

LA GLICACION Y GLICOXIDACION DE LAS LIPOPROTEINAS SU IMPORTANCIA EN LA DIABETES MELLITUS

SARA M. ACTIS DATO, OSCAR R. REBOLLEDO

*Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA, UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de La Plata*

Resumen La hiperglucemia crónica produce un incremento en el nivel de glicación no enzimática de proteínas estructurales y circulantes del organismo generando simultáneamente un estrés oxidativo (producción de radicales libres del oxígeno) y carbonílico, proceso denominado glicoxidación. Se ha demostrado que las diferentes lipoproteínas (LP) plasmáticas son afectadas por la glicación y/o glicoxidación produciéndose en ellas modificaciones fisicoquímicas y alteraciones en su metabolismo. La glicoxidación de las LP adquiere características particulares, con respecto a otras proteínas, por producirse al mismo tiempo en la porción proteica así como en los fosfolípidos que contienen, y generar un estrés oxidativo que favorecería la lipoxidación. Evidencias acumuladas en los últimos años sugieren que los cambios generados, especialmente en las LDL que han sido las LP más estudiadas, podrían ser en parte responsables del desarrollo de la micro-macrovasculopatía diabética. Este tipo de complicaciones, una vez establecido es de difícil control y su progresión muchas veces inevitable por las características de irreversibilidad de los procesos de glicoxidación. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que la glicación y/o glicoxidación dependen de los niveles promedio de glucosa circulante, la meta principal del tratamiento de las personas con diabetes deberá ser el mantenimiento de dichos promedios en valores lo más cercanos posibles a los de personas sin diabetes. Este trabajo resume los últimos adelantos en la glicación-glicoxidación de las LP y su importancia en la diabetes mellitus para información del profesional no especializado en el tema.

Abstract *Lipoprotein glycation and glycooxidation: their importance in diabetes mellitus.* Chronic hyperglycemia induces an increase in the non enzymatic glycation of circulating and structural proteins together with a glucose-generated oxidative and carbonyl stress, known as glycooxidation. The physicochemical characteristics and the metabolism of lipoproteins are altered by glycation/glycooxidation and resemble those of other body proteins, except for the fact that there is a simultaneous glycooxidation of both protein and phospholipid components generating an oxidative stress that increases lipoxidation. Information gathered during the last few years suggests that, among lipoproteins, modified LDL would principally contribute to developing diabetic micro-macrovascular complications. The control and the prevention of the progress of such complications are difficult to attain due to the irreversibility of glycooxidation. As glycation/glycooxidation is related to mean blood glucose, the goal in diabetes treatment must be the achievement of a close to normal metabolic control. This review summarizes advances in the importance of lipoprotein glycation/glycooxidation in diabetes mellitus.

Key words: lipoprotein glycooxidation, non enzymatic glycation, LDL glycooxidation, diabetes, atherosclerosis

Los estudios epidemiológicos aportan numerosas evidencias acerca de la mayor incidencia de las enfermedades cardiovasculares en los pacientes diabéticos con respecto a la población general¹. Estas complicaciones se relacionan con el desarrollo acelerado de aterosclerosis que tiene una aparición prematura afectando a la vasculatura de manera más extensa en los pacientes diabéticos que en los individuos no diabéticos. En los diabéticos Tipo 2 la aterosclerosis aparece como la mayor causa de muerte y en más de la mitad de

estos pacientes es la responsable de infartos de miocardio². En los diabéticos Tipo 1 también figura la aterosclerosis como uno de los mayores causales de mortalidad. Además, en los individuos no diabéticos, pero

Abreviaturas:

AG: ácidos grasos libres; **apo:** apoproteína; **CA:** compuesto de Amadori; **CE:** colesterol esterificado; **CETP:** proteína transportadora de colesterol esterificado; **CI:** complejos inmunes; **CL:** colesterol libre; **Col:** colesterol; **G-LDL:** lipoproteínas de baja densidad glicadas; **HDL:** lipoproteínas de alta densidad; **HDL₂:** subfracción 2 de HDL; **HDL₃:** subfracción 3 de HDL; **HSPG:** heparansulfato proteoglicanos; **IDL:** lipoproteínas de densidad intermedia; **LCAT:** lecitina colesterol acil transferasa; **LDL:** lipoproteínas de baja densidad; **LH:** lipasa hepática; **LP:** lipoproteínas; **LPL:** lipoproteína lipasa; **N-LDL:** lipoproteínas de baja densidad sin glicar; **ox-G-LDL:** LDL glicoxidadas; **ox-LDL:** LDL oxidadas; **PC:** fosfatidil colina; **PE:** fosfatidil etanolamina; **PGA:** productos de glicación avanzada; **PL:** fosfolípidos; **PUFA:** ácidos grasos polinsaturados; **REC B/E:** receptor clásico de LDL; **TG:** triglicéridos; **VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad.

Recibido: 15-III-2000

Aceptado: 8-VI-2000

Dirección postal: Dr. Oscar R. Rebolledo, CENEXA, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, Calle 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina
Fax: (54-0221) 4222081 e-mail: ar@nahuel.biol.unlp.edu.ar

con una tolerancia a la glucosa alterada, el riesgo de desarrollar complicaciones cardiovasculares por aterosclerosis está incrementado.

Las alteraciones que ocurren en forma temprana en los vasos de los diabéticos incluyen anomalías en la permeabilidad de la pared vascular, aumento de la actividad procoagulante y alteraciones en la relajación dependiente de factores endoteliales.

Entre los principales factores de riesgo responsables del desarrollo de aterosclerosis en la población general figura la dislipemia, especialmente el aumento de las LDL circulantes y del colesterol (Col) que transportan. La manifestación característica del inicio del proceso aterosclerótico es la acumulación de lipoproteínas en la íntima arterial, cuyo principal componente son las LDL provenientes del plasma. Modificaciones sucesivas de las LDL en la pared arterial, sobre todo de tipo oxidativo, determinan su potencial aterogénico³.

En los pacientes diabéticos, las lipoproteínas (LP) presentan con frecuencia cambios cuali y cuantitativos en su composición y varios pasos de su metabolismo están alterados. Los determinantes de la dislipemia diabética son varios y dependen del tipo de diabetes. Las anomalías del metabolismo lipoproteico juegan un rol importante en las complicaciones vasculares ateroscleróticas de dichos pacientes^{4, 5}.

La hiperglucemia sostenida produce un incremento en el nivel de glicación no enzimática de proteínas estructurales y circulantes, entre ellas las LP. Este proceso es uno de los factores que, en la diabetes, es capaz de introducir modificaciones en la estructura de las LP y como consecuencia alterar el comportamiento de las mismas^{6, 7}. Evidencias acumuladas en los últimos años sugieren que la combinación de procesos de glicación

no enzimática y oxidación por radicales libres, hipótesis del estrés oxidativo propuesta por Baynes⁸, actuando sobre las LP, contribuiría a generar un mayor riesgo aterogénico en los pacientes diabéticos. Este hecho ha determinado la realización de numerosas investigaciones sobre este tema, en especial luego que el trabajo de investigación clínica con una población numerosa de diabéticos Tipo 1, sobre el efecto del tratamiento intensivo de la diabetes en la aparición y progresión de complicaciones de la diabetes mellitus (DCCT), identificara a la hiperglucemia como un factor de riesgo para el desarrollo de las mismas⁹.

