

Trabajo de revisión

Glicosilaciones no enzimáticas de proteínas

CHEYLA ROMAY y CARLOS PASCUAL

Departamento de Bioquímica Clínica, Dirección de Diagnóstico y Evaluación de Medicamentos, CENIC, Avenida 25 y calle 158, Cubanacán, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en junio de 1987

INTRODUCCION

La unión no enzimática de glucosa u otros azúcares, con proteínas *in vivo* puede desempeñar un papel importante en fenómenos biológicos que incluyen modificación de actividad enzimática, susceptibilidad a proteólisis, reconocimiento molecular y endocitosis, modificación de la función de ácidos nucleicos, modificación en unión a moléculas regulatorias, etcétera..

Estos procesos forman parte del mecanismo de envejecimiento y de ciertas patologías como diabetes, aterosclerosis y diversos trastornos metabólicos.

En todos los casos, las glicosilaciones no enzimáticas comienzan con la unión de la glucosa al grupo *epsilon* amino de la lisina o grupo *alfa* amino N-terminal de la proteína, vía adición nucleofílica, con la formación de una base *schiff*; esta última, que es muy inestable, alcanza rápidamente un nivel de equilibrio *in vivo* de acuerdo con las concentraciones de glucosa existentes (figura 1). La velocidad de formación de la base *schiff* (K_1) es aproximadamente igual a su velocidad de disociación (K_{-1}). Durante un período de semanas ocurre una lenta reorganización de la base *schiff*, la cual conduce a la acumulación de un aducto azúcar-proteína estable, pero químicamente reversible: el producto Amadori (Higgins y Bunn, 1981).

Es importante señalar que existen dos tipos de productos de glicosilación no enzimática, en dependencia del tiempo de vida media de la proteína involucrada (figura 1). Proteínas de corta vida como las enzimas, albúmina y apolipoproteínas, pueden reaccionar con el azúcar y formar la base *schiff* a una velocidad que refleja la concentración ambiente de glucosa (Monnier y Cerami, 1983). En pocas semanas, a través de reagrupamientos químicos tiene lugar la formación de un aducto más estable, pero todavía reversible: el producto Amadori.

En contraste, proteínas cuyo recambio es mucho más lento, como el colágeno y el lente cristalino, acumulan diferentes productos de glicosilación no enzimática derivados de los productos Amadori por sucesivas reacciones químicas, que se desarrollan lentamente. Estos productos, llamados AGE (*Advanced Glycosylation End-Products*) son irreversibles y se acumulan durante todo el tiempo de vida de la proteína, dando lugar a significativos cambios estructurales y funcionales en la proteína. Recientemente se ha determinado la estructura de uno de estos compuestos AGE (Pongor *et al.*, 1984) y se ha desarrollado un método analítico preciso para su medición.

Proteínas con vida media de días a semanas:



Proteínas estructurales de larga vida media:

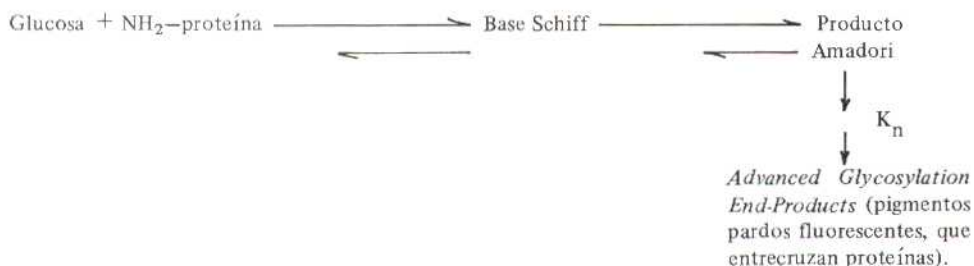


FIG. 1. Formación de los productos Amadori y los *Advanced Glycosylation End-products*. Los niveles de equilibrio de la base *schiff* y los productos Amadori se alcanzan en horas y semanas respectivamente, mientras que los AGE continúan acumulándose durante mayores períodos de tiempo.

Factores que determinan el grado de glicosilación no enzimática

Los factores que determinan el grado de glicosilación no enzimática son: pH, temperatura, concentraciones de glucosa y proteína y el tiempo de exposición de la proteína a la glucosa. *In vivo*, los factores más importantes son la concentración de glucosa y el tiempo de incubación. La duración de la hiperglicemia es crítica, no solo debido a que la concentración de los productos Amadori se incrementa en función del tiempo, alcanzándose más rápidamente el equilibrio, sino principalmente porque los AGE continúan acumulándose durante todo el tiempo de vida de las proteínas de bajo recambio.

