Correlación de los niveles de HbA_{1c} con las apoproteínas del plasma y de las lipoproteínas plasmáticas en pacientes diabéticos tipo II

S. Ródenas^{1*}, M. Sánchez-Cabezudo¹ y C. Cuesta²

¹Laboratorio de Técnicas Instrumentales
Departamento de Nutrición y Bromatología II e
²Instituto de Nutrición y Bromatología (CSIC-UCM)
Facultad de Farmacia
28040-Madrid (España)

(Recibido el 9 de abril de 1992)

S. RÓDENAS, M. SÁNCHEZ-CABEZUDO and C. CUESTA. *Relationship between HbA_{1c} Levels and Apoproteins from Plasma and from Plasma Lipoproteins in Patients with Type II Diabetes*. Rev. esp. Fisiol., 49 (1), 23-30, 1992.

Plasma apolipoproteins from VLDL, LDL and HDL lipoproteins were measured in 56 male patients with age range 50-60 years and noninsulin-dependent diabetes mellitus (type II) and 81 normal volunteers. Diabetic patients were further divided into two subgroups according to the HbA_{1c} (glycated haemoglobin) concentrations, lower than 7 % and higher than 7 % respectively, after considering that HbA_{1c} levels may be an appropriate index to monitor long-term blood glucose level. The studied groups, control and diabetic patients, were well matched with regard to age, % of smokers, % drinkers and % hipertensive and physical activity. The relationships between glucose, fructosamine and % HbA_{1c} levels were investigated. In addition, the relationships between glucose, fructosamine, HbA_{1c} levels and apolipoproteins from the lipoproteins were also studied. A significant correlation ($p < 0.05$) between glucose/fructosamine, glucose/HbA_{1c} and fructosamine/HbA_{1c} was found in both groups of diabetic patients with HbA_{1c} lower than 7 % and higher than 7 % respectively. However HbA_{1c} levels were positive and significantly ($p < 0.05$) correlated with the Apo-B and Apo-E and negative but significantly correlated ($p < 0.05$) with Apo-C_{II} and Apo-C_{III} from VLDL particle in both groups of diabetic patients.

Key words: HbA_{1c}, Apolipoproteins, Diabetes type II.

* A quien debe dirigirse la correspondencia.
(Teléfono: 91-394 17 56, Fax: 91-394 17 54)

En los pacientes diabéticos, la hiperglucemia provoca glicosilación no enzimática de muchas proteínas, entre ellas las lipoproteínas y la hemoglobina. La concen-

tración de HbA_{1c}* en un momento dado depende de las concentraciones medias de glucosa en el plasma a lo largo de los dos meses precedentes, por tanto es un índice de control a largo plazo del metabolismo hidrocarbonado en diabéticos (26). Por otra parte la albúmina y otras proteínas del suero tienen un contacto íntimo con la glucosa sanguínea y también se unen a ella a través de los residuos de lisina o de hidrolisina. La determinación sérica de las proteínas glicosiladas se realiza con el método de la fructosamina, siendo un reflejo de la glucemia media correspondiente a un período de tiempo más corto que el % de HbA_{1c} (11).

La glicosilación de las lipoproteínas se lleva a cabo por unión de la glucosa a los aminoácidos de las lipoproteínas, provocando una alteración que condiciona que la unión a los receptores tisulares se encuentre disminuida (22). Así se ha observado que el catabolismo de las lipoproteínas aterógenas VLDL (17) y LDL (23) se encuentra parcialmente bloqueado en pacientes con diabetes mellitus no insulino-dependiente, lo que conlleva un aumento de las lesiones ateromatosas en estos pacientes (8).

La relación entre el grado de control del metabolismo hidrocarbonado, los niveles plasmáticos de apoproteínas, la glicosilación de las lipoproteínas y la aterosclerosis está poco estudiada y los resultados disponibles con frecuencia son contradictorios. WITZTUM y KOSCHINSKY (24) analizaron las consecuencias metabólicas e inmunológicas de la glicosilación de la LDL y LYONS *et al.* (15) encontraron que la glicosilación de la LDL se correlaciona con el % de HbA_{1c}, glucemia y proteínas plasmáticas glicosiladas. En otros estudios se ha demostrado que la HDL-glicosilada es

un 400 % superior en pacientes diabéticos y se correlaciona directamente con la glucemia (2). Además, la glicosilación de la Apo-A_I representa alrededor del 80 % de la HDL-glicosilada total. BRIONES *et al.* (1) no encontraron correlación significativa entre el % de HbA_{1c} y las concentraciones plasmáticas de Apo-A_I, Apo-A_{II}, Apo-C_{II}, Apo-C_{III} en diabéticos tipo I.

