

Factores aterogénicos en adolescentes con diabetes mellitus insulino dependiente

P. Otero, E. Herrera, B. Bonet

Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas, Universidad San Pablo-CEU.

Correspondencia: Dr. B. Bonet, Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas, Urbanización Monte Príncipe, Ctra. de Boadilla, Km 5,300, 28668 Boadilla del Monte (Madrid)

Aceptado: Junio 1997

RESUMEN: La arteriosclerosis y las enfermedades cardiovasculares (ECV) secundarias a la misma constituyen la principal causa de mortalidad en los individuos diabéticos, apareciendo ésta a una edad mucho más temprana que en la población no diabética.

Objetivos: estudiar en adolescentes con diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) la presencia de factores de riesgo para el desarrollo de ECV, incluyendo: perfil de lipoproteínas, susceptibilidad de las LDL a oxidarse y niveles de vitaminas A y E.

Métodos: Se estudiaron adolescentes con DMID (15 varones y 19 mujeres) y controles no diabéticos (15 varones y 17 mujeres). Los valores de colesterol y triglicéridos en plasma y HDL fueron valorados utilizando métodos enzimáticos. El colesterol en LDL fue calculado utilizando la fórmula de Friedewald. La susceptibilidad de las LDL a oxidarse fue determinada siguiendo la formación de dienos conjugados en LDL incubadas en Cl_2Cu (2 mM). Las vitaminas A y E fueron valoradas utilizando un método de HPLC.

Resultados y conclusiones: Los adolescentes con DMID presentaron unos niveles de colesterol y triglicéridos en plasma y de colesterol en LDL y HDL similares a los observados en controles de su mismo sexo. La susceptibilidad de sus LDL a oxidarse fue prácticamente la misma que en individuos controles. Adolescentes con DMID presentaron unos niveles plasmáticos de vitaminas A y E inferiores a los observados en controles de su mismo sexo. Estos menores niveles de vitaminas antioxidantes podrían estar relacionados con el elevado riesgo de desarrollar ECV observada en los individuos con DMID.

PALABRAS CLAVE: Diabetes mellitus insulino dependiente; Arteriosclerosis; Vitaminas A y E; Adolescentes.

ABSTRACT: Cardiovascular diseases (CVD) secondary to atherosclerosis are the leading cause of death among subjects with insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). They also develop these diseases at an earlier age than the non diabetic subjects.

Objectives: to determine risk factors involved in the development of atherosclerotic diseases, in adolescents with IDDM, including: lipoprotein profile, LDL susceptibility to oxidation and plasma levels of vitamin A and E.

Methods: Adolescents with IDDM (15 males and 19 females) and non diabetic controls (15 males and 17 females) were studied. Plasma cholesterol, triglycerides and HDL cholesterol were determined using commercially available enzymatic assays. LDL cholesterol was calculated following the Friedewald's formula. LDL susceptibility to oxidation was determined following the formation of conjugated dienes in LDL submitted to oxidation with CuCl_2 . Vitamin A and E in plasma were determined by HPLC.

Results and conclusions: Adolescents with IDDM had plasma cholesterol and triglycerides levels and HDL and LDL cholesterol similar to the values found in control subjects of the same sex. Besides, no differences were found between IDDM and control subjects in the lag phase and the slope in the formation of conjugated dienes in LDL submitted to oxidation. In contrast, plasma concentration of vitamin A and E were lower in subjects with IDDM than in controls. The lower levels of vitamin A and E found in IDDM subjects may play a role in the high risk for developing CVD observed in them.

KEY WORDS: Insulin dependent diabetes mellitus; Atherosclerosis; Vitamin A and E; Adolescents.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) secundarias a la arteriosclerosis constituyen la principal causa de mortalidad en individuos con diabetes mellitus insulino dependiente (DMID)⁽¹⁻³⁾. De hecho, a los 50 años,

cerca de un 35% de estos individuos fallecen como consecuencia de dichas enfermedades^(1,3).

La oxidación de LDL parece desempeñar un papel fundamental en el proceso arteriosclerótico⁽⁴⁻⁷⁾. Numerosos estudios experimentales han puesto de manifiesto que la oxidación de

LDL puede desencadenar la mayor parte de los fenómenos que parecen tener lugar en la formación de la placa de ateroma, incluyendo el acúmulo de colesterol, citotoxicidad, retención de monocitos, liberación de factores inflamatorios...⁽⁴⁻⁷⁾. Estudios epidemiológicos han asociado un mayor consumo de antioxidantes, tales como vitaminas A, E y C, con un menor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares⁽⁸⁻¹¹⁾. Recientemente, un estudio prospectivo ha demostrado que la administración de vitamina E disminuye la tasa de mortalidad en individuos con enfermedades cardiovasculares secundarias a la arteriosclerosis⁽¹²⁾.