In vitro, el pH afecta el grado de glicosilación. Se ha observado que a pH entre 7 y 9 aumenta la concentración de los productos Amadori. Esta observación es consecuente con la predicción química de que sólo grupos amino no cargados de la proteína pueden participar en este tipo de reacción de adición de glucosa.

El incremento de la temperatura produce *in vitro* una aceleración proporcional a la velocidad de formación de productos Amadori, similar a lo que ocurre en otros tipos de reacciones no enzimáticas.

La concentración de proteína y el medio ambiente que rodea al grupo amino son factores de interés fundamental en las glicosilaciones *in vitro*. A mayor concentración de proteína, aumenta el número absoluto de grupos amino potencialmente disponibles para reaccionar con la glucosa.

Este factor, así como el medio ambiente que rodea al grupo amino de la proteína, puede explicar la igualdad de patrones de glicosilación de grupos amino vistos en una proteína dada, así como las diferencias de susceptibilidad a la glicosilación no enzimática que se observa entre diferentes proteínas (Garlick y Mazer, 1983; Garlick *et al.*, 1983).

Procesos fisiológicos y glicosilaciones no enzimáticas

Las glicosilaciones no enzimáticas de proteínas se han observado en diversas estructuras biológicas como: hemoglobina, membrana eritrocítica, cristalino, membrana basal glomerular, mielina, tubulinas, fibrinógeno, colágeno, proteínas de arteria coronaria, lipoproteínas de baja densidad y albúmina (Romay y Pascual, 1987).

Las actividades de algunas enzimas y la unión de efectores o cofactores a moléculas reguladoras, pueden ser afectadas por las glicosilaciones no enzimáticas a pesar del alto recambio de estas proteínas en el organismo. El solo ataque de la glucosa a un residuo de lisina de un grupo *epsilon* amino, esencial para el normal funcionamiento del sitio activo, es suficiente para producir la inhibición de una enzima: tal es el caso de la ribonucleasa A, que al ser incubada por 24 horas con glucosa pierde el 50 por 100 de su actividad enzimática inicial (Eble *et al.*, 1983). Las proteasas sulfidrílicas papaina y catepsina B, pierden más del 70 por 100 de su actividad durante dos semanas sometidas a glicosilación no enzimática.

Hemoglobina glicosilada

La hemoglobina en individuos normales está formada por la Hb A₀ (90 por 100); Hb A₁ (5-8 por 100); Hb A₂ (2-5 por 100) y la Hb F (menos del 1 por 100), las cuales difieren unas de otras en la secuencia de aminoácidos de sus cadenas no *alfa* (Bunn *et al.*, 1976). La glicosilación de la Hb A por la glucosa u otros azúcares, es la unión no enzimática de estos o al grupo amino terminal de la cadena *beta* de la Hb A₀, dando como resultado la formación de Hb A₁. El mecanismo de formación y composición de estas proteínas post-transcripcionalmente modificadas, ha sido bien revisado (Bunn *et al.*, 1976; Bunn *et al.*, 1978; Bunn H., 1981a; Bunn H., 1981b; Rahbar, 1980; Mayer y Freedman, 1983). Existen diferentes subespecies de Hb A₁ (Hb A_{1a1}, Hb A_{1a2}, Hb A_{1b}, Hb A_{1c}) basados en los diferentes azúcares unidos a la Hb A₀. La Hb A_{1a1} y Hb A_{1a2} tienen fructosa 1,6 difosfato y glucosa 6 fosfato, respectivamente, unidos a la cadena *beta* del grupo amino terminal de la Hb A₀. La Hb A_{1b} se ha caracterizado parcialmente como un producto de deaminación de la Hb A₀. La Hb A_{1c} es la más abundante y más estudiada de las especies de Hb A₁, ella se forma por la unión de la D-glucosa a la valina N-terminal de una de las cadenas *beta* globina de la Hb A₀.

La glicosilación de la Hb A₀ no está limitada a los amino terminal de las cadenas *beta*, esta también puede ocurrir en otros sitios como los grupos amino terminal de las cadenas *alfa* y los residuos de lisina de las cadenas *alfa* y *beta* (Shapiro *et al.*, 1980).