En este estudio, se analizan las correlaciones entre los niveles de las apoproteínas plasmáticas y los de las lipoproteínas VLDL, LDL y HDL, separadas por ultracentrifugación, con el % de HbA_{1c}, fructosamina y glucemia en una población diabética tipo II. Estos resultados se comparan estadísticamente con los obtenidos en una población sana.

Material y Métodos

El estudio se realizó en 56 pacientes varones diagnosticados de diabetes mellitus tipo II seleccionados entre los que no padecían cetosis ni estaban tomando medicamentos que pudiesen alterar la lipemia (β -bloqueantes o diuréticos). El intervalo de edades tanto de los pacientes como de los controles estaba comprendido entre 50-60 años. Se consideró que tanto los controles como los pacientes diabéticos eran moderadamente activos, con una masa corporal, calculada como peso (kg) dividido por la altura² (m²), por debajo de 30. Se consideraron valores normales de presión diastólica los que estaban por debajo de 95 mm de Hg. Cada paciente recibió el mismo tratamiento al menos durante los 4 meses previos al estudio. Los enfermos fueron tratados con dieta y medicamentos hipoglucemiantes orales. La dieta que recibieron constaba de 55 % de las calorías como carbohidratos, 30 % como grasa (10 % de ácidos grasos poliinsaturados, 10 % de ácidos grasos monoinsaturados y 10 % de ácidos grasos saturados), 15 % como proteínas y 15 g al día de fibra. La ingesta de carbohidratos sim-

* Abreviaturas:

HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; Apo: apoproteínas.

ples fue restringida. El agente hipoclucemiante administrado fue glibenclamida, 15 mg diarios distribuido en 3 dosis. La población control y diabética procedía del Hospital de la Seguridad Social «La Paz» y Centro de Diabetología de la Cruz Roja.

Los controles voluntarios incluidos en este estudio no tenían historia familiar de diabetes o enfermedad coronaria y no consumían medicamentos que pudiesen afectar el metabolismo lipídico. Tanto los controles como los diabéticos estudiados presentaban factores de riesgo coronario similares.

Completado el muestreo se dividió la población diabética en dos grupos de 28 enfermos cada uno, según que sus niveles de HbA_{1c} fuesen menores al 7 % (Diabética-A) o mayores (Diabética-B).

La muestra de sangre se obtuvo después de mantener a los controles y pacientes 10-12 h en ayunas y se recogió sobre EDTA. La determinación de la HbA_{1c} se realizó por separación mediante isoelectroenfoque a partir de los eritrocitos hemolizados, usando el método de JEPSON *et al.* (9) con algunas modificaciones (21).

La glucosa y la fructosamina se cuantificaron usando los métodos enzimáticos-colorimétricos de Boehringer Mannheim GmbH.

En la determinación de la fructosamina se utiliza NBT (Nitro-Blue-Tetrazolium) como indicador de la actividad reductora de las proteínas glicosiladas, cuya reacción cuantifica la glicosilación de las proteínas plasmáticas (4).

Las determinaciones cuantitativas de Apo-A_I, y de Apo-B se realizaron en un autoanalizador Technicon, siguiendo el método inmunoturbidimétrico comercializado por dicho laboratorio. Las lecturas de la turbidez se realizaron a 340 nm. La Apo-A_{II} se analizó mediante inmunoelectroforesis *rocket* (13). La separación y cuantificación de la Apo-C_{II}, Apo-C_{III} y Apo-E se llevó a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida (10).