En individuos adultos con DMID se han observado diferentes alteraciones que podrían dar lugar a un aumento en el estrés oxidativo y, por lo tanto, a una mayor oxidación de sus lipoproteínas. Así, se han observado bajos niveles plasmáticos de antioxidantes^(13,14), alta concentración de peróxidos de lípidos⁽¹⁵⁾ y una elevada susceptibilidad de sus lipoproteínas a oxidarse^(13,16). Resultados similares se han observado en animales experimentales⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Sin embargo, prácticamente no existen datos sobre la presencia de estos cambios en las primeras décadas de vida en individuos con DMID, a pesar de la enorme trascendencia que podría tener la detección precoz de factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en jóvenes diabéticos, lo cual nos permitiría desarrollar formas de intervención para prevenirlas.

El objetivo del presente estudio fue determinar en adolescentes con DMID diferentes parámetros relacionados con el estrés oxidativo, asociados con un mayor riesgo de desarrollar ECV.

MÉTODOS

Sujetos estudiados

Los individuos diabéticos estudiados procedían de la consulta de Endocrinología del Hospital del Niño Jesús. Ninguno de los sujetos estudiados presentaba complicaciones secundarias a la diabetes en el momento de realizar el estudio. Todos tenían un desarrollo puberal superior al estadio III de Tanner en el momento de llevar a cabo el estudio. La muestra de sangre se obtuvo en una de las extracciones realizadas periódicamente para la determinación de hemoglobina glicosilada, las cuales en ese hospital se llevan a cabo trimestralmente. El grupo control estaba constituido por voluntarios, estudiantes universitarios sanos. En todos los grupos la sangre se extrajo por la mañana tras 10-12 horas de ayuno, y se recogió en EDTA (1 mg/mL de sangre).

Aislamiento de las lipoproteínas

Las LDL fueron aisladas a partir de plasma procedente de sangre recogida en EDTA (1 mg/mL), mediante ultracentrifugación con un rotor vertical (NVT65, Beckman, Madrid, España) a 50.000 rpm, durante 1 hora, según el método descrito por Chung y cols.⁽²⁰⁾. La determinación de la susceptibilidad de las LDL a oxidarse se realizó el mismo día de su extracción.

Determinación de la susceptibilidad de las LDL a oxidarse

La formación de dienos conjugados

se llevó a cabo según el método descrito por Esterbauer y cols.⁽²¹⁾. Brevemente, tras el aislamiento de las LDL, éstas fueron filtradas a través de una columna de Sephacryl-400 (Farmacia LKB, Biotechnology Inc., Madrid, España) para eliminar el EDTA. Tras la determinación de la concentración de proteínas, según el método de Lowry⁽²²⁾, se tomaron alícuotas de 0,1 mg de proteína de LDL/mL, disueltas en tampón fosfato pH: 7,4 (PBS), y tras añadir CuCl_2 (2 μM) se transfirieron a una cubeta de cuarzo, iniciándose la incubación a 37°C. Se leyó la absorbancia a 234 nm cada 10 minutos durante 8 horas o hasta que la fase de formación de dienos conjugados alcanzase una meseta. La duración de la fase latente se calculó en función del tiempo transcurrido desde la adición del CuCl_2 y el momento en que se inicia la propagación de la formación de alenos conjugados. Este momento se estima gráficamente en la intersección con el eje de abscisas de una línea vertical trazada a partir del punto de unión entre una recta que sigue la primera fase de lecturas, que comprende el período de formación lenta de los dienos conjugados y otra trazada a partir de la fase de aumento rápido de los mismos.

La concentración en plasma de colesterol total, triglicéridos y HDL se determinaron utilizando Kits comerciales (Triglycerides Enzymatic Trinder Method, Menarini Diagnostics, Florence, Italy, Cholesterol H.F. Enzymatic Trinder Method, Menarini Diagnostics and HDL-Cholesterol/Cholesterol, Boehringer, Mannheim, Germany, respectivamente). El colesterol en LDL se calculó siguiendo la fórmula de Friedewald.