La reactividad relativa de diferentes azúcares con la Hb depende mucho de la proporción en que se encuentre con su forma de aldehído. Los azúcares fosfato como la fructuosa 1,6 difosfato y la glucosa 6 fosfato, son relativamente más reactivos que la D-glucosa (Means y Chang, 1982; Bunn y Higgins, 1981).

Además de la glucosa y de los azúcares fosfato, otros compuestos que pueden acumularse a concentraciones superiores a lo normal durante algunas enfermedades, pueden también formar aductos con la Hb. La galactosa, por ejemplo, se ha encontrado formando aductos con la albúmina en pacientes con galactosemia (Urbanowski *et al.*, 1982). El cianato derivado de la urea puede también reaccionar con los grupos amino terminal de la Hb para formar Hb carbamida en pacientes urémicos (Flückiger *et al.*, 1981).

La glicosilación de la Hb es un proceso no enzimático, post-transcripcional, que se lleva a cabo lenta y continuamente a través del tiempo de vida de eritrocito (Bunn *et al.*, 1976).

La velocidad de glicosilación de la Hb está influenciada no solo por la concentración de glucosa del plasma y el tiempo de vida del eritrocito, sino también por la permeabilidad de los eritrocitos a la glucosa (Higgins *et al.*, 1982), el grado de oxigenación del eritrocito y la concentración de 2,3 difosfoglicerato en él (Smith *et al.*, 1982). La unión del 2,3 difosfoglicerato a la Hb en la regulación de su afinidad por el oxígeno se afecta cuando la Hb A₀ está glicosilada, alterando las propiedades funcionales de la Hb (Perutz, 1979; Mc Donald *et al.* 1979; Samaja *et al.*, 1982). La membrana del eritrocito humano es libremente permeable a la glucosa (Higgins *et al.*, 1982), por lo que la concentración de glucosa dentro del eritrocito es aproximadamente igual a la concentración de glucosa en el plasma, de esta forma, en la práctica la evaluación de la Hb A_{1c} nos proporciona una medida de cómo se comportó la glicemia durante los dos o tres meses anteriores a la determinación (Koenig *et al.* 1976), o sea, actúa como una especie de memoria molecular de utilidad para evaluar el control de los diabéticos.

AGE y proteínas estructurales

Dos tipos de entrecruzamiento se forman a partir de las glicosilaciones no enzimáticas de los grupos amino: el tipo de unión bisulfuro, producida por la oxidación de grupos sulfidrilo que normalmente no están expuestos y la formación de los *Advanced glycosylation end-products* que se forman sobre las proteínas que presentan bajo recambio, como el colágeno y la proteína del lente cristalino.

El colágeno de sujetos normales muestra un incremento en la acumulación de los AGE relacionada linealmente con la edad, además de un cambio en las propiedades mecánicas del mismo a causa del entrecruzamiento con otras proteínas (Cerami *et al.*, 1979; Monnier *et al.*, 1984; Andreassen *et al.*, 1981; Yue *et al.*, 1983).

La consecuencia más importante de la formación de los AGE en proteínas estructurales como el colágeno, es que los grupos reactivos generados pueden atrapar diferentes proteínas y desencadenar reacciones que producen daño al tejido. Por ejemplo, el colágeno glicosilado puede atrapar diferentes proteínas como IgG y albúmina, reteniendo estas su habilidad para formar complejos inmune *in situ* (Brownlee *et al.*, 1983), produciendo el daño de la membrana basal, la deposición de complejos de complemento activado (poly C₉) que atacan la membrana (Falk *et al.*, 1983) y la formación de depósitos discontinuos de inmunoglobulinas granulares o *lumpy-bumpy* (Cavallo *et al.*, 1983).

AGE y lipoproteínas

Otro aspecto importante de los productos de glicosilación avanzada de los componentes del tejido conectivo, es su rol potencial en la aterogénesis por el atrapamiento de lipoproteínas en la pared arterial. Estudios recientes indican que las LDL a una concentración de LDL-colesterol de 1 030 mg/l, se unen covalentemente al colágeno glicosilado, tres veces más de lo que lo hacen al colágeno normal (Brownlee *et al.*, 1985). Aunque las LDL tienen un recambio en el organismo bastante elevado, cuando estas son atrapadas por proteínas glicosiladas de larga vida media, como las de la pared arterial, pueden promover la acumulación de lípidos en la placa fibrosa; por otra parte, si estas LDL no difunden fuera de la íntima, esta inmovilización amplifica la formación de los AGE en la propia partícula de LDL. La posterior captación de LDL glicosilada por macrófagos, puede contribuir al proceso aterogénico por endocitosis de LDL modificadas, conduciendo a la formación de células espumosas, o mediante estimulación

