

Los AGE fluorescentes en piel están asociados con alteraciones en el ultrasonido de la carótida en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 de reciente diagnóstico

Skin autofluorescence AGEs are associated with ultrasound alterations of the carotid in subjects of recent diagnosis of type 2 diabetes mellitus

Ma. Etzabel Villegas Rodríguez*, Sergio Eduardo Solorio Meza**, Martha Eugenia Fajardo*, J. M. Malacara*, Ma. Eugenia Garay Sevilla*

RESUMEN

La glucosilación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés) juega un papel importante en el desarrollo de las complicaciones de diabetes. En esta investigación el objetivo es estudiar AGE fluorescentes en piel y factores de riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) de reciente diagnóstico, obesos (O) y peso normal (PN). Se realizó un estudio transversal en sujetos de 35 a 65 años de edad obesos ($n = 28$) PN ($n = 29$). Se midieron características generales, grosor de intima-media (IMT), vasodilatación mediada por flujo (VMF), índice tobillo-brazo (ITB) y AGE en piel. Al comparar ambos grupos, el IMT fue mayor ($p < 0.03$), menor el índice de rigidez ($p < 0.02$) y VMF ($p < 0.002$) en PN. VMF y IMT se asociaron con AGE en el grupo total ($p < 0.002$, $p < 0.00004$, respectivamente) y en PN con lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) ($p < 0.03$; $p < 0.004$), IMT se asocia con AGE ($p < 0.01$), ITB ($p < 0.015$) en obesos y delgados AGE ($p < 0.00007$), Tensión Arterial Sistólica (TAS) ($p < 0.04$) e Índice de Masa Corporal (IMC) ($p < 0.02$). La conclusión fue que IMT y VMF muestran fuerte asociación con AGE en piel y LDL-C.

ABSTRACT

Advanced glycosylation (AGEs) play an important role in development of complications of diabetes. In this work we studied the fluorescent AGEs in skin and cardiovascular risk factors in patients with newly diagnosed with type 2 diabetes mellitus (T2DM), obese (O) and normal weight (NW). A cross-sectional study was conducted in obese subjects 35 to 65 years old ($n = 28$) NW ($n = 29$). General characteristics, intima-media thickness (IMT), flow-mediated dilation (FMD) ankle-brachial index (ABI) and skin AGEs were measured. When comparing both groups, IMT was higher ($p < 0.03$), lower stiffness index ($p < 0.02$) and VMF ($p < 0.02$) in NW. FMD and IMT were associated with AGEs in the total group ($p < 0.002$, $p < 0.00004$, respectively) and LDL-C NW ($p < 0.03$, $p < 0.004$). The IMT is associated with AGEs ($p < 0.01$), Ankle-brachial index (ABI) ($p < 0.015$) in obese and lean AGEs ($p < 0.00007$), SBP ($p < 0.04$) and BMI ($p < 0.02$). IMT and VMF show strong association with AGEs in skin and LDL-C.

Recibido: 31 de enero de 2014
Aceptado: 12 de febrero de 2014

Palabras clave:

Diabetes; complicaciones diabéticas; AGE; enfermedades cardiovasculares.

Keywords:

Diabetes; diabetic complications, AGE; cardiovascular diseases.

Cómo citar:

Villegas Rodríguez, Ma. E., Solorio Meza, S. E., Fajardo, M. E., Malacara, J. M. & Garay Sevilla, Ma. E. (2014). Los AGE fluorescentes en piel están asociados con alteraciones en el ultrasonido de la carótida en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 de reciente diagnóstico. *Acta Universitaria*, 24(NE-2), 45-50. doi: 10.15174/au.2014.722

INTRODUCCIÓN

La acumulación de productos finales de glucosilación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés) resulta de la combinación de hiperglicemia, hiperlipidemia, estrés oxidativo/carbonilo y también la disminución de la depuración de los precursores de AGE. Por lo que la acumulación de AGE se ve en diabetes mellitus y falla renal, y contribuye a las complicaciones a largo plazo y mortalidad (Goldin, Beckman, Schmidt & Creager, 2006; Lutgers *et al.*, 2006). Los AGE juegan un papel importante en la patogénesis de la

* Departamento de Ciencias Médicas, Universidad de Guanajuato, Campus León. 20 de enero núm. 929, Col. Obregón, León, Guanajuato, México. C.P. 37320. Tel.: (52) 4777143812.