El objetivo de este artículo es presentar en forma breve y no exhaustiva, ya que existen excelentes revisiones sobre esta temática, un resumen de los efectos de la glicoxidación sobre las LP y su probable participación en el desarrollo de la vasculopatía diabética.

Los esquemas del metabolismo general de las lipoproteínas (Fig. 3 y 4) se incluyen para facilitar al lector no especializado en el tema una mejor comprensión del texto.

Glicación y glicoxidación: su acción sobre las lipoproteínas

La glicación no enzimática consiste en la interacción de la glucosa (u otros monosacáridos) con las proteínas, sin la participación de enzimas, en un proceso que depende exclusivamente de la concentración del monosacárido y del tiempo de contacto con las proteínas determinado por la vida media de cada una en particular (Fig. 1).

En la etapa inicial de la glicación se produce la unión no enzimática y reversible del grupo aldehído de la glu-

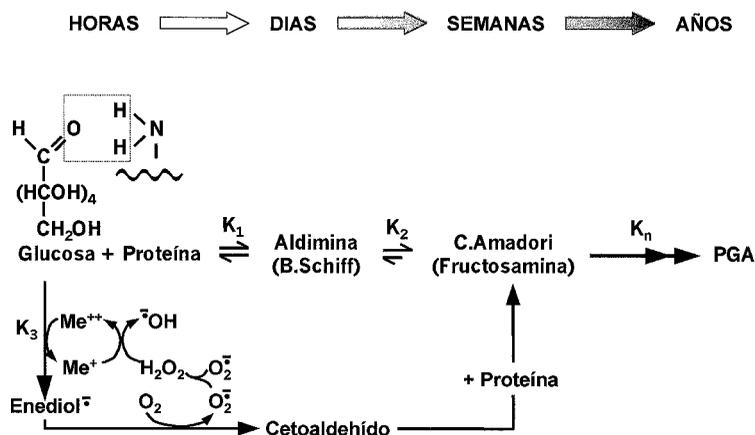


Fig. 1.- Esquema de la glicación y glicoxidación de proteínas por los siguientes mecanismos: a) formación de aldimina y CA y b) producción de cetoaldehídos reactivos por autooxidación de la glucosa con generación de radicales libres del oxígeno

cosa con grupos amino libres de las proteínas (amino terminal o ϵ -amino de lisinas) con formación de aldiminas o bases de Schiff. Posteriormente, por reordenamientos moleculares se generan los compuestos de Amadori (CA), llamados también fructosaminas^{10,11} porque el resto glucosil se transforma en fructosil por el desplazamiento del grupo carbonilo del carbono 1 al carbono 2 durante el reordenamiento. Por otro lado, en el caso de las LP, debido a la presencia de grupos amino libres en los fosfolípidos (PL) también se forman CA sobre el componente lipídico de las mismas¹².

En la segunda etapa de la glicación, los CA participan en una serie de reacciones irreversibles, colectivamente llamadas reacciones de Maillard, para dar los productos de glicación avanzada (PGA) o AGE (*Advanced Glycation Endproducts*). Las reacciones de Maillard son probablemente de mayor importancia para las proteínas de vida media larga tales como los colágenos y el cristalino. Sin embargo, también pueden afectar a proteínas de vida media corta, como las LP, especialmente cuando éstas son retenidas por períodos prolongados en la pared arterial. La formación de PGA comprende reacciones de deshidratación, condensación cíclica, entrecruzamientos intermoleculares y oxidación por radicales libres del oxígeno. En el caso de las LP, las reacciones de oxidación son más complejas que para otras proteínas debido a la presencia de ácidos grasos polinsaturados (PUFA) fácilmente oxidables. La combinación de las reacciones de glicación y oxidación, llamada en conjunto glicoxidación, genera productos que pueden ser especialmente aterogénicos^{8,13,14,15}. En los pacientes diabéticos han sido detectados varios tipos de LP modificadas, incluyendo LP glicadas, LP oxidadas y LP glicoxidadas. La interacción entre glicación y oxidación provee una probable explicación para el incremento de aterosclerosis que frecuentemente se asocia con la diabetes^{14,16}. (Ver glicoxidación de LDL más adelante).

La primera demostración del incremento de la glicación de las apoproteínas, o sea el componente proteico de las LP, expuestas a concentraciones elevadas de glucosa *in vivo* e *in vitro*, fue realizada por Schleicher y col. en 1981¹⁷; las principales apoproteínas, A_I, A_{II}, B, C y E, incorporaban glucosa de manera proporcional al tiempo de incubación y a la concentración de glucosa en el sistema. Observaron también un incremento de dos veces en la glicación de apoB de LDL de pacientes diabéticos comparadas con LDL de individuos no diabéticos y fueron los primeros en sugerir que el incremento de la glicación de las apoproteínas *in vivo* podría tener consecuencias metabólicas significativas.

De manera concordante, Curtiss y Witztum¹⁸, encontraron que en individuos hiperglucémicos la glicación afectaba a todas las clases de apoproteínas y Kim y Kurup¹⁹ demostraron un incremento del nivel de fructosil-lisina

en LDL de pacientes diabéticos. Por otro lado Lyons y col.²⁰ observaron una correlación positiva entre el grado de glicación de LDL en diabéticos Tipo 1 e índices de control glucémico como fructosamina y HbA_{1c}. Sin embargo, pacientes normolipémicos y con un control glucémico aceptable ya presentaban un incremento en la glicación de sus LDL. Todos estos trabajos de los años 80 pusieron en relieve la importancia de la glicación de las apoproteínas con respecto a su probable efecto sobre el metabolismo de las mismas.

El componente lipídico, principal constituyente de las LP, también puede glicarse como ya hemos indicado. La glicación de los lípidos de las LP fue estudiada en forma intensiva por Bucala y col.¹² quienes propusieron la hipótesis de que los PL que tuvieran grupos amino libres podrían reaccionar con glucosa para formar PGA de manera similar a los polipéptidos²¹. Su demostración se logró incubando PL en presencia de altas concentraciones de glucosa y quelantes metálicos. De esta manera demostraron que la fosfatidiletanolamina (PE), que tiene un grupo amino libre, reaccionaba para formar CA y posteriormente PGA, a diferencia de la fosfatidilcolina (PC) que, por tener un grupo amonio cuaternario, no podía formar la aldimina inicial del proceso de glicación no enzimática. En forma paralela con la formación de PGA-PE, se producía la oxidación de ácidos grasos, detectable por la aparición de aldehídos reactivos (Fig. 2). En cambio cuando se incubaba PC (que no se glica) con glucosa y lisina, no había oxidación, mostrando que la formación de PGA debía ocurrir directamente sobre el PL para inducir la oxidación de los ácidos grasos. Entre los productos resultantes de la glicación avanzada de lípidos identificaron al 4-hidroxihexenal, un aldehído que se forma por la ruptura oxidativa del ácido docosahexenoico n-3, que es un componente importante de las LP. El mismo modelo de incubación *in vitro* fue empleado para estudiar la contribución de la glicación avanzada a las modificaciones oxidativas de las LDL. La incubación de LDL con glucosa condujo a la formación de PGA tanto en el componente lipídico como en la apoB; los PGA-PL se formaron con mayor velocidad que los PGA-apoB. Al mismo tiempo se detectaron productos de oxidación de las LDL. En base a los estudios descriptos, Bucala y col. propusieron que la oxidación que ocurre durante la glicación avanzada de los PL, actuando directamente dentro del microambiente lipídico, podría constituir *in vivo* un mecanismo iniciador de la peroxidación de los PUFA de las LP que sería independiente de otros mecanismos oxidantes (ver glicoxidación de LDL más adelante). La identificación posterior de un intermediario dicarbonílico de la glicación avanzada de lípidos, la amino-didesoxiosona, sirvió de apoyo a la hipótesis anterior. Dicho intermediario tiene propiedades oxidantes, y al estar unido al grupo amino de un PL