La separación de las lipoproteínas plas-

máticas, se efectuó en doce sueros de otras dos subpoblaciones denominadas respectivamente diabética-a (HbA_{1c} < 7 %) y diabética-b (HbA_{1c} > 7 %). Se utilizó una ultracentrífuga Beckman L8M con un rotor SW 50.1, a 225.000 g durante 18 horas (7). En tubos de 5 mL se vertieron 3 mL de plasma completando su volumen con NaCl 0,189 M, d = 1,006. Se centrifugó seguidamente a 225.000 g durante 18 horas. Las VLDL que flotan en la parte superior del tubo, se separaron de las otras lipoproteínas seccionando el tubo mediante un cortatubos. De la fracción que queda en el tubo cortado se tomaron 3 mL, se llevaron a un nuevo tubo de centrífuga de 5 mL, se añadió 0,2481 g de KBr sólido agitándose suavemente hasta su disolución y se enrasó hasta el borde con una solución KBr d = 1,063. Seguidamente se centrifugó como se ha descrito anteriormente. Se cortaron de nuevo los tubos para separar las LDL y de lo que quedó en el tubo cortado, se llevaron 3 mL a otro tubo al que se añadió 0,746 g de KBr, enrasándose con una solución de KBr d = 1,215. Tras centrifugar en idénticas condiciones, se separaron las HDL.

El control de calidad de los diferentes parámetros analizados, se realizó siguiendo la normativa del Manual de Laboratorio del Lipid Research Clinics Program (14).

Los datos obtenidos se trataron estadísticamente con el test de t-Student y el test de coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados y Discusión

Las concentraciones de glucosa, fructosamina y el % de HbA_{1c} en las poblaciones control y diabéticas, así como las correlaciones entre glucosa, fructosamina y HbA_{1c} en las dos poblaciones de pacientes diabéticos se dan en las tablas I y II, respectivamente, en donde se observa una correlación alta entre fructosamina y HbA_{1c}. Se eligió el % de HbA_{1c} como in-

Tabla I. Niveles de glucosa, fructosamina y % de HbA_{1c} en las poblaciones diabéticas y el grupo control. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar de la media. Las comparaciones estadísticas se establecieron entre los diferentes grupos de pacientes diabéticos y el grupo control.

	Control (N = 81)	Población diabética			
		HbA _{1c} ^A < 7 % (N = 28)	HbA _{1c} ^B > 7 % (N = 28)	HbA _{1c} ^A < 7 % (N = 10)	HbA _{1c} ^B > 7 % (N = 12)
Glucosa (mmol/L)	4,83 $\pm$ 0,06	7,40 $\pm$ 0,35 ^a	10,46 $\pm$ 0,55 ^a	7,70 $\pm$ 0,28 ^a	10,80 $\pm$ 0,60 ^a
Fructosamina (μ mol/L)	218,20 $\pm$ 3,30	288,10 $\pm$ 8,20 ^a	394,30 $\pm$ 3,30 ^a	276,40 $\pm$ 10,91 ^a	390,40 $\pm$ 0,20 ^a
HbA _{1c} (%)	5,94 $\pm$ 0,06	6,24 $\pm$ 0,09 ^b	7,96 $\pm$ 0,13 ^a	6,32 $\pm$ 0,07 ^b	8,08 $\pm$ 0,20 ^a

^ap < 0,001; ^bp < 0,005

dicador del control del metabolismo hidrogenado porque no se encuentra sometido a las variaciones intraindividuales que presenta la fructosamina, sobre todo en pacientes con alteraciones renales (16) y porque proporciona un valor integrado de las concentraciones de glucosa plasmática a largo plazo (26). Esto es adecuado para analizar complicaciones crónicas de la diabetes como la aterosclerosis, relacionada con un trastorno del metabolismo lipídico provocado tras un período de descompensación del metabolismo hidrogenado.

Las concentraciones plasmáticas de Apo A_I disminuyen en ambas poblaciones diabéticas A y B, mientras que las concentraciones de Apo A_{II} sólo disminuyen en diabéticos B (tabla III). Estos resultados

coinciden con los de BRIONES *et al.* (1) quienes también encontraron una correlación negativa entre la Apo A_I y los triglicéridos plasmáticos similar a la obtenida en un estudio paralelo a éste (20). Respecto a la Apo B se observa un incremento en las concentraciones de las dos poblaciones diabéticas, respecto al grupo control, lo que indica un mayor riesgo aterogénico (3). A su vez, la relación Apo A_I/Apo B, que se considera más discriminatoria que las concentraciones individuales de Apo A_I o de Apo B, está disminuida, lo que se relaciona con una menor protección frente a la aterosclerosis (6).