** Instituto Mexicano del Seguro Social. Boulevard Adolfo López Mateos esq. Insurgentes, León, Guanajuato, México. Correo electrónico: marugaray_2000@yahoo.com

aterosclerosis, las uniones cruzadas de los AGE con el colágeno y la elastina dentro de la pared vascular contribuye a la rigidez arterial (Meerwaldt *et al.*, 2008; Yoshida, Okumura & Aso, 2005). La detección de aterosclerosis subclínica o preclínica puede realizarse a través de exámenes no invasivos, como el Grosor Íntima Media carotídea (IMT), el Índice Tobillo-brazo (ITB) y la vaso dilatación mediada por flujo (VMF) (*American Heart Association [ACCF/AHA]*, 2010).

La ecografía carotídea mediante la determinación del GIM permite detectar cambios estructurales tempranos en la pared vascular (Amato *et al.*, 2007; Bae, Kim, Rihal & Lerman, 2006), medir y monitorizar la aterosclerosis en individuos asintomáticos (Bard *et al.*, 2004).

En un estudio longitudinal realizado en japoneses se encontró que GIM en etapa basal, niveles elevados de Hemoglobina Glucosilada (HbA1c) y bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (LDL) predicen la incidencia de enfermedad coronaria no fatal (Yamasaki *et al.*, 2000). GIM se relaciona positivamente con los AGE fluorescentes en piel, independientemente de los factores clínicos como síndrome metabólico, lo cual puede reflejar anomalías tempranas en los procesos implicados en el desarrollo de aterosclerosis (Lutgers, Graaff, De Vries, Smit & Dullaart, 2010). El ITB es una herramienta diagnóstica empleada para la evaluación de la circulación arterial hacia los miembros inferiores. Un ITB cercano a 1 (> 0.90) se considera normal y un valor < 0.50 indica enfermedad arterial severa (Xu *et al.*, 2013).

En sujetos sanos con ITB menor de 1.10 se encontraron mayores niveles de pentosidina y se mostró como un determinante independiente del ITB (Takahashi *et al.*, 2011).

En la actualidad, la VMF es el método más comúnmente utilizado para medir la disfunción endotelial, por su sensibilidad y su carácter no invasivo. En individuos aparentemente sanos puede utilizarse como marcador de la exposición a factores de riesgo cardiacos y sus efectos funcionales (Leung & Leung, 2011).

Los AGE ejercen daño sobre el sistema cardiovascular mediante la reducción en la captación de los receptores celulares de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Esto ocurre a través de la glicación de las partículas LDL sobre la apolipoproteína B y en los fosfolípidos. La LDL glicosilada es más susceptible a la reticulación con colágeno en la pared arterial que la LDL no glicosilada. Debido a esto no es absorbida por la célula y se acumula en la circulación. Los macrófagos captan la LDL modificada y la conduce a la formación de células espumosas y ateroma (Zieman & Kass, 2004).

Estudios realizados en pacientes diabéticos sugieren como herramienta no invasiva para predecir el riesgo de aterosclerosis la medición de la acumulación de los AGE en piel por medio de técnicas de fluorescencia (*skin autofluorescence [SAF]*) (Meerwaldt *et al.*, 2004). Se ha observado que los niveles elevados de fluorescencia en la piel se presentan en pacientes con diabetes tipo 2 comparado con sujetos sanos, y además están directamente relacionados con presencia o desarrollo de complicaciones microvasculares (Hofmann *et al.*, 2013; Nin *et al.*, 2011).

Es de gran importancia el estudio en etapas tempranas de tolerancia a la glucosa alterada y diabetes *mellitus* para ayudar a retardar la aparición de las complicaciones de diabetes, como lo son, entre otras, los factores de riesgo cardiovascular utilizando un método no invasivo para evaluar los AGE en piel a través de un instrumento novedoso en nuestro país y de gran ayuda, sobre todo en los estudios epidemiológicos, por lo que resultó de gran interés estudiar AGE fluorescentes en piel y factores de riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) de reciente diagnóstico, obesos y peso normal.