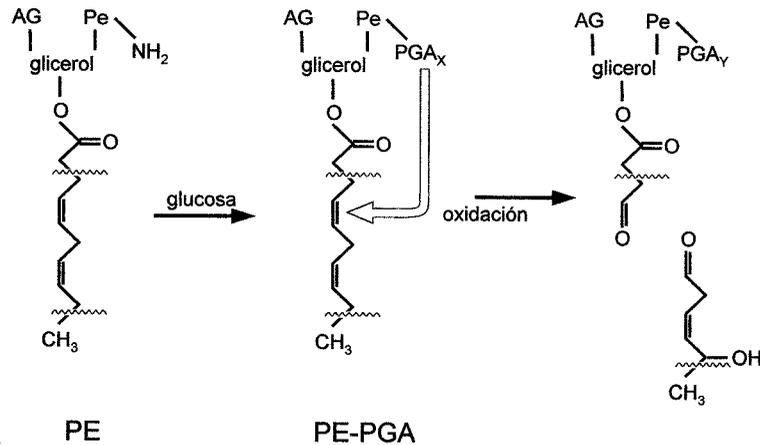


Fig. 2.— Esquema de la glicosilación de PL: formación de PGA con posterior daño oxidativo de las cadenas de los ácidos grasos laterales. Pe-NH₂: etanolamina-fosfato. (adaptado de referencia 12).

podría interactuar con cadenas de ácidos grasos vecinos e iniciar su peroxidación¹².

Passarelli y col.²² realizaron la glicosilación *in vitro* de VLDL, LDL, HDL₂ y HDL₃. La incorporación de glucosa en todas las LP fue proporcional al tiempo de incubación y ocurrió simultáneamente en la fracción lipídica y en la fracción apoproteica, con predominio en esta última. La mayor parte del contenido de glucosa en los lípidos correspondió a PE.

Las LP circulantes son glicadas como consecuencia de su reacción con glucosa, pero además pueden interactuar con PGA-péptidos que entran al compartimento plasmático provenientes del catabolismo de proteínas estructurales modificadas por PGA. Los PGA-péptidos o productos derivados de ellos circulan en forma aumentada en los pacientes diabéticos, especialmente si existe insuficiencia renal. En LDL aisladas de pacientes diabéticos con y sin insuficiencia renal, Bucala y col. han demostrado la presencia en cantidad aumentada de PGA-apoB y PGA-PL, en una relación cuantitativa semejante a la observada en sus ensayos de glicosilación *in vitro*^{21, 23}.

Efectos de la glicosilación no enzimática sobre las lipoproteínas

A continuación se describen los efectos de la glicosilación no enzimática sobre las diferentes LP, haciendo referencia a sus consecuencias metabólicas. La mayoría de las publicaciones se refieren a la glicosilación de las LDL, por su mayor asociación con la aterogénesis.

LDL

La glicosilación no enzimática modifica las características fisicoquímicas de las LDL, entre ellas su migración cromatográfica, propiedad que se aprovecha para realizar su fraccionamiento.

A partir de LDL aisladas de diabéticos Tipo 1 y de controles no diabéticos, Klein y col.²⁴ separaron y caracterizaron dos fracciones, una glicada (G-LDL) y otra no glicada (N-LDL), por cromatografía de afinidad que fija compuestos de fructosil-lisina. El porcentaje de G-LDL fue mayor para los pacientes diabéticos que para los controles como así también el grado de glicosilación de dicha fracción. Con respecto a la composición química, las G-LDL de ambos grupos estaban enriquecidas en triglicéridos (TG). Estos resultados indican que en pacientes diabéticos Tipo 1 hay más moléculas de LDL que están glicadas y que éstas están modificadas por glicosilación en mayor proporción que las correspondientes a individuos normales.

En una publicación de Sobenin y col.²⁵ se resumen los hallazgos referentes a las modificaciones aterogénicas de las LDL de los pacientes diabéticos. De acuerdo a sus resultados hay una fracción de LDL modificada que coexiste con la LDL nativa. La misma se caracteriza por varias alteraciones en sus propiedades fisicoquímicas: presenta un mayor grado de glicosilación (la cantidad de restos de fructosil-lisina es 1.3-1.7 veces mayor que para las LDL nativas); su contenido en ácido siálico está disminuido entre 25-60%; de acuerdo a las medidas de diámetro y densidad está constituida por partículas pequeñas y densas y éstas tienen una carga neta superfi-

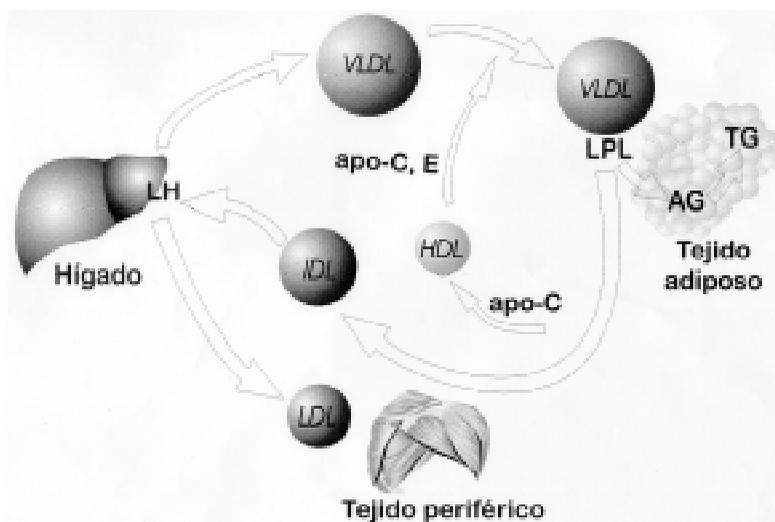


Fig. 3.– Esquema simplificado del metabolismo de las VLDL y LDL.

cial más electronegativa. En suma, la fracción de LDL modificada *in vivo* en los pacientes diabéticos estaría representada por LDL glicadas, desializadas, pequeñas y densas y más electronegativas.

Las LDL transportan la mayor parte del Col plasmático y lo distribuyen a los tejidos regulando la síntesis intracelular de Col. Son catabolizadas en su mayor parte, por fijación a receptores de membrana (REC B/E) a través de la apoB (Fig. 3). El aumento del nivel plasmático de LDL, y/o cambios en sus subfracciones, se asocian con un incremento del riesgo aterogénico²⁶. En los pacientes diabéticos, si bien dicho nivel se mantiene muchas veces dentro del rango normal, se producen alteraciones en las subfracciones componentes, de diámetro, de densidad y de composición lipídica, que las hacen más aterogénicas²⁷. A ellas se agrega la glicación no enzimática, que modifica cualitativamente a las LDL y afecta su metabolismo, pudiendo aumentar su potencial aterogénico. En este sentido, la glicación está directamente ligada a la oxidación de las LDL en la pared arterial^{14, 16}.