Las vitaminas E y A en plasma se

TABLA I CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS ESTUDIADOS

Nº individuos estudiados	Diabéticos		Controles	
	Varones (15)	Mujeres (19)	Varones (15)	Mujeres (17)
Edad	14,88 ± 0,52	13,20 ± 0,43	19,93 ± 0,41	19,82 ± 0,21
Tiempo de evolución de la diabetes	2,5 ± 0,64	2,76 ± 0,36	-	-
Fructosamina (µM/L)	404,6 ± 20,9	368,7 ± 17,2	-	-
HbA1c (%)	8,72 ± 0,4	8,44 ± 0,4	-	-

TABLA II NIVELES EN PLASMA DE TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL TOTAL EN LDL Y HDL (MG/DL)

Nº individuos estudiados	Diabéticos		Controles	
	Varones (15)	Mujeres (19)	Varones (15)	Mujeres (17)
Triglicéridos plasmáticos	55,39 ± 4,32	61,60 ± 4,36	70,56 ± 7,66	57,83 ± 4,18
Colesterol plasmático	172,11 ± 6,40	186,76 ± 7,67	172,47 ± 7,72	195,80 ± 7,33
LDL-C	108,73 ± 5,33	118,38 ± 6,61	113,04 ± 6,43	126,28 ± 7,09
HDL-C	47,85 ± 2,78	56,07 ± 2,95	45,32 ± 2,81	57,95 ± 3,32*

Varones vs mujeres (:p < 0,05).

determinaron mediante HPLC siguiendo métodos previamente descritos en nuestro laboratorio^(23,24). La hemoglobina glicosilada (HbA1c) se valoró mediante HPLC, con un coeficiente de variación interensayo de 1-1,5% y los resultados se expresan como porcentaje de la hemoglobina total. La fructosamina se valoró utilizando un kit comercial (Fructosamine, Hoffmann-La Roche AG, Basilea, Suiza).

Análisis estadístico

Se presenta la media ± error estándar de los diferentes grupos experimentales. La significatividad de las diferencias entre los distintos grupos se determinó mediante el análisis de la varianza y el test de Tuckey, utilizan-

do el programa Systat (Systat Inc. Evanston, Ill., USA).

RESULTADOS

Los sujetos diabéticos eran más jóvenes que los controles, y no se observaron diferencias entre varones y mujeres en la edad ni en el tiempo de evolución de la diabetes (Tabla I). Los niveles de HbA1c y fructosamina, sólo fueron determinados en sujetos con DMID, no observándose diferencias entre individuos de sexo diferente (Tabla I). Como cabría esperar, los valores fueron superiores a los considerados normales en individuos no diabéticos (4-6% en el caso de la HbA1c y 185-271 µM/L en el de fructosamina).

Perfil lipoproteico. Los niveles de colesterol total, triglicéridos y de colesterol en las diferentes fracciones de lipoproteínas fueron similares en los individuos diabéticos y en los controles del mismo sexo (Tabla II). Como era de esperar, en los controles, el colesterol en HDL era significativamente más bajo en los varones que en las mujeres (Tabla II). En el grupo de diabéticos, aunque la tendencia era similar, estas diferencias entre los dos sexos no alcanzaron valores estadísticamente significativos (Tabla II).

Los niveles plasmáticos de vitaminas A y E en individuos con DMID fueron inferiores a los hallados en controles de su mismo sexo (Fig. 1), siendo las diferencias estadísticamente significativas para la vitamina A, tanto en varones, como en mujeres y sólo para éstas en el caso de la vitamina E.

En cuanto a las cinéticas de oxidación de las LDL, no se hallaron diferencias en la fase latente ni en la pendiente de formación de dienos conjugados entre los valores hallados en LDL de individuos diabéticos y los controles (Tabla III).

DISCUSIÓN

En el presente estudio no se observaron diferencias significativas entre la susceptibilidad a oxidarse de las LDL aisladas a partir de adolescentes con DMID y las de individuos sanos de edad ligeramente superior. Este resultado contrasta con otros de la bibliografía^(13,16), en que se encontró una mayor susceptibilidad a oxidarse en las LDL aisladas de individuos diabéticos. En estos estudios se seleccionaron suje-