OBJETIVO

Estudiar AGE fluorescentes en piel y factores de riesgo cardiovascular en pacientes con DM2 de reciente diagnóstico, obesos y peso normal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal en población adulta de la ciudad de León, Guanajuato, de 35 a 65 años de edad con diabetes tipo 2 de reciente diagnóstico por prueba de tolerancia a la glucosa, según los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA por sus siglas en inglés, 2012) o con un diagnóstico menor a seis meses. Sin evidencia clínica de infección aguda o crónica, sin daño renal o hepático y sin enfermedades cardiovasculares. Se realizaron mediciones antropométricas para separar a los participantes en dos grupos, peso normal y obeso, de acuerdo con los criterios para el diagnóstico de obesidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS): Índice de Masa Corporal (IMC) < 25 peso normal, IMC ≥ 25 sobrepeso; IMC ≥ 30 obesidad. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Institucional, y los participantes recibieron una carta informativa y firmaron un consentimiento informado. Se realizaron estudios de laboratorio que incluyó glucosa, perfil de lípidos, HbA1c y Examen General de Orina (EGO) para descartar la presencia de infección urinaria.

Valoración índice tobillo brazo (ITB): Se les determinó la funcionalidad vascular de los miembros inferiores a través del cálculo del ITB; cociente entre la presión sistólica a nivel tobillo con la presión sistólica braquial (TST/TSB); de los sujetos en reposo y decúbito supino. Las mediciones se efectuaron empleando un *Doppler* continuo portátil (sonda de 810 MHz) y un esfigmomanómetro anaeroide. Un valor de ITB menor a 0.9 sugiere la presencia de Enfermedad Arterial Periférica (EAP) (Ghannam, Rodríguez, Ehrmann & Grossman, 2012).

Grosor Íntima Media carotídea (IMT): Se evaluaron las características arteriales por ecografía del grosor IMT en los sujetos en reposo y decúbito supino con una ligera hiperextensión del cuello, y se valoró la presencia o no de placas ateroscleróticas. Se utilizó un equipo de ultrasonido con sistema operativo de alta resolución en modo bidimensional modelo Acuson X150. El valor del GIM consiste en la adición del valor del grosor de la íntima carotídea más el valor del grosor de la media carotídea (GMC + GIC). Un valor mayor o igual a 0.84 mm en el grosor de la arteria indica la presencia de enfermedad cardiovascular (Montalcini, Romeo, Fava & Pujia, 2014).

AGE fluorescentes en piel: Se midió el nivel de fluorescencia en piel de los sujetos para conocer la concentración de AGE acumulados en la parte posterior del antebrazo con el equipo AGE Reader™. A través de una fuente de luz se ilumina el tejido, la cual excita los restos de AGE fluorescentes presentes que emiten luz con otra longitud de onda. En el segmento de longitud de onda utilizado la mayor contribución de fluorescencia proviene de los AGE fluorescentes ligados principalmente a colágeno, pero también a otras proteínas y lípidos. La luz emitida se detecta usando un espectrómetro. El equipo genera un reporte en donde se grafica el valor de fluorescencia contra la edad del paciente (Meerwaldt *et al.*, 2004).

Vasodilatación mediada por flujo en la arteria humeral (VMF): Se produce una isquemia transitoria mediante un manguito neumático, colocado en el antebrazo, distalmente a la zona de visualización mediante ecografía e inflado a una presión suprasistólica durante 5 min. Al desinflar el manguito, el aumento del flujo da lugar a una fuerza tangencial que activa la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) para que libere óxido nítrico (NO) a través de la vía de la L- arginina. El NO se difunde a las células de músculo liso y causa su relajación, lo que conduce a vasodilatación. Finalmente, se mide la VMF como porcentaje de cambio del diámetro de la arteria humeral entre la situación basal y el aumento máximo del diámetro ($[(VMF\ FINAL \cdot 100)/VMF\ INICIAL]-100$). Un cambio menor al 10%

en el diámetro de la arteria sugiere la presencia de enfermedad arterial (Arrebola-Moreno, Laclaustra & Kaskia, 2012).

Índice de rigidez: Se realizó el cálculo como la relación entre las presiones sistólica/diastólica sobre el cambio relativo en el diámetro (Mackenzie, Wilkinson & Cockcroft, 2002).