A continuación nos referiremos a varias publicaciones relacionadas con los efectos de la glicación y/o glicoxidación sobre diferentes etapas del metabolismo de las LDL.

a) Interacción de LDL glicadas (G-LDL) con el receptor clásico de LDL (REC B/E). La glicación interfiere en el reconocimiento de la LDL por su receptor específico de membrana (REC B/E) disminuyendo su fijación y degradación y favoreciendo el aumento del nivel plasmático de LDL.

La glicación *in vitro* de LDL ha permitido estudiar el comportamiento de las G-LDL sin la interferencia de otros

factores, tales como cambios de composición lipídica, que pueden estar presentes en LDL aisladas de pacientes diabéticos. La captación de LDL glicadas *in vitro* por fibroblastos humanos, que expresan el REC B/E, está disminuida con respecto a la de LDL no glicadas, en forma proporcional al grado de glicación^{28, 29, 30}. Steinbrecher y Witztum³¹ investigaron el efecto de pequeños grados de glicación (2-12% de lisinas modificadas *in vitro*) en el aclaramiento *in vivo* de LDL. Demostraron una relación lineal inversa entre glicación de LDL y su aclaramiento en cobayos. Modificaciones de 2-5% de lisinas, del mismo orden del hallado por los autores en pacientes diabéticos, producían una disminución del catabolismo del 5-25%.

La glicación avanzada de las LDL también modifica su interacción con el REC B/E. Usando ratones transgénicos que expresan el receptor humano para LDL, se comparó el aclaramiento de PGA-LDL (preparadas por incubación de LDL con glucosa o con PGA sintéticos) y de LDL no glicadas, encontrándose una relación inversa entre el nivel de glicación avanzada de la apoB y el aclaramiento de las LDL²³. El mismo grupo de trabajo investigó de qué forma la glicación avanzada interfiere en la captación y degradación de las LDL. Para ello, LDL nativa fue modificada *in vitro* hasta alcanzar un nivel de glicación similar al encontrado en pacientes diabéticos. Las PGA-LDL mostraron, en los ensayos de captación, una disminución en la unión al REC B/E de fibroblastos humanos proporcional a la modificación por PGA. Se localizaron los sitios de fijación de PGA a la apoB asociados con la disminución de la interacción con el receptor. A pesar del gran tamaño de la apoB (4536 aminoácidos) y de su contenido alto en lisinas (359 unidades), el sitio

predominante de formación de PGA se encuentra en una región pequeña, de 67 aminoácidos (9 lisinas potencialmente reactivas), localizada a 1791 aminoácidos del dominio de unión al REC B/E. Los autores sugieren que la glicación avanzada en esta región alejada del dominio de unión, podría inducir un cambio en la conformación espacial de la apoB suficiente como para alterar la interacción ligando-receptor³². En un trabajo posterior identificaron otros sitios que pueden ser modificados por glicación avanzada *in vitro*. Dos de ellos están ubicados a ambos lados del dominio reconocible por el REC B/E. No se encontró, en cambio, glicación de las lisinas pertenecientes a dicho dominio. La conclusión de los autores es que la modificación de las lisinas adyacentes al dominio de unión podría ser la responsable primaria de la captación disminuida de PGA-LDL por el REC B/E³³.

b) Interacción de G-LDL con receptores de macrófagos y células de la íntima arterial. De gran relevancia en la iniciación de la lesión aterosclerótica es la captación de LDL por los macrófagos y su transformación en células espumosas³. Se sabe que los macrófagos, además del REC B/E, poseen otros receptores que reconocen LDL oxidadas y que también tienen receptores para PGA-proteínas. La existencia de diferentes receptores celulares capaces de reconocer productos de oxidación o PGA serviría para remover *in vivo* moléculas así modificadas limitando sus potenciales efectos perjudiciales. Por otro lado, tal sistema podría determinar respuestas disfuncionales en situaciones patológicas tales como aterosclerosis, hiperlipemia o diabetes³⁴. Debido al incremento de la incidencia de aterosclerosis en la diabetes resulta importante estudiar la interacción de los macrófagos con las G-LDL.

Lopes Virella y col.³⁵ demostraron que la glicación *in vitro* de LDL estimula su captación y degradación por macrófagos derivados de monocitos humanos, determinando un incremento en la síntesis y acumulación de colesterol esterificado (CE) en los mismos. Como el reconocimiento de G-LDL por el REC B/E de macrófagos estaba disminuido, los autores analizaron otras vías posibles de captación. De acuerdo a los resultados propusieron la existencia de un mecanismo de alta capacidad y baja afinidad, diferente del REC B/E, que sería el responsable en los macrófagos de la captación y degradación de la mayor parte de las G-LDL.

Las LDL aisladas de pacientes diabéticos Tipo 1, también determinan una mayor síntesis y depósito de CE en macrófagos³⁶, que se correlaciona con el grado de glicación. En estos pacientes la composición lipídica de las LDL era similar a la de los controles no diabéticos y la única diferencia entre ellas era aparentemente la glicación, que en los pacientes diabéticos estaba incrementada en 1.4 veces.

En una publicación más reciente²⁴, los mismos autores estudiaron el metabolismo de las subfracciones G-LDL y N-LDL obtenidas a partir de LDL totales de diabéticos Tipo 1 y de controles no diabéticos. Cuando las subfracciones se incubaron con fibroblastos, que sólo expresan el REC B/E, la velocidad de acumulación de las N-LDL de ambos grupos fue mayor que la de las G-LDL correspondientes. Por el contrario, en la incubación con macrófagos derivados de monocitos humanos, tanto las G-LDL de los pacientes diabéticos como las de los controles, fueron acumuladas con mayor velocidad y determinaron una mayor síntesis de CE en dichas células que las N-LDL correspondientes. Además, comparando G-LDL de diabéticos y de controles, la velocidad de acumulación en macrófagos fue mayor para las primeras. De acuerdo a los autores, estos resultados apoyan los obtenidos previamente en el mismo laboratorio que mostraban que las LDL totales, aisladas de diabéticos Tipo 1 o Tipo 2 o glicadas *in vitro*, son captadas y degradadas por macrófagos principalmente a través de un mecanismo de alta capacidad y baja afinidad, diferente del receptor clásico de LDL, determinando una mayor síntesis de CE en ellos. Las G-LDL serían por lo tanto más aterogénicas que las N-LDL.

Productos de glicación avanzada fijados a la albúmina pueden interaccionar con las LDL y alterar sus propiedades fisicoquímicas³⁷. Las modificaciones inducidas por PGA-albúmina se acompañan por un aumento en la velocidad y cambios en los mecanismos de captación por macrófagos de las LDL así modificadas. Disminuye la fijación al REC B/E en favor de otros mecanismos mediados por receptores pero que no son saturables y por fagocitosis. PGA-proteínas, incluyendo PGA-albúmina, han sido detectadas en la íntima arterial de pacientes diabéticos. Los mecanismos descritos podrían *in vivo* favorecer la transformación de macrófagos en células espumosas³⁸.