de la secreción del factor de crecimiento derivado del macrófago, mitógenos de las células del músculo liso u otros productos derivados del macrófago (Cerami *et al.* 1985). Los *Advanced Glycosylation End-Products* pueden atrapar covalentemente proteínas del suero como la IgG, IgM, albúmina y LDL por entrecruzamientos derivados de la glucosa a la matriz extravascular. Este atrapamiento puede contribuir al cierre de los capilares en la retina y glomérulos, además de un estrechamiento arterial en la coronaria, cerebro y circulación periférica. De la misma forma, inmunoglobulinas atrapadas pueden contribuir al daño del tejido por los mecanismos inmunológicos clásicos.

AGE y macrófagos

Actualmente se conoce que el organismo humano posee un mecanismo para defenderse del daño producido por los productos de glicosilación avanzada; este mecanismo consiste en la presencia, en los macrófagos, de receptores de alta afinidad específicos para la captación de estos productos (Vlassara *et al.*, 1985). Estos receptores del macrófago pueden desempeñar un rol importante en la regulación del cambio de proteínas extracelulares y la eliminación de proteínas modificadas o envejecidas. Sin embargo, en individuos diabéticos, la excesiva formación de proteínas glicosiladas puede saturar la capacidad del sistema de receptores del macrófago.

AGE y ADN

Como los ácidos nucleicos son moléculas de larga vida media, estos pueden dar lugar a la formación de los *Advanced Glycosylation End-Products* que se acumulan durante el tiempo. De hecho, el ADN, como las proteínas, reacciona con la glucosa, especialmente en presencia de lisina (Bucala *et al.*, 1984). Se han logrado modificaciones del bacteriófago $\phi 1$ mediante reacciones con glucosa o glucosa 6 fosfato, que reducen su capacidad para "transfectar" a la *Escherichia coli*.

Los aductos formados entre la glucosa y el ADN pueden ser responsables de numerosos cambios que se producen con la edad en el ADN, como son aberraciones cromosómicas, rupturas en la molécula de ADN y deterioro en los mecanismos de reparación, replicación y transcripción (Saksela y Moorhead, 1963; Price *et al.*, 1971; Karran y Ormerod, 1973; Petes *et al.*, 1974; Berdyshev y Zhelabovskaya, 1972).

Glicosilación no enzimática y patogénesis de la diabetes

Durante los últimos años se ha establecido que existen dos mecanismos patofisiológicos generales, mediante los cuales la hiperglicemia conduce a daños irreversibles en diferentes tejidos en individuos diabéticos. Uno de estos mecanismos está relacionado con el flujo incrementado de diferentes rutas metabólicas que conduce a alteraciones en los niveles de numerosos metabolitos y a cambios cualitativos y cuantitativos en las glicoproteínas de membrana basal glomerular y proteoglicanos, alteraciones bioquímicas en la composición de la mielina de nervios periféricos, trastornos en la producción de prostanoïdes de plaquetas y anomalías en la secreción de hormonas (Viberti *et al.*, 1983; Greene, 1983).

El otro mecanismo consiste en la amplia glicosilación no enzimática de proteínas, y constituye la explicación bioquímica de numerosos procesos fisiopatológicos implicados en las complicaciones de los diabéticos por la hiperglicemia mantenida.

Los principales efectos bioquímicos de la glicosilación no enzimática en la diabetes incluye: inactivación enzimática, inhibición de la unión de moléculas regulatorias, entrecruzamiento de proteínas glicosiladas y atrapamiento de proteínas solubles, disminución de susceptibilidad a proteólisis, anomalías en la función de los ácidos nucleicos e incremento de la inmunogenicidad.

Los nuevos conocimientos sobre las glicosilaciones no enzimáticas pueden conducir a significativos avances en su diagnóstico y tratamiento. El aislamiento e identificación del primer *Advanced Glycosylation End-Products* (2-furoyl- 4(5)-(2-furanyl)- 1H -Imidazole), abre la posibilidad del desarrollo de métodos analíticos para su medición.

Desde el punto de vista terapéutico, se requieren nuevos agentes que interfieran directamente con los elementos que se forman producto de las glicosilaciones no enzimáticas y que producen daño celular. En este sentido se ha realizado un estudio preliminar con la aminoguanidina como agente que previene el entrecruzamiento de proteínas en la pared arterial y la formación de los *Advanced Glycosylation End-Products in vitro* y en animales de experimentación (Brownlee *et al* , 1986).