Análisis estadístico

Se realizaron medidas de tendencia central media y desviación estándar. Se realizó prueba *t* de *student* no pareada para analizar las diferencias entre los grupos de pacientes diabéticos obesos y no obesos; se hizo análisis de regresión múltiple paso a paso para evaluar la relación que existe entre los AGE fluorescentes y los factores de riesgo cardiovascular. Un nivel de $\alpha < 0.05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

Se estudiaron 57 pacientes: 28 en el grupo de obesos y 29 en el de delgados; se estudiaron 38 (66.6%) mujeres y 19 (33.3%) hombres, con una edad de 48.2 ± 9.9 para el grupo de obesos y 49.7 ± 7.3 para el grupo de delgados. En la tabla 1 se observan las características generales, metabólicas y de riesgo cardiovascular en los grupos de estudio donde podemos observar que el grupo de pacientes con peso normal tienen menores niveles de colesterol ($p < 0.013$), C-LDL ($p < 0.02$); en cuanto al riesgo cardiovascular se encontró que el grupo de peso normal tiene mayor velocidad mediada por flujo ($p < 0.032$), menor índice de rigidez ($p < 0.02$) y de IMT ($p < 0.019$).

Al evaluar los factores asociados a los marcadores de riesgo cardiovascular estudiados se encontró que el grosor de IMT en el grupo total se asoció con el IMC ($p < 0.021$) y los AGE fluorescentes en piel ($p < 0.00004$), en el grupo de sujetos obesos se encontró asociación con glucosa ($p < 0.03$), lipoproteínas de muy baja densidad (C-VLDL) ($p < 0.013$), lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) (< 0.006), ITB ($p < 0.015$) y con los AGE fluorescentes en piel ($p < 0.01$); el grupo de peso normal se asoció con C-LDL (< 0.004), IMC ($p < 0.016$), Tensión Arterial Sistólica (TAS) ($p < 0.037$) y los AGE fluorescentes en piel ($p < 0.00007$) (tabla 2).

La velocidad mediada por flujo se asoció positivamente con el C-LDL en el grupo total ($t = 2.37$; $p < 0.02$) y en el grupo de peso normal ($t = 2.34$; $p < 0.03$); así también en el grupo total se asoció con los AGE fluorescentes en piel (figura 1); no se encontró ninguna otra diferencia significativa.

Tabla 1.
Características generales, metabólicas y de riesgo cardiovascular en los sujetos de estudio

Variables	Grupo obesos Media ± DE	Grupo delgados Media ± DE	T	P
Edad (años)	48.2 ± 9.9	49.7 ± 7.3	-0.80	0.43
IMC (kg/m ²)	35.3 ± 4.79	24.4 ± 0.98	11.98	< 0.00001
TAS (mmHg)	123 ± 6	120 ± 7	1.49	0.14
TAD (mmHg)	77 ± 7	76 ± 7	0.87	0.39
Glucosa (mg/dl)	141.4 ± 45.8	140.3 ± 39.6	0.01	0.92
HbA1c (%)	6.6 ± 1.10	6.3 ± 0.96	1.08	0.28
Colesterol (mg/dl)	208.0 ± 30.0	182.7 ± 43.0	2.56	< 0.013
Triglicéridos (mg/dl)	192.5 ± 79.0	167.5 ± 54.6	1.40	0.17
C-LDL (mg/dl)	109.6 ± 23.6	90.4 ± 34.1	2.46	< 0.02
C-HDL (mg/dl)	59.6 ± 9.12	58.8 ± 9.5	0.33	0.74
Velocidad mediada por flujo (%)	14.80 ± 6.5	18.65 ± 6.7	-2.20	< 0.032
Índice de rigidez	3.8 ± 2.01	2.8 ± 1.1	2.37	< 0.021
Grosor íntima media carotídea (mm)	1.1 ± 0.21	0.9 ± 0.25	2.40	< 0.019
Índice tobillo-brazo	0.98 ± 0.08	0.99 ± 0.07	-0.69	0.49
AGE fluorescentes en piel (UA)	2.19 ± 0.28	2.16 ± 0.47	0.27	0.79

IMC= Índice de Masa Corporal, TAS= Tensión Arterial Sistólica, TAD= Tensión Arterial Diastólica, HbA1c= Hemoglobina Glicosilada, DE= Desviación Estándar.
Fuente: Elaboración propia con base en los datos registrados en los expedientes de los sujetos participantes en el estudio.