Sobenin y col.²⁵ demostraron que la fracción de LDL modificada presente en los pacientes diabéticos (cuyas características fisicoquímicas ya se han mencionado) es aterogénica con respecto a la inducción del depósito de Col en células de íntima de aorta humana de cultivo, a diferencia de la fracción de LDL nativa con la cual coexiste. De acuerdo a los autores la glicación y la desialización afectarían en forma sinérgica el potencial aterogénico de las LDL de los diabéticos.

c) Atrapamiento de G-LDL en la íntima arterial. En condiciones normales, las LDL plasmáticas penetran en la íntima arterial a través del endotelio intacto pudiendo volver libremente al plasma y la concentración de LDL en la íntima arterial se correlaciona directamente con su concentración plasmática. En la diabetes, se produce una acumulación de PGA sobre las fibras del colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular arterial de baja

velocidad de recambio y se generan grupos reactivos capaces de formar entrecruzamientos covalentes con proteínas solubles que circulan a través de ellas. De esta forma las LDL, que tienen una vida media corta en la circulación, pueden quedar covalentemente inmovilizadas por los PGA reactivos de las proteínas estructurales arteriales de vida media larga¹¹. Se ha demostrado que para una concentración constante de LDL, la proporción de atrapamiento covalente se incrementa en forma lineal con el grado de glicación del colágeno y viceversa si se mantiene constante la glicación de éste³⁹. Por otro lado, la glicación de las LDL incrementa su interacción con los proteoglicanos arteriales, favoreciendo su retención en la matriz extracelular; la fijación de G-LDL a proteoglicanos *in vitro* es proporcional al grado de glicación⁴⁰. Además, la generación de radicales libres por peroxidación de los PUFA en las lipoproteínas adheridas puede contribuir al daño oxidativo de proteínas estructurales vecinas.

Debido al atrapamiento covalente se produce una excesiva acumulación lipoproteica en la íntima arterial, aun para niveles plasmáticos normales de LDL, con consecuencias importantes. Al estar impedida la libre difusión, las LDL proveen sitios adicionales para la formación de PGA. Por lo tanto se estimulan las reacciones de glicación y especialmente de oxidación, que continúan modificando a las LDL. Los productos de glicoxidación subendoteliales formados tienen efecto quimiotáctico sobre los monocitos y facilitan su transformación en macrófagos. Estos, a su vez, pueden captar por endocitosis productos de glicoxidación de la matriz extracelular y al mismo tiempo LDL glicoxidadas (ox-G-LDL), favoreciéndose la formación de células espumosas y la liberación de citoquinas y otros factores que contribuyen a un mayor daño arterial¹⁴. Estudios inmunoquímicos han demostrado cantidades significativas de PGA en lesiones ateromatosas de pacientes diabéticos comparadas con lesiones de individuos no diabéticos⁴¹.

d) Glicoxidación de LDL. Las modificaciones oxidativas de las LDL cumplen un rol importante en la patogénesis de la lesión aterosclerótica en la población general y su estudio ha recibido considerable atención^{3, 12, 16}. Se cree que la oxidación ocurre principalmente en la íntima arterial, en microdominios aislados de los antioxidantes o cuando las defensas antioxidantes han sido sobrepasadas. El proceso es complejo, en un principio afecta al componente lipídico, pero luego se extiende a la apoproteína produciéndose modificaciones de la misma y en algunos casos fragmentación de ésta. Los PUFA son particularmente susceptibles al ataque por radicales libres. La oxidación se inicia presumiblemente con la peroxidación de los PUFA de los PL superficiales, con formación de peróxidos lipídicos, en un proceso en el que intervienen radicales libres y que se autopropaga.

Se extiende luego a los lípidos del interior de la partícula, produciéndose modificaciones de los PUFA de los TG y también del Col. Varios mecanismos han sido propuestos como iniciadores de la peroxidación lipídica (liberación de anión superóxido por células endoteliales o musculares arteriales, actividad aumentada de la 15-lipooxigenasa de macrófagos y transferencia de lipohidroperóxidos intracelulares a las LDL, etc.). Su participación *in vivo* no está todavía bien aclarada. La ruptura de los PUFA oxidados origina aldehídos y cetonas altamente reactivos (tales como malondialdehído y 4-hidroxinonenal) cuyo grupo carbonilo puede reaccionar covalentemente con grupos amino libres, principalmente ϵ -amino de lisina, de la apoB con formación de bases de Schiff. Los lipoperóxidos pueden también reaccionar directamente. La progresión de estas reacciones conduce a la fragmentación de la apoB o a la formación de agregados moleculares. La modificación de los restos lisina tiene profundas consecuencias en la captación de las LDL por los receptores. La modificación progresiva de los mismos produce una disminución del reconocimiento de la apoB por el REC B/E y una vez que se ha pasado un determinado umbral de modificación, la apoB es reconocida por receptores de los macrófagos diferentes del REC B/E, que reconocen LDL modificadas⁴².

En los pacientes diabéticos, se agrega otro mecanismo inherente a la diabetes, la glicación no enzimática, que también modifica cualitativamente a las LP y asociado con él aparece un incremento del estrés oxidativo (Fig. 1). La autooxidación de la glucosa o de productos de glicación temprana genera compuestos carbonílicos y radicales libres del oxígeno (superóxido e hidroxilo) y peróxido de hidrógeno que pueden producir daño oxidativo^{8, 13, 43}. Baynes⁸ introdujo en 1991 la hipótesis de la glicoxidación, que propone que el estrés oxidativo concomitante a la glicación tiene un rol importante en la etapa de la glicación avanzada de las proteínas. Las reacciones en las que intervienen radicales libres participan en la formación de los PGA, también llamados productos de glicoxidación para enfatizar su origen dual; los mismos quedan unidos de manera covalente e irreversible a las proteínas. Entre ellos se han identificado N^ε-carboximetil- lisina, N^ε-carboximetil-hidroxilisina, 3-dexosiglucosona, glioxal y otros. En el caso particular de las LP el componente lipídico también se ve afectado y puede peroxidarse por exposición a los radicales libres originados. Como ya hemos dicho, Bucala y col.¹² han demostrado la presencia de PGA-PL en LDL plasmáticas de pacientes diabéticos cuyos niveles se correlacionaban con los de productos de oxidación de las LDL (Fig. 2).

De lo expuesto anteriormente resulta que la glicoxidación constituye un mecanismo propio de la diabetes capaz de iniciar y promover la oxidación de las LDL, que se agregaría a otros mecanismos oxidativos descriptos para la población general.

Es importante recalcar que los dos procesos mencionados, el de oxidación lipídica y el de glicación no enzimática, conducen a modificaciones similares de los grupos amino de las proteínas y en ambos están involucrados productos intermedios similares¹⁵. Por ejemplo, el PGA N^ε-carboximetil-lisina puede formarse tanto por peroxidación lipídica como por glicoxidación⁴⁴. Requena y col.⁴⁵ han demostrado la formación de N^ε-carboximetil-etanolamina en PL modificados durante la glicación *in vivo*. Los productos de glicoxidación proteica y de oxidación lipídica se generarían al mismo tiempo y ambos procesos se potenciarían entre sí.

