2011; 44:307–11.
- 303.-** Chabroux S, Canouï-Poitrine F, Reffet S, et al. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence in type 1 diabetics are associated with nephropathy, but not retinopathy. *Diabetes Metab.* 2010; 36:152-57.
- 304.-** Fokkens BT, Mulder DJ, Schalkwijk CG, et al. Vitreous advanced glycation endproducts and α -dicarbonyls in retinal detachment patients with type 2 diabetes mellitus and non-diabetic controls. *PLoS One,* 2017; 12:e0173379.
- 305.-** Yasuda M, Shimura M, Kunikata H, et al. Relationship of skin autofluorescence to severity of retinopathy in type 2 diabetes. *Curr Eye Res.* 2015; 40:338-45.

- 306.-** Vouillarmet J, Maucort-Boulch D, Michon P, et al. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence: a new marker of diabetic foot ulceration. *Diabetes Technol Ther.* 2013; 15:601-05.
- 307.-** Hoonhorst SJ, Lo Tam Loi AT, Hartman JE, et al. Advanced glycation end products in the skin are enhanced in COPD. *Metabolism.* 2014; 63:1149-56.
- 308.-** Hoonhorst SJ, Lo Tam Loi AT, Pouwels SD, et al. Advanced glycation endproducts and their receptor in different body compartments in COPD. *Respir Res.* 2016; 17:46.
- 309.-** John M, McKeever TM, Haddad MA, et al. Traditional and emerging indicators of cardiovascular risk in chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis.* 2016; 13:247-55.
- 310.-** Gopal P, Reynaert NL, Scheijen JL, et al. Plasma advanced glycation end-products and skin autofluorescence are increased in COPD. *Eur Respir J.* 2014; 43:430-38.
- 311.-** Wu L, Ma L, Nicholson LF, et al. Advanced glycation end products and its receptor (RAGE) are increased in patients with COPD. *Respir Med.* 2011; 105:329-36.
- 312.-** Fukami K, Yamagishi S, Okuda S. Role of AGEs-RAGE system in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2014; 20:2395–402.
- 313.-** Katsuoka F, Kawakami Y, Arai T, et al. Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 238:512-16.
- 314.-** Ota C, Ishizawa K, Yamada M, et al. Receptor for advanced glycation end products expressed on alveolar epithelial cells is the main target for hyperoxia-induced lung injury. *Respir Investig.* 2016; 54:98–108.
- 315.-** Mukherjee TK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR. Implication of receptor for advanced glycation end product (RAGE) in pulmonary health and pathophysiology. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008; 162:210–15.
- 316.-** Milutinovic PS, Alcorn JF, Englert JM, et al. The receptor for advanced glycaion end products is a central mediator of asthma pathogenesis. *Am J Pathol* 2012; 181:1215-25.
- 317.-** van der Heyden JC, Birnie E, Mul D, et al. Increased skin autofluorescence of children and adolescents with type 1 diabetes despite a well-controlled HbA1c: results from a cohort study. *BMC Endocr Disord.* 2016; 16:49.
- 318.-** Yoshioka K. Skin Autofluorescence is a Noninvasive Surrogate Marker for Diabetic Microvascular Complications and Carotid Intima-Media Thickness in Japanese Patients with Type 2 Diabetes: A Cross-sectional Study. *Diabetes Ther.* 2018; 9:75-85.

- 319.-** Lorenzi R, Pattou F, Beuscart JB, et al. Anti-sRAGE autoimmunity in obesity: downturn after bariatric surgery is independent of previous diabetic status. *Diabetes Metab.* 2014; 40:356-62.
- 320.-** den Engelsen C, van den Donk M, Gorter KJ, et al. Advanced glycation end products measured by skin autofluorescence in a population with central obesity. *Dermato endocrinol.* 2012; 4:33-8.
- 321.-** Sims EAH. Characterization of the syndromes of obesity. In: Brodoff BN, Bleicher SJ, editors. *Diabetes Mellitus and Obesity.* Williams & Wilkins; Baltimore, MD: 1982.pp.219–26.
- 322.-** Primeau V, Coderre L, Karelis AD et al. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int J Obes (Lond)* 2011; 35:971–81.
- 323.-** Samocha-Bonet D, Chisholm DJ, Tonks K, et al. Insulin-sensitive obesity in humans – a ‘favorable fat’ phenotype? *Trends Endocrinol Metab.* 2012; 23:116–124.
- 324.-** Stefan N, Häring H-U, Hu FB, et al. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2013; 1:152–62.
- 325.-** Roberson LL, Aneni EC, Maziak W, et al. Beyond BMI: The "Metabolically healthy obese" phenotype & its association with clinical/subclinical cardiovascular disease and all-cause mortality -- a systematic review. *BMC Public Health.* 2014; 14:14.
- 326.-** Sjöström L. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med.* 2013; 273:219-34.
- 327.-** Ramos-Leví AM, et al. Metabolic surgery: quo vadis?. *Endocrinol Nutr.* 2014; 61:35-46.
- 328.-** Lorenzi R, Pattou F, Beuscart JB, et al. Anti-sRAGE autoimmunity in obesity: downturn after bariatric surgery is independent of previous diabetic status. *Diabetes Metab.* 2014; 40:356-62.
- 329.-** Brix JM, Höllerl F, Kopp HP, et al. The soluble form of the receptor of advanced glycation endproducts increases after bariatric surgery in morbid obesity. *Int J Obes (Lond)* 2012; 36:1412-17.
- 330.-** Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2000; 275: 39027-31.
- 331.-** Siriopol D, Hogas S, Veisa G, et al. Tissue advanced glycation end products (AGEs), measured by skin autofluorescence, predict mortality in peritoneal dialysis. *Int Urol Nephrol.* 2015; 47:563-69.

- 332.-** Pories WJ, et al. Who would have thought it?. An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Annals of Surgery* 1995; 222:339-52.
- 333.-** van Waateringe RP, Mook-Kanamori MJ, Slagter SN, et al. The association between various smoking behaviors, cotinine biomarkers and skin autofluorescence, a marker for advanced glycation end product accumulation. *PLoS One*. 2017; 12:e0179330.
- 334.-** Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, et al. Effects of aMediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: A randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006; 145:1–11.
- 335.-** Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc*. 2003; 35:1381–95.
- 336.-** Baumgartner RW, Mattle HP, Schroth G. Assessment of $\geq 50\%$ and $< 50\%$ intracranial stenoses by transcranial color-coded duplex sonography. *Stroke*. 1999; 30:87-92.