Tabla 2.
Factores asociados con Grosor de Íntima Media Carotídea

Variable	B	t	P
Grupo total R ² ajustada = 0.281; <i>p</i> < 0.0001			
Edad	0.13	1.19	0.24
IMC	0.27	2.38	< 0.021
AGE fluorescentes en piel	0.51	4.48	< 0.00004
Grupo sujetos obesos R ² ajustada = 0.477; <i>p</i> < 0.004			
Glucosa	-0.43	-2.35	< 0.03
HbA1c	0.19	1.03	0.36
Triglicéridos	-3.10	-1.45	0.16
C-VLDL	3.29	1.57	0.013
C-LDL	0.50	3.11	< 0.006
Índice tobillo-brazo	0.41	2.65	< 0.015
AGE fluorescentes en piel	0.42	2.19	< 0.01
Grupo sujetos delgados R ² ajustada = 0.538; <i>p</i> < 0.0003			
HbA1c	-0.34	-1.95	0.06
C-LDL	-0.44	-3.19	< 0.004
Índice de masa corporal	0.40	2.60	< 0.016
TAS	0.32	2.21	< 0.037
AGE fluorescentes en piel	0.86	4.86	< 0.00007

IMC= Índice de Masa Corporal, HbA1c= Hemoglobina Glicosilada, TAS= Tensión Arterial Sistólica.

Fuente: Elaboración propia con base en los datos registrados en los expedientes de los sujetos participantes en el estudio.

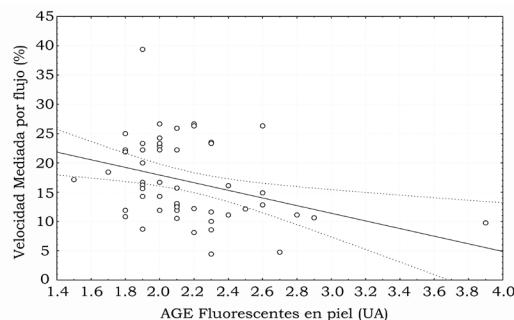


Figura 1. Asociación de VMF con AGE fluorescentes en piel en el grupo total (*p* < 0.002).

Fuente: Elaboración propia con base en los datos registrados en los expedientes de los sujetos participantes en el estudio.

DISCUSIÓN

A pesar del importante incremento en DM2 alrededor del mundo y sus etapas anteriores a la glucosa en ayuno alterada y tolerancia a la glucosa alterada (TGA), casi la mitad de los afectados no son conscientes de tener esta condición (Noble, Mathur, Dent, Meads & Greenhalgh, 2011). Esto deja un largo periodo clínicamente latente en el que la DM2 y TGA se pueden detectar, para la diabetes se estiman cinco años. Tratando de hacer un diagnóstico temprano de la enfermedad se realizó el presente estudio en una población abierta mediante curva de tolerancia a la

glucosa y se decidió incluir tanto pacientes obesos como delgados, ya que estos últimos tienen una tasa más alta de mortalidad.

Los AGE fluorescentes en piel SAF es una aproximación no invasiva de la acumulación en los tejidos de los productos finales de AGE, que son considerados como un portador de la memoria glicometabólica (Smit, Smit, Botterblom & Mulder, 2013).

En el grupo total se encontraron mayores niveles de AGE fluorescentes comparado con el grupo de pacientes diabéticos obesos, aunque no de manera significativa, pero sí se encontró el colesterol y triglicéridos más elevados en este grupo, así como los factores de riesgo cardiovascular tradicionales. Otros estudios refieren que los valores incrementados predicen eventos cardiovasculares independientemente de los factores de riesgo cardiovascular, pero este estudio muestra, además, que el grosor IMT se correlacionó positivamente con los SAF, independientemente de los factores clínicos, lipoproteínas (apo) y síndrome metabólico, lo que sugiere que la fluorescencia de la piel representa un factor determinante de la aterosclerosis subclínica. El aumento de la fluorescencia de la piel puede reflejar anomalías tempranas en los procesos implicados en el desarrollo de aterosclerosis (Lutgers *et al.*, 2010). En este grupo de estudio se asoció significativamente también el grosor de la IMT con los AGE fluorescentes en el grupo total, y de manera independiente en el grupo de obesos y con mayor significancia en el grupo de sujetos de peso normal. Den Dekker *et al.* (2013) mostraron también la misma asociación, además de una asociación con la mayoría de factores de riesgo cardiovascular.

La enfermedad arterial periférica que se mide con el índice tobillo-brazo no ha resultado significativa en nuestro estudio con los AGE fluorescentes en piel, sólo se asoció con el grosor IMT. A diferencia de este grupo de estudio, una investigación realizada por De Vos *et al.* (2013) mostró que la acumulación de los AGE fluorescentes en los tejidos se encontraban incrementados en pacientes con enfermedad arterial periférica. Los autores subrayan la importancia de los AGE en enfermedad arterial periférica, independientemente de la presencia de la diabetes *mellitus* y la insuficiencia renal.