En relación a los cambios en las concentraciones de las distintas lipoproteínas del plasma (tabla IV) se observa que la población diabética-b tiene unas VLDL enriquecidas 4 o 5 veces en ApoB, mientras que están disminuidas en ApoC_{II} y ApoC_{III}. Este dato parece relacionarse con la deficiente metabolización de las VLDL de los pacientes diabéticos no insulino-dependientes (5, 12, 17-20). La LDL-ApoB está significativamente incrementada en la población diabética-b, lo que se corresponde con la mayor concentración de Apo B observada en las VLDL de esa población ya que las LDL son un metabolito de las VLDL.

La HDL-ApoA_I desciende en ambas

Tabla II. Correlaciones de Pearson (r) entre glucosa, fructosamina y HbA_{1c} en las poblaciones patológicas Diabética-A (HbA_{1c} < 7 %) y Diabética-B (HbA_{1c} > 7 %).

	Diabética-A	Diabética-B
Glucosa/ Fructosamina	0,612**	0,447*
Glucosa/HbA _{1c}	0,581*	0,704**
Fructosamina/HbA _{1c}	0,868***	0,738**

Nivel de significación: * p < 0,050; ** p < 0,005; *** p < 0,001.

Tabla III. Concentraciones de apoproteínas plasmáticas (mg/dl) en el grupo control y en las poblaciones patológicas Diabética-A (HbA_{1c} < 7 %) y Diabética-B (HbA_{1c} > 7 %).

Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar de la media

Las comparaciones estadísticas se establecieron entre los diferentes grupos de pacientes diabéticos y el grupo control.

	Control (N = 81)	Población diabética	
		Diabética-A (N = 28)	Diabética-B (N = 28)
Apo A _I	143,00 $\pm$ 2,40	128,30 $\pm$ 4,10 ^a	121,50 $\pm$ 3,40 ^a
Apo A _{II}	51,00 $\pm$ 1,60	51,50 $\pm$ 1,70	46,80 $\pm$ 1,20 ^c
Apo B	83,00 $\pm$ 2,10	98,30 $\pm$ 4,30 ^b	103,30 $\pm$ 3,30 ^b
Apo A _I /Apo B	1,72 $\pm$ 0,04	1,29 $\pm$ 0,05 ^a	1,25 $\pm$ 0,03 ^a

^ap < 0,001; ^bp < 0,005; ^cp < 0,010.

poblaciones de diabéticos, mientras que las concentraciones de HDL-Apo A_{II} no sufren modificaciones, dato relacionado con una menor protección frente a la aterosclerosis del diabético no insulín dependiente (20).

Las correlaciones entre los parámetros del metabolismo hidrocarbonado y las apoproteínas de las diferentes lipoproteínas (tabla V) indican que la glucemia basal se correlaciona inversa y significativamente con la HDL-ApoA_I en ambos grupos de diabéticos a y b. Esto parece asociar la hiperglicemia con los descensos de ApoA_I y por lo tanto, con un mayor riesgo de

aterosclerosis (20). Por otra parte la fructosamina presenta una correlación directa y significativa con la Apo B de VLDL y LDL de las poblaciones diabéticas a y b, y con la VLDL-Apo E del grupo de diabéticos b.

La relación directa encontrada entre concentración de fructosamina y Apo B, parece indicar que los incrementos de Apo B en los pacientes diabéticos irían unidos a un incremento en la glicosilación de las proteínas. Se ha descrito que la unión de la glucosa a los residuos de arginina y lisina de la Apo B de la LDL inhibe la capacidad de esta lipoproteína para unirse a

Tabla IV. Concentraciones de apoproteínas de las lipoproteínas plasmáticas (mg/dl) en el grupo control y en las poblaciones patológicas Diabética-A (HbA_{1c} < 7 %) y Diabética-B (HbA_{1c} > 7 %).

Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar de la media

Las comparaciones estadísticas se establecieron entre los diferentes grupos de pacientes diabéticos y el grupo control.