Resumiendo, cuando existe hiperglucemia sostenida, las LP plasmáticas pueden sufrir no sólo glicación incrementada sino también oxidación aumentada. Una vez formadas, las ox-LDL, las G-LDL y las ox-G-LDL podrían contribuir a las lesiones ateroscleróticas a través de mecanismos comunes¹⁶.

De acuerdo a Lyons¹⁴, las complicaciones de la diabetes, entre ellas la aterosclerosis acelerada, podrían estar mediadas por una combinación compleja de alteraciones bioquímicas que incluirían hiperglucemia, anormalidades cuali y cuantitativas de las LP y reacciones oxidativas. Estas últimas producirían compuestos carbonílicos reactivos, a partir de glucosa u otros hidratos de carbono y/o de lípidos. El paso final común sería el daño de macromoléculas por las especies carbonílicas generadas, hecho que podría contribuir al desarrollo de las complicaciones secundarias de la diabetes. La hipótesis anterior propuesta por Lyons se conoce como hipótesis del estrés carbonílico y es una ampliación de la hipótesis de la glicoxidación de Baynes⁸.

Por otro lado, evidencias recientes muestran que las LP glicadas y glicoxidadas pueden actuar como mediadores en el desarrollo de lesiones en la microvasculatura de la retina y el riñón. Esto sugiere que las modificaciones de las LP participarían tanto en la macro como en la microvasculopatía diabética¹⁴.

La susceptibilidad de las LDL a la oxidación *in vitro* ha sido propuesta como medida de la predisposición de las mismas al estrés oxidativo *in vivo*. Estudios de glicación *in vitro* seguidos de oxidación catalizada por iones metálicos han mostrado que las G-LDL se oxidan con mayor velocidad que las N-LDL, que la cantidad de ox-G-LDL formadas es proporcional a la concentración de glucosa usada para glicar⁴⁶ y que el agregado de antioxidantes suprime la peroxidación⁴⁷. Tsai y col.⁴⁸ han mostrado que la susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de LDL aisladas de pacientes diabéticos Tipo 1 con pobre control glucémico está incrementada. En cambio, Jenkins y col.⁴⁹ encuentran una respuesta normal cuando las LDL provienen de pacientes diabéticos Tipo 1 con buen control metabólico, cuyas LDL no difieren en composición

lipídica, ni en grado de glicación ni en tamaño, de las de los controles. De acuerdo a Jenkins y col. la diferencia de resultados debe relacionarse con diferencias en los niveles glucémicos entre las dos poblaciones y mostraría, una vez más, la importancia del mantenimiento de un buen control glucémico, como sugieren los resultados del DCCT⁹.

Otro tipo de metodología usada para investigar la oxidación de las LDL se basa en la detección de autoanticuerpos. Las modificaciones de las LP por glicación y oxidación alteran su estructura suficientemente como para hacerlas inmunogénicas⁶. En diabéticos Tipo 2 se han hallado altos títulos de anticuerpos contra G-LDL y ox-G-LDL. La correlación existente entre ellos constituye una prueba de que en los pacientes diabéticos está incrementada la oxidación de las LDL y de que este evento está favorecido por la glicación⁵⁰.

Las propiedades inmunogénicas de las ox-G-LP inducen la formación de complejos inmunes (CI). Se ha demostrado que las ox-G-LDL atrapadas en la pared arterial forman CI *in situ*⁵¹. Lopes Virella y col.^{52, 53} han investigado la interacción de ox-G-LDL-CI con macrófagos demostrando que los CI son más efectivos que las LDL modificadas en estimular la transformación en células espumosas y la acumulación de CE. Además promueven la sobre expresión de receptores y el incremento y la síntesis y liberación de citoquinas.

El metabolismo de las ox-G-LDL en cultivo de células endoteliales de aorta bovina fue estudiado por Kobashi y col.⁵⁴. Las LDL plasmáticas deben atravesar la barrera de células endoteliales para penetrar en el espacio subendotelial y una cierta proporción de las mismas es metabolizada en dichas células. La unión y degradación de ox-G-LDL por células endoteliales es mayor que la correspondiente a N-LDL y a G-LDL. La remoción de las ox-G-LDL por las células endoteliales vasculares podría contribuir al rol protector de estas células contra la aterosclerosis en pacientes diabéticos.

En conclusión, las evidencias aportadas por las publicaciones comentadas anteriormente, indican que las G-LDL presentan un comportamiento metabólico alterado que las hace más aterogénicas que las N-LDL y que sería el resultado de varios procesos ligados entre sí: afinidad reducida por el REC B/E de diferentes tejidos con disminución del aclaramiento plasmático, captura en la íntima arterial y favorecimiento de su oxidación, captación aumentada por macrófagos y aparición de propiedades inmunogénicas. Las G-LDL y en especial las ox-G-LDL y probablemente los CI originados tendrían una participación importante en la patogénesis de la aterosclerosis debido a su efecto sobre las funciones de macrófagos, plaquetas y células endoteliales y musculares de la pared arterial^{14, 15, 53}.

movido por las HDL, su activación disminuida podría asociarse *in vivo* con una reducción del transporte reverso del Col.

La proteína transportadora de CE (CETP) es la responsable del movimiento de CE y TG entre las diferentes LP. Aunque pueden intervenir todas ellas, su acción primaria es la transferencia de CE de las HDL a las VLDL y de TG en sentido contrario. El transporte de CE es mayor en el período postprandial debido a la mayor concentración de TG y VLDL plasmáticos. Como la CETP favorece el transporte de CE hacia las VLDL, que se convierten luego en LDL, la reacción en la que interviene la CETP sería pro aterogénica⁶⁵. Passarelli y col.²² aislaron LP de pacientes diabéticos y de controles normales y estudiaron *in vitro* el transporte de CE de las HDL₂ y HDL₃ a las VLDL y LDL a cambio de triglicéridos, empleando una misma preparación de CETP. Demostraron que la velocidad de esta reacción estaba aumentada cuando se empleaban las LP aisladas de los pacientes diabéticos. La mayor velocidad observada se relacionaba, de acuerdo a los autores, con la mayor glicación de las LP ya que la concentración de TG en las LP aceptoras y de CE en las HDL dadoras eran semejantes en los pacientes diabéticos y en los controles no diabéticos del estudio. Obtuvieron datos similares para HDL glicadas *in vitro*. Además, demostraron que la velocidad de transferencia estaba afectada por la glicación del componente proteico pero no del componente lipídico de las HDL dadoras.

Resumiendo, varios ensayos *in vitro* han mostrado que la glicación altera el comportamiento de las HDL y puede afectar distintos pasos del transporte reverso del Col. Aunque queda por demostrar su relevancia *in vivo*, los resultados sugieren que los efectos producidos sumados podrían favorecer la vía aterogénica.

VLDL

Las VLDL son aclaradas del plasma por la lipoproteína lipasa (LPL) de tejidos extrahepáticos, teniendo la de tejido adiposo una participación importante en el período post prandial. La LPL hidroliza gran parte de los TG de las VLDL y éstas se convierten en IDL, también llamadas remanentes de VLDL (Fig. 3). La glicación *in vitro* de las VLDL disminuye su aclaramiento plasmático. Este efecto se relaciona con una reducción de su afinidad por la LPL con interferencia en la hidrólisis de los TG transportados y aumento del tiempo de permanencia en el plasma⁶⁶. La disminución de la afinidad de la LPL es proporcional al aumento del nivel de glicación. El agregado de glutatión reducido (que interfiere en la glicación proteica) anula el efecto observado mientras que el agregado de lisina (que aumenta la glicación proteica) lo favorece⁶⁷.