La VMF, otra medida de riesgo cardiovascular, mostró una asociación significativa con los AGE fluorescentes en el grupo total, pero no se encontró en la literatura un estudio similar donde se evalúe la VMF y la asociación con AGE fluorescentes en piel. Sin embargo,

el estudio de Den Dekker *et al.* (2013) nos habla de la asociación con la mayoría de factores de riesgo y la VMF es un factor de riesgo cardiovascular importante.

Como se ha mencionado, la acumulación de AGE en los tejidos puede medirse por autofluorescencia de la piel, y aunque las características fluorescentes en este método no son específicas para los AGE fluorescentes, múltiples estudios de validación han mostrado convincentemente y consistentemente que las SAF tienen una fuerte correlación con AGE específicos contenidos en biopsias de piel (Mulder *et al.* 2006).

En conclusión, el grosor IMT y VMF muestra una fuerte asociación con los AGE fluorescentes en piel y el colesterol-C, ya que el lector de AGE-Reader es útil como una herramienta clínica no invasiva para la evaluación de riesgo de complicaciones vasculares a largo plazo en la diabetes y en otras condiciones asociadas con la edad; es muy importante continuar con estudios que nos ayuden a hacer detección temprana de enfermedades relacionadas y poder retardar la aparición de complicaciones o ayudar al inicio temprano de tratamiento.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto apoyado por el (Foninv-Conacyt), Gobierno del estado de Guanajuato, CLAVE GTO-2012-C03-195211.

REFERENCIAS

- American Diabetes Association (ADA) (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35(1), 64-71.
- Amato, M., Montorsi, P., Ravani, A., Oldani, E., Galli, S. & Ravagnani, P. M. (2007). Carotid intima-media thickness by B-mode ultrasound as surrogate of coronary atherosclerosis: correlation with quantitative coronary angiography and coronary intravascular ultrasound findings. *European Heart Journal*, 28(17), 2094-2101.
- American Heart Association (2010). *ACC/AHA Guideline for Assessment of Cardiovascular Risk in Asymptomatic Adults: Executive Summary*. Recovered in november 12 of <http://www.cardiosource.org/~media/Files/Science%20and%20Quality/Guidelines/Pocket%20Guides/CV%20Risk%20Pocket%20Guide.ashx>
- Arrebola-Moreno, A., Laclaustra, M. & Kaskia, J. C. (2012). Evaluación no invasiva de la función endotelial en la práctica clínica. *Revista Española de Cardiología*, 65(1), 80-90.
- Bae, J. H., Kim, W. S., Rihal, C. S. & Lerman, A. (2006). Individual measurement and significance of carotid intima media, and intima-media thickness by B-mode ultrasonographic image processing. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 26(10), 2380-2385.