	Control (N = 81)	Población diabética	
		Diabética-A (N = 10)	Diabética-B (N = 12)
VLDL-Apo B	4,30 $\pm$ 0,14	4,92 $\pm$ 0,17	18,70 $\pm$ 0,78 ^a
VLDL-Apo C _{II}	1,07 $\pm$ 0,02	1,11 $\pm$ 0,09	0,47 $\pm$ 0,06 ^a
VLDL-Apo C _{III}	4,54 $\pm$ 0,16	4,77 $\pm$ 0,21	2,92 $\pm$ 0,15 ^a
VLDL-Apo E	1,40 $\pm$ 0,09	1,70 $\pm$ 0,10	1,73 $\pm$ 0,21
LDL-Apo B	78,20 $\pm$ 2,80	83,90 $\pm$ 4,37	92,30 $\pm$ 6,57 ^b
HDL-Apo A _I	139,50 $\pm$ 3,00	124,40 $\pm$ 1,94 ^b	124,40 $\pm$ 6,03 ^b
HDL-Apo A _{II}	36,80 $\pm$ 0,71	35,20 $\pm$ 0,74	33,83 $\pm$ 1,56

^ap < 0,001; ^bp < 0,005; ^cp < 0,010.

Tabla V. Correlaciones de Pearson (*r*) entre glucosa, fructosamina y HbA_{1c} con las apoproteínas de las fracciones VLDL, LDL y HDL en las poblaciones patológicas diabética-a (HbA_{1c} < 7 %) y diabética-b (HbA_{1c} > 7 %).

	VLDL Apo B	VLDL Apo C _{II}	VLDL Apo C _{III}	VLDL Apo E	LDL Apo B	HDL Apo A _I	HDL Apo A _I
Población diabética-a (N = 10)							
Glucosa	0,08	-0,03	-0,16	-0,03	-0,18	-0,53 ^e	0,40
Fructosamina	0,51 ^c	-0,43	-0,47	0,40	0,55 ^c	-0,24	0,48
HbA _{1c}	0,74 ^b	-0,89 ^a	-0,72 ^c	0,86 ^a	0,25	-0,34	0,19
Población diabética-b (N = 12)							
Glucosa	0,17	0,10	-0,18	-0,08	-0,15	-0,58 ^c	0,40
Fructosamina	0,58 ^c	-0,33	-0,35	0,51 ^c	0,52 ^c	-0,27	0,44
HbA _{1c}	0,92 ^a	-0,89 ^a	-0,70 ^b	0,86 ^a	0,50 ^c	-0,22	-0,23

^ap < 0,001; ^bp < 0,005; ^cp < 0,010

su receptor específico (25), hecho que aceleraría el proceso de aterogénesis. En este sentido la fructosamina sería un buen indicador del proceso.

El porcentaje de HbA_{1c} (tabla V), es el más correlacionado con todas las apoproteínas de la VLDL del paciente diabético no insulino dependiente de ambas poblaciones diabéticas a y b. Hay un claro paralelismo entre el grado de glicosilación eritrocitaria y el aumento de Apo B y Apo E y la disminución de Apo C_{II} y Apo C_{III}. Además, en el grupo de diabéticos con peor compensación del metabolismo glucídico hay una correlación directa significativa con la LDL-Apo B.

En resumen, en los pacientes diabéticos no insulino dependientes de este estudio, el % de HbA_{1c} parece que es el más relacionado con las variaciones de todas las apoproteínas de VLDL, mientras que las concentraciones de glucosa lo están con las de HDL-Apo A_I y las de fructosamina con las de LDL-Apo B.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Servicio de Diabetología del Hospital de la Seguridad Social «La Paz» y al Dr. Badenas del Centro de Diabetología de la Cruz Roja su desinteresada colaboración.

Resumen

Se cuantifican las apolipoproteínas plasmáticas y las procedentes de las lipoproteínas plasmáticas VLDL, LDL y HDL en 56 pacientes varones de edades comprendidas entre 50-60 años con diabetes mellitus tipo II y en 81 controles voluntarios. Los pacientes diabéticos repartidos en dos subgrupos teniendo en cuenta que sus niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) sean inferiores o superiores al 7 %, por considerar que el % de HbA_{1c} es un índice apropiado del control de glucemia en largos períodos de tiempo. Tanto los dos grupos de pacientes diabéticos estudiados, como los controles están muy equilibrados en la incidencia de los factores que pueden tener influencia sobre los parámetros estudiados del metabolismo lipídico: edad, tabaco, alcohol, hipertensión y actividad física. Se analizan las correlaciones entre glucosa, fructosamina y niveles de HbA_{1c} y se establecen las correlaciones entre los parámetros del metabolismo hidrocarbonado y las apoproteínas de las diferentes lipoproteínas. En ambos grupos de pacientes diabéticos se observa una correlación significativa (*p* < 0,050) entre glucosa/fructosamina, glucosa/HbA_{1c} y fructosamina/HbA_{1c}. No obstante, en ambos grupos de pacientes diabéticos los niveles de HbA_{1c} están positiva y significativamente correlacionados (*p* < 0,050)

con la Apo-B y Apo-E y negativa y significativamente correlacionados con los Apo-C_{II} y Apo-C_{III}.