La glicación de la apoE, componente apoproteico funcionalmente importante en el catabolismo de los remanentes de VLDL, fue estudiada recientemente *in vivo* e *in vitro*. La apoE sirve como ligando de receptores tales como el REC B/E y el LRP (*LDL-receptor-related-protein*). Por otro lado, su unión a heparan sulfato proteoglucanos (HSPG) es un paso crítico para la degradación de los remanentes de VLDL⁶⁸. Shuvaev y col.⁶⁹ demostraron que la apoE de VLDL de pacientes diabéticos está 2-3 veces más glicada que la de individuos normales. Además, la glicación *in vitro* de la apoE (pero no la glicoxidación) disminuye significativamente su capacidad de unirse a la heparina, sugiriendo que *in vivo* existiría el mismo tipo de impedimento para su unión a los HSPG. Identificaron a la lisina 75 como el principal sitio de glicación y demostraron que la isoforma apoE₂ (asociada con la hiperlipemia tipo III) es la más sensible a la glicación. Los autores proponen que la glicación de la apoE, al alterar las interacciones lipoproteicas con las células mediadas por su unión a HSPG, podría contribuir a las anomalías lipídicas de los pacientes diabéticos con pobre control glucémico. En particular, teniendo en cuenta que los individuos homocigotas con respecto a la apoE₂ pueden desarrollar hiperlipemia tipo III si tienen factores de riesgo adicionales como obesidad y diabetes, la mayor susceptibilidad de la apoE₂ a la glicación podría ser en parte responsable de este tipo de hiperlipemia.

En suma, el efecto de la glicación se agregaría a otras causas que pueden disminuir el catabolismo de las VLDL y sus remanentes, contribuyendo al aumento de las concentraciones de VLDL y TG en el plasma en ayunas y a la hiperlipemia post prandial, que son aspectos característicos de la dislipemia diabética. Además, la prolongación de su vida media plasmática permitiría una mayor exposición de estas LP a la CETP, facilitando la transferencia de CE proveniente de las HDL a cambio de TG, haciéndolas aun más aterogénicas.

Conclusiones

La hiperglucemia crónica produce una acumulación de productos de glicación reversibles y PGA en diferentes proteínas estructurales y circulantes del organismo generando simultáneamente un estrés oxidativo y carbonílico, proceso denominado glicoxidación. Las LP no resultan una excepción a ello y su modificación ha sido documentada y confirmada en forma extensiva como hemos expuesto. En cambio, la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos para explicar su incidencia en la aparición y desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes resulta todavía motivo de debate. Estas complicaciones, una vez establecidas, son de difícil control y su progresión es muchas veces inevitable por las

características de irreversibilidad de los procesos de glicoxidación.

Implementar tratamientos adecuados para lograr en el paciente diabético promedios glucémicos diarios lo más cercanos posibles a los de individuos normales para disminuir el estrés glicoxidativo debe ser por lo tanto el objetivo principal en el cuidado de dichos pacientes.

Por otra parte el adelanto en la comprensión del rol de la glicoxidación de las LP en el desarrollo del daño vascular permitirá diseñar en el futuro nuevas estrategias terapéuticas para prevenirlo.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Sra. Elma E.P.A. de Gagliardino por la realización de las figuras que ilustran el texto.

Bibliografía

- Pyörälä K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and arteriosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3: 463-524.
- Laakso M, Lehto S. Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Rev* 1997; 5: 294-315.
- Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994; 344: 793-5.
- Taskinen MR. Quantitative and qualitative lipoprotein abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes* 1992; 41 (suppl 2): 12-7.
- Hanefeld M, Kurkchiv T. Plasma lipids in diabetics. En: Schwartz CJ, Born GVR (eds). *New horizons in diabetes mellitus and cardiovascular disease*. London: Current Science, 1995; p 89-95.
- Lopes-Virella MF, Klein RL, Virella G. Modification of lipoproteins in diabetes. *Diabetes Metab Rev* 1996; 12: 69-90.
- Lyons TJ. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Diabetes* 1992; 41 (suppl 2): 67-73.
- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-12.
- The DCCT research group: the effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus: The Diabetes Control and Complications Trial. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
- Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation: role in the pathogenesis of diabetic complications. *Clin Chem* 1986; 32 (N° 10-B): B37-B41.
- Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes care* 1992; 15: 1835-42.
- Bucala R. Lipid and lipoprotein advanced glycosylation in diabetic cardiovascular disease. En: Schwartz CJ, Born GVR (eds). *New horizons in diabetes mellitus and cardiovascular disease*. London: Current Science, 1995; p 103-10.
- Hunt JV, Smith ChCT, Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990; 39: 1420-4.
- Lyons TJ, Jenkins AJ. Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. *Diabetes Rev* 1997; 5: 365-91.
- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
- Palinski W, Witztum JL. Oxidative stress and diabetes mellitus. En: Schwartz CJ, Born GVR (eds). *New horizons in diabetes mellitus and cardiovascular disease*. London: Current Science, 1995, p 111-23.
- Schleicher E, Deufel T, Wieland OH. Non-enzymatic glycosylation of human serum lipoproteins. *FEBS Lett* 1981; 129: 1-4.
- Curtiss KL, Witztum JL. Plasma apolipoproteins A_I, A_{II}, B, C, and E are glucosylated in hyperglycemic diabetic subjects. *Diabetes* 1985; 34: 452-61.
- Kim HJ, Kurup IV. Nonenzymatic glycosylation of human plasma LDL; evidence for in vitro and in vivo glycosylation. *Metabolism* 1982; 31: 348-53.
- Lyons TJ, Patrick JS, Baynes JW, Colwell JA, Lopes-Virella MF. Glycosylation of LDL in patients with type I diabetes: correlations with other parameters of glycaemic control. *Diabetologia* 1986; 29: 685-9.
- Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6434-8.
- Passarelli M, Catanozi S, Nakandakare ER, et al. Plasma lipoproteins from patients with poorly controlled diabetes mellitus and in vitro glycation of lipoproteins enhance the transfer rate of cholesteryl ester from HDL to apo-B-containing lipoproteins. *Diabetologia* 1997; 40: 1085-93.
- Bucala R, Makita Z, Vega G, et al. Modification of LDL by advanced glycation endproducts contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9441-5.
- Klein RL, Laimins M, Lopes-Virella MF. Isolation, characterization and metabolism of the glycosylated and nonglycosylated subfractions of LDL isolated from type I diabetic patients and nondiabetic subjects. *Diabetes* 1995; 44: 1093-8.
- Sobenin IA, Tertov VV, Orekhov AN. Atherogenic modified LDL in diabetes. *Diabetes* 1996; 45 (suppl 3): S35-S39.
- Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990; 82: 495-506.
- Haffner SM. LDL size in patients with NIDDM and the insulin resistance syndrome. En: Schwartz CJ, Born GVR (eds). *New horizons in diabetes mellitus and cardiovascular disease*. London: Current Science, 1995, p 96-102.
- Sasaki J, Cottam GL. Glycation of LDL decreases its ability to interact with high-affinity receptors of human fibroblasts in vitro and decreases its clearance from rabbit plasma in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1982; 713: 199-207.
- Gonen B, Baenziger J, Schonfeld G, Jacobsen D, Farrar P. Non-enzymatic glycation of LDL in vitro. *Diabetes* 1981; 30: 875-8.
- Witztum JL, Mahoney EM, Branks MJ, Fisher M, Elam R, Steinberg D. Nonenzymatic glycosylation of LDL alters its biologic activity. *Diabetes* 1982; 31: 283-91.
- Steinbrecher UP, Witztum JL. Glycosylation of LDL to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes* 1984; 33: 130-4.
- Bucala R, Mitchell R, Arnold K, Innerarity Th, Vlassara H, Cerami A. Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the LDL receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 10828-32.
- Wang X, Bucala R, Milne R. Epitopes close to the apolipoprotein B LDL receptor-binding site are modified by advanced glycation end products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7643-7.
- Stitt AW, Bucala R, Vlassara H. Atherogenesis and advanced glycation: promotion, progression, and prevention. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 811: 115-29.