- Bard, R. L., Kalsi, H., Rubenfire, M., Wakefield, T., Fex, B. & Rajagopalan, S. (2004). Effect of carotid atherosclerosis screening on risk stratification during primary cardiovascular disease prevention. *American Journal of Cardiology*, 93(18), 1030-1032.
- Den Dekker, M. A. M., Zwieters, M., Van den Heuvel, E. R., De Vos, L. C., Smit, A. J., Zeebregts, C. J., Oudkerk, M., Vliegenthart, R., Lefrandt, J. D. & Mulder, D. J. (2013). Skin Autofluorescence, a Non-Invasive Marker for AGE Accumulation, Is Associated with the Degree of Atherosclerosis. *PLoS ONE*, 8(12), e83084. doi: 10.1371/journal.pone.0083084
- De Vos, L. C., Noordzij, M. J., Mulder, D. J., Smit, A. J., Lutgers, H. L., Dullaart, R. P., Kamphuisen, P. W., Zeebregts, C. J. & Lefrandt, J. D. (2013). Skin autofluorescence as a measure of advanced glycation end products deposition is elevated in peripheral artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(1), 131-138.
- Ghannam, M., Rodríguez, Y., Ehrmann, D. & Grossman, P. M. (2012). Ankle-brachial Index as a Clinical Tool. *American Journal of Medicine*, 125(12), 1171-1172.
- Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M. & Creager, M. A. (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, 114(6), 597-605.
- Hofmann, B., Adam, A. C., Jacobs, K., Riemer, M., Erbs, C., Bushnaq, H., Simm, A., Silber, R. E. & Santos, A. N. (2013). Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: A mirror of vascular function? *Experimental Gerontology*, 48(1), 38-44.
- Leung, D. Y. & Leung, M. (2011). Non-invasive/invasive imaging: significance and assessment of coronary microvascular dysfunction. *Heart*, 97(7), 587-595.
- Lutgers, H. L., Graaff, R., De Vries, R., Smit, A. J. & Dullaart, R. P. (2010). Carotid artery intima media thickness associates with skin autofluorescence in non-diabetic subjects without clinically manifest cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 40(9), 812-817.
- Lutgers, H. L., Graaff, R., Links, T. P., Ubink-Veltmaat, L. J., Bilo, H. J., Gans, R.O. & Smit, A. J. (2006). Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 29(12), 2654-2659.
- Mackenzie, I. S., Wilkinson, I. B. & Cockcroft, J. R. (2002). Assessment of arterial stiffness in clinical practice. *QJM: An International Journal of Medicine*, 95(2), 67-74.
- Meerwaldt, R., Graaff, R., Oomen, P. H., Links, T. P., Jager, J. J., Alderson, N. L., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., Gans, R. O. & Smit, A. J. (2004). Simple non-invasive assessment of advanced glycationend product accumulation. *Diabetologia*, 47(7), 1324-1330.
- Meerwaldt, R., Van der Vaart, M. G., Van Dam, G. M., Tio, R. A., Hillebrands, J. L., Smit, A. J. & Zeebregts, C. J. (2008). Clinical relevance of advanced glycation endproducts for vascular surgery. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 36(2), 125-131.
- Montalcini, T., Romeo, S., Fava, A. & Pujja, A. (2014). Carotid Intima-media Thickness: A Target or a Marker? *American Journal Therapeutics*, 21(6), 535-539. doi: 10.1097/MJT.0b013e318255bc26.
- Mulder, D. J., Water, T. V., Lutgers, H. L., Graaff, R., Gans, R. O., Zijlstra, F. & Smit, A. J. (2006). Skin autofluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 8(5), 523-535.
- Nin, J. W., Jorsal, A., Ferreira, I., Schalkwijk, C. G., Prins, M. H., Parving, H. H., Tarnow, L., Rossing, P. & Stehouwer, C. D. (2011). 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*, 59(8), 2027-2032.
- Noble, D., Mathur, R., Dent, T., Meads, C. & Greenhalgh, T. (2011). Risk models and scores for type 2 diabetes: systematic review. *British Medical Journal*, 28(343), 1-31.
- Smit, A. J., Smit, J. M., Botterblom, G. J. & Mulder, D. J. (2013). Skin autofluorescence based decision tree in detection of impaired glucose tolerance and diabetes. *PLoS One*, 8(6).
- Takahashi, R., Imamura, A., Yoshikane, M., Suzuki, M., Murakami, R., Cheng, X. W., Numaguchi, Y., Ikeda, N., Murohara, T. & Okumura, K. (2011). High serum concentrations of pentosidine, an advanced glycation end product, are associated with low normal value of ankle-brachial index in apparently healthy men. *Metabolism*, 60(5), 649-654.
- Xu, D., Zou, L., Xing, Y., Hou, L., Wei, Y., Zhang, J., Qiao, Y., Hu, D., Xu, Y., Li, J. & Ma, Y. (2013). Diagnostic value of ankle-brachial index in peripheral arterial disease: a meta-analysis. *Canadian Journal of Cardiology*, 29(4), 492-498.
- Yamasaki, Y., Kodama, M., Nishizawa, H., Sakamoto, K., Matsuhisa, M., Kajimoto, Y., Kosugi, K., Shimizu, Y., Kawamori, R. & Hori, M. (2000). Carotid intima-media thickness in Japanese type 2 diabetic subjects: predictors of progression and relationship with incident coronary heart disease. *Diabetes Care*, 23(9), 1310-1315.
- Yoshida, N., Okumura, K. & Aso, Y. (2005). High serum pentosidine concentrations are associated with increased arterial stiffness and thickness in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*, 54(3), 345-350.
- Zieman, S. J. & Kass, D. A. (2004). Advancedglycationendproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. *Drugs*, 64(5), 459-470.