REFERENCIAS

- ANDREASSEN, T.; K. SEYER-HANSEN y A. J. BAILEY (1981). *Thermal stability, mechanical properties and reducible cross-links of rats tail tendon in experimental diabetes*. Biochim. Biophys. Acta 677: 313-317.
- BROWNLEE, M. y A. CERAMI (1981). *The biochemistry of the complications of diabetes mellitus*. Annu. Rev biochem. 50: 385-432.
- BROWNLEE, M.; S. PONGOR y A. CERAMI (1983). *Covalent attachment of soluble proteins by non-enzymatically collagen: Role in the in situ formation of immune complexes*. J. Exp. Med. 158: 1739-1744.
- BROWNLEE, M.; H. VLASSARA y A. CERAMI (1985). *Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low density lipoprotein*. Diabetes 34: 938-941.
- BROWNLEE, M.; H. VLASSARA; A. KOONEY; P. ULRICH y A. CERAMI (1986). *Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking*. Science 232: 1629-1632.
- BERDYSHEV, G. D. y S. M. ZHELABOVSKAYA (1972). *Composition, template properties and thermostability of liver chromatin from rats of various age at deproteinization by NaCl solutions*. Exp. Gerontol. 7: 321-330.
- BUNN, H. F.; D. N. HANEY; S. KAMIN, *et al.* (1976). *The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}*. J. Clin. Invest. 57: 1652-1659.
- BUNN, H. F.; K. H. GABBAY y P. M. GALLOP (1978). *The glycosylation of hemoglobin. Relevance to diabetes mellitus*. Science 200: 21-27.
- BUNN, H. F. (1981a). *Nonenzymatic glycosylation of protein: relevance to diabetes*. Am. J. Med. 70: 325-330.
- BUNN, H. F. (1981b). *Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic patients*. Diabetes 30: 613-617.
- BUNN, H. F. y P. J. HIGGINS (1981). *Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance*. Science 213: 222-224.
- BUCALA, R.; P. MODEL y A. CERAMI (1984). *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: 81: 105-109.
- CAVALLO, T.; J. A. PINTO; L. C. ABBOTT y S. RAJARAMAN (1983). *Immune complex disease complicating diabetic glomerulosclerosis*. Lab. Invest. 48: 13A.
- CERAMI, A.; V. J. STEVENS y V. M. MONNIER (1979): *Role of non-enzymatic glycosylation in the development of the sequelae of diabetes mellitus*. Metabolism 28: 431-439.
- CERAMI, A.; H. VLASSARA y M. BROWNLEE (1985). *Protein glycosylation and the pathogenesis of atherosclerosis*. Metabolism 34: 37-44.
- EBLE, A. S.; S. R. THORPE y J. W. BAYNES (1983). *Nonenzymatic glycosylation and glucose dependent cross-linking of protein*. J. Biol. Chem. 258: 9506-9512.