Palabras clave: % HbA_{1c}, Apolipoproteínas, Diabetes tipo II.

Bibliografía

1. Briones, E. R., Mao, S. J. T., Palumbo, P. J., O'Fallon, W. M., Chenoweth, W. y Kottle, B. A.: *Metabolism*, 33, 42-48, 1984.
2. Calvo, C., Ponsin, G. y Berthezene, F.: *Diabetes Metab.*, 14, 264-270, 1988.
3. Cuesta, C. Sánchez-Muniz, F. I., García-La Cuesta, A., Garrido, R., Castro, A., San-Félix, B. y Domingo, A.: *Atherosclerosis*, 80, 33-39, 1989.
4. Dolhofer, R. y Wieland, O. H.: *FEBS Lett.*, 103, 282-286, 1979.
5. Dunn, F. L., Raskin, P., Bilheimer, D. W. y Grundy, S. M.: *Metabolism*, 33, 117-128, 1984.
6. Halpern, M. J. Lipid metabolism and its Pathology. Plenum Press, Nueva York, 1985.
7. Havel, R. J., Eder, H. A. y Bragden, J. H. *Clin. Chem. Acta*, 34, 1345-1355, 1955.
8. Hayakawa, M., Ando, F. y Kuzuya, F.: *Nippon Rinsho*, 46, 665-678, 1988.
9. Jeppson, J. O., Franzen, B. y Nilson, K. O.: *Science Tools*, 25, 69-71, 1978.
10. Kane, J. P.: *Anal. Biochem.*, 53, 350-356, 1973.
11. Kennedy, L., Mehl, T. D., Riley, W. J. y Merimee, T. J.: *Diabetologia*, 21, 94-99, 1981.
12. Kissebach, A. H., Alfarsi, S. y Vydelingum, N.: *Clin. Res.*, 27, 701-708, 1979.
13. Laurell, C. B.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 29, 21-24, 1977.
14. Lipid Research Clinic program. Manual of Laboratory Operation, vol. 1: Lipid and Lipoprotein Analysis. National Institutes of Health. Publication No (NIH) 75-628. Bethesda, M. D. 1974, p. 75.
15. Lyons, T. J., Baynes, J. W., Patrick, J. S., Colwell, J. A. y Lopes-Virella, M. F.: *Diabetologia*, 29, 685-691, 1986.
16. Mccance, D. R., Coulter, D., Smye, M. y Kennedy, L.: *Diabetic Med.*, 4, 434-440, 1987.
17. Mamo, J. C., Szeto, L. y Steiner, G.: *Diabetologia*, 33, 339-348, 1990.
18. Maruhara, Y., Saito, F., Hikichi, I., Hashimoto, T., Takahashi, K. y Kaito, I.: *Tohoku J. Exp. Med.*, 138, 419-426, 1982.
19. Pfeifer, M. A., Brunzell, J. D., Best, J. D., Judzewitsch, R. G., Halter, J. B. y Porter, D., Jr.: *Diabetes*, 32, 525-532, 1983.
20. Sánchez-Cabezudo, M.: Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 1990.
21. Sánchez-Cabezudo, M., Martín, M. C. y Ródenas, S.: *An. Real Acad. Farm.*, 53, 103-109, 1987.
22. Sasaki, J. y Cottam, G. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 713, 199-205, 1982.
23. Triau, J. E., Arbetter, J. y Schaefer, E. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 877, 359-365, 1986.
24. Witztum, J. L. y Koschinsky, T.: *Prog. Clin. Biol. Res.*, 304, 219-227, 1989.
25. Witztum, J. L., Mahoney, E. M. y Branks, M. J. *et al.*: *Diabetes*, 31, 283-291, 1982.
26. Yue, D. K., Botros, M., Bending, J. J., Casparie, A. F., Klaff, L., Berger, W. y Fluckiger, R.: *Medicographia*, 5, 30-42, 1983.