35. Lopes-Virella MF, Klein RL, Lyons TJ, Stevenson HC, Witztum JL. Glycosylation of LDL enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages. *Diabetes* 1988; 37: 550-7.
36. Lyons TJ, Klein RL, Baynes JW, Stevenson HC, Lopes-Virella MF. Stimulation of cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages by LDL from type I (insulin-dependent) diabetic patients: the influence of non-enzymatic glycation of LDL. *Diabetologia* 1987; 30: 916-23.
37. Dobrian A, Simionescu M. Irreversibly glycosylated albumin alters the physico-chemical characteristics of LDL of normal and diabetic subjects. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1270: 26-35.
38. Dobrian A, Lazar V, Tirziu D, Simionescu M. Increased macrophage uptake of irreversibly glycosylated albumin modified-LDL of normal and diabetic subjects is mediated by non-saturable mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1317: 5-14.
39. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap LDL. *Diabetes* 1985; 34: 938-41.
40. Edwards IJ, Wagner JD, Litwak KN, Cefalu WT, Rudel LL. Diabetes-induced modification of plasma LDL leads to increased interaction with arterial proteoglycans. *Diabetes* 1997; 46: 45 A.
41. Nakamura Y, Horii Y, Nishino T, et al. Immunohistochemical localization of advanced glycosylation endproducts in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *Am J Pathol* 1993; 143: 1649-56.
42. Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 135-43.
43. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 932-9.
44. Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation endproduct, N^ε-(carboxymethyl) lysine (CML), is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* 1996; 271: 9982-6.
45. Requena JR, Ahmed MU, Fountain CW, et al. Carboxymethylethanolamine: a biomarker of phospholipid modification during the Maillard reaction in vivo. *J Biol Chem* 1997; 272: 17473-9.
46. Kobayashi K, Watanabe J, Umeda F, Nawata H. Glycation accelerates the oxidation of LDL by copper ions. *Endocr J* 1995; 42: 461-5.
47. Sakurai T, Kimura S, Nakano M, Kimura H. Oxidative modifications of glycosylated LDL in the presence of iron. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177: 433-9.
48. Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A. Reduced plasma peroxyl radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 1994; 43: 1010-4.
49. Jenkins AJ, Klein RL, Chassereau ChN, Hermayer KL, Lopes-Virella MF. LDL from patients with well-controlled IDDM is not more susceptible to in vitro oxidation. *Diabetes* 1996; 45: 762-7.
50. Bellomo G, Maggi E, Poli M, Agosta FG, Bollati P, Finardi G. Autoantibodies against oxidatively modified LDL in NIDDM. *Diabetes* 1995; 44: 60-6.
51. Brownlee M, Pongor S, Cerami A. Covalent attachment of soluble proteins by non-enzymatically glycosylated collagen: role in the in situ formation of immune complexes. *J Exp Med* 1983; 158: 1739-44.
52. Lopes-Virella MF, Virella G. Cytokines, modified lipoproteins, and arteriosclerosis in diabetes. *Diabetes* 1996; 45 (suppl 3): S40-S44.
53. Lopes-Virella MF, Mironova M, Virella G. LDL-containing immune complexes and atherosclerosis in diabetes. *Diabetes Rev* 1997; 5: 410-24.
54. Kobayashi K, Watanabe J, Umeda F, et al. Metabolism of oxidized glycosylated LDL in cultured bovine aortic endothelial cells. *Horm Metab Res* 1995; 27: 356-62.
55. Bagdade JD. HDL and reverse cholesterol transport in diabetes. *Diabetes Rev* 1997; 5: 392-409.
56. Witztum JL, Fisher M, Pietro T, Steinbrecher UP, Elam RL. Nonenzymatic glucosylation of HDL accelerates its catabolism in guinea pigs. *Diabetes* 1982; 31: 1029-32.
57. Calvo C, Talussot C, Ponsin G, Berthezene F. Non enzymatic glycation of apolipoprotein A₁. Effects on its self-association and lipid binding properties. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153: 1060-7.
58. Calvo C, Verdugo C. Association in vivo of glycosylated apolipoprotein A₁ with HDL. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 3-5.
59. Oram JF, Mendez AJ, Slotte JP, Johnson TF. HDL apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol-loaded fibroblasts. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 403-14.
60. Duell PB, Oram JF, Bierman EL. Nonenzymatic glycosylation of HDL and impaired HDL-receptor-mediated cholesterol efflux. *Diabetes* 1991; 40: 377-84.
61. Rashduni DL, Rifici VA, Schneider SH, Khachadurian AK. Glycation of HDL does not increase its susceptibility to oxidation or diminish its cholesterol efflux capacity. *Metabolism* 1999; 48: 139-43.
62. Fievet C, Theret N, Shojaee N, et al. Apolipoprotein A₁-containing particles and reverse cholesterol transport in IDDM. *Diabetes* 1992; 41 (suppl 2): 81-5.
63. Fournier N, Myara I, Atger V, Moatti N. Reactivity of lecithin-cholesterol acyl transferase (LCAT) towards glycosylated-HDL. *Clin Chim Acta* 1995; 234: 47-61.
64. Calvo C, Ulloa N, Del Pozo R, Verdugo C. Decreased activation of lecithin-cholesterol acyl transferase by glycosylated apolipoprotein A₁. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31: 217-20.
65. Swenson ThL. The role of the cholesteryl ester transfer protein in lipoprotein metabolism. *Diabetes Metab Rev* 1991; 7: 139-53.
66. Mamo JC, Szeto L, Steiner G. Glycation of VLDL from rat plasma impairs its catabolism. *Diabetologia* 1990; 33: 339-45.
67. Saheki S, Shishino K, Hitsumoto Y, Murase M, Takeuchi N, Uchida K. Decreased susceptibility of glycosylated VLDL to lipoprotein lipase in vitro and prevention by glutathione. *J Atheroscler Thromb* 1994; 1: 8-14.
68. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999; 40: 1-16.
69. Shuvaev VV, Fujii J, Kawasaki Y, et al. Glycation of apolipoprotein E impairs its binding to heparin: identification of the major glycation site. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1454: 296-308.