- FALK, R. J.; Y. KIN; CH. TSAI, *et al.* (1983). *Renal deposition of poly C₉ neoantigen of the membrane attack complex (MAC)*. *Kidney Int.* 23: 194.
- FLUCKIGER, R.; W. HARMON; W. MEIER, *et al.* (1981). *Hemoglobin carbamylation in uremia*. *N. Engl. J. Med.* 304: 823-827.
- GARLICK, R. L. y J. S. MAZER (1983). *The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo*. *J. Biol. Chem.* 258: 6142-6146.
- GARLICK, R. L.; J. S. MAZER; P. J. HIGGINS y H. F. BUNN (1983). *Characterization of glycosylated hemoglobins: relevance to monitoring of diabetic control and analysis of other proteins*. *J. Clin. Invest.* 71: 1062-1072.
- GREENE, D. A. (1983). *Metabolic abnormalities in diabetic peripheral nerve: relation to impaired function*. *Metabolism* 32: 118-123.
- HIGGINS, P. J. y H. F. BUNN (1981). *Kinetic analysis of the non-enzymatic glycosylation of hemoglobin*. *J. Biol. Chem.* 56: 5204-5208.
- HIGGINS, P. J.; R. I. GARLICK y H. F. BUNN (1982). *Glycosylated hemoglobin in human and animal red cells: role of glucose permeability*. *Diabetes* 31: 743-748.
- KARRAN, P. y M. G. ORMEROD (1973). *Is the ability to repair damage to DNA related to the proliferative capacity of a cell? The rejoining of x-ray produced strand breaks*. *Biochim. Biophys. Acta* 299: 54-64.
- KOENING, R. J.; C. M. PETERSON; R. L. JONES, *et al.* (1976). *Correlation of glucose regulation and hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus*. *N. Engl. J. Med.* 295: 417-420.
- KOENING, R. J. y A. CERAMI (1980). *Hemoglobin A_{1c} and diabetes mellitus*. *Annu. Rev. Med.* 31: 29-34.
- MAYER, T. K. y Z. R. FREDMAN (1983). *Protein glycosylation in diabetes mellitus: A review of laboratory measurements and of their clinical utility*. *Clin. Chim. Acta* 127: 147-184.
- MEANS, G. E. y M. K. CHANG (1982). *Nonenzymatic glycosylation of proteins: structure and function changes*. *Diabetes* 31: 1-4. Suppl. 3.
- MONNIER, V. M. y A. CERAMI (1983). *Nonenzymatic glycosylation and browning of proteins in vivo*. En: Waller G. R., Feather M. S., eds. *The Maillard reaction in foods and nutrition*. Am. Chem. Soc. Sym. Ser. No. 215. Washington, D. C.: American Chemical Society: 431-439.
- MONNIER, V. M.; R. R. KOHN y A. CERAMI (1984). *Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 583-587.
- Mc DONALD, M. J.; M. BLEICHMAN; H. F. BUNN y R. W. NOBLE (1979). *Functional properties of the glycosylated minor components of human adult hemoglobin*. *J. Biol. Chem.* 254: 702-707.
- PERUTZ, M. F. (1979). *Regulation of oxygen affinity of hemoglobin*. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 327-386.
- PETES, T. D.; R. A. FABER; G. M. TARRANT y R. HOLLIDAY (1974). *Altered rate of DNA replication in aging human fibroblast cultures*. *Nature (London)* 251: 434-436.
- RICE, G. B.; S. P. MODAK y T. MAKINODAN (1971). *Age-associated change in the DNA of mouse tissue*. *Science* 171: 917-920.
- RONGOR, S.; P. C. ULRICH; F. A. BENCSATH y A. CERAMI (1984). *Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2684-2688.
- SAHBAI, S. (1980-1981). *Glycosylated hemoglobins*. *Tex. Rep. Biol. Med.* 40: 373-385.
- SOMAY, Ch. y C. PASCUAL (1987). *Nitrobluetetrazolium staining of serum fructosamine of agarose gel electrophoretograms*. *Clin. Chem.* (aceptado para publicación).
- SHAPIRO, R.; M. J. Mc MANUS; C. ZALUT, *et al.* (1980). *Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin*. *A. J. Biol. Chem.* 255: 3120-3127.
- SHAMAJA, M.; D. MOLOTTI; A. CARENINI y G. POZZA (1982). *Glycosylated hemoglobins and the oxygen affinity of whole blood*. *Diabetología* 23: 399-402.
- SHAKSELA, E. y P. S. MOORHEAD (1963). *Aneuploidy in the degenerative phase of serial cultivation of human cell strains*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50: 390-395.
- SMITH, R. J.; R. J. KOENING; A. BINNERTS, *et al.* (1982). *Regulation of hemoglobin A_{1c} formation in human erythrocytes in vitro: Effects of physiological factors other than glucose*. *J. Clin. Invest.* 69: 1164-1168.
- SRBANOWSKI, J. C.; M. A. COHENFORD; H. L. LEVY, *et al.* (1982). *Nonenzymatically glycosylated serum albumin in a galactosemic infant*. *N. Engl. J. Med.* 306: 84-86.
- ULASSARA, H.; M. BROWNLEE y A. CERAMI (1985). *High affinity-receptor mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5588-5592.

- VIBERTI, G. C.; R. W. BILOUS; D. MACKINTOSH; J. J. BENDING y H. KEEN (1983). *Long term correction of hyperglycaemia and progression of renal failure in insulin-dependent diabetics*. Br. Med. J. (Clin. Res.) **286**: 598-602.
- YUE, D. K.; S. Mc. LENNAN; L. DELBRIDGE; D. J. HANDELSMAN; T. REEVE y J. R. TURTLE (1983). *The thermal stability of collagen in diabetic rats: correlation with severity of diabetes and nonenzymatic glycosylation*. Diabetología **24**: 282-285.