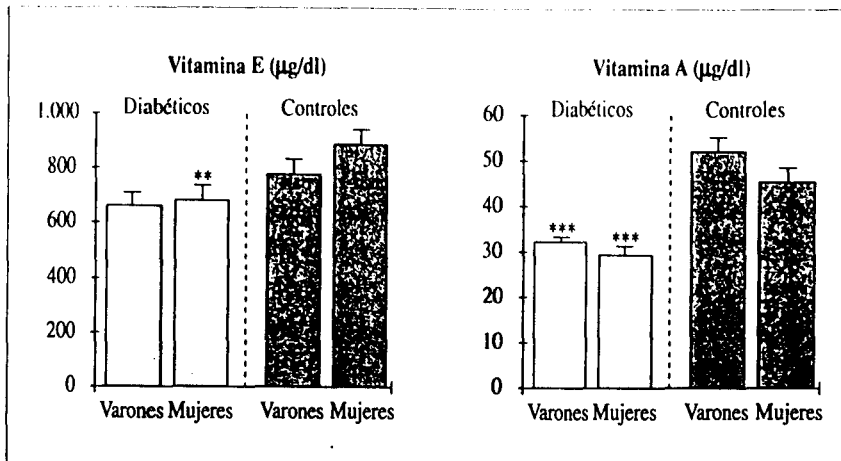


Figura 1. Concentraciones plasmáticas de vitaminas A y E en los diferentes grupos experimentales. Las vitaminas A y E fueron determinadas mediante HPLC según se ha descrito en la sección de métodos. *: individuos con DMID vs controles. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

TABLA III FASE LATENTE Y PENDIENTE EN LA FORMACIÓN DE DIENOS CONJUGADOS EN LDL OXIDASA «IN VITRO»

Nº individuos estudiados	Diabéticos		Controles	
	Varones (14)	Mujeres (15)	Varones (13)	Mujeres (13)
Fase				
Latente (min)	129,0 ± 13,8	108,7 ± 10,4	115,7 ± 12,6	113,6 ± 12,9
Pendiente	163,1 ± 12,7	200,3 ± 13,0	182,0 ± 25,4	172,3 ± 13,5

La oxidación de LDL fue iniciada mediante la adición de CuCl_2 en el medio, según se ha descrito en la sección de métodos. Se determinó la fase latente relacionada con la susceptibilidad de las LDL a oxidarse y la pendiente (Índice de la velocidad de propagación de la oxidación de las LDL).

tos adultos, con varios años de evolución de la diabetes y un mal control metabólico, con niveles de HbA1c muy superiores a los de los adolescentes del presente estudio^(13,16). Estas diferencias en la edad y el grado de control metabólico, podrían explicar la discrepancia con los resultados del presente estudio.

Los niveles plasmáticos de vitamina A en individuos con DMID fueron claramente inferiores a los hallados en controles, lo cual concuerda con lo observado por otros autores en situa-

ciones similares^(25,26) o en el animal experimental diabético⁽²⁷⁾. Las razones de esta menor concentración plasmática de vitamina A es desconocida, pero posiblemente esté relacionada con los menores niveles de proteína transportadora de retinol observada en sujetos con DMID⁽²⁵⁾. Los efectos de estos bajos niveles de vitamina A que presentan los individuos diabéticos son desconocidos en la actualidad, si bien no alcanzan valores que se consideran indicativos de déficit de vitamina A⁽²⁸⁾.

Asimismo, los niveles plasmáticos

de vitamina E, otro potente antioxidante, también aparecen disminuidos en individuos con DMID. Nuevamente, ello podría suponer un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares en estos sujetos, ya que se sabe que unos bajos niveles de vitamina E están asociados con un mayor riesgo de desarrollar ECV⁽⁸⁻¹¹⁾. Esto posiblemente es debido a que la vitamina E constituye el principal y más eficaz antioxidante de lípidos que existe en el organismo⁽²⁹⁻³¹⁾, por lo que su menor concentración debe disminuir la resistencia a la oxidación de lípidos, entre ellos los de LDL. Esta interpretación contrasta con la normal susceptibilidad a la oxidación que hemos encontrado «in vitro» en las LDL de los sujetos diabéticos, pero los menores niveles de vitamina E apuntan a que dicha susceptibilidad «in vivo» podría estar disminuida. De todas formas la falta de respuesta de las LDL «in vitro» sugiere que el grado de estrés oxidativo que puedan tener estos sujetos diabéticos es relativamente bajo, de acuerdo a su aceptable control metabólico y corto tiempo de evolución. Es curioso destacar aquí que la menor concentración de vitaminas antioxidantes en los sujetos estudiados es especialmente manifiesta en las mujeres y no en los varones. Aunque desconocemos la causa de esta diferencia entre sexos, podría relacionarse con el elevado riesgo de padecer ECV observada en las mujeres diabéticas^(1-3,32).

Como era de esperar, el perfil lipoprotéico de los sujetos con DMID fue similar al hallado en controles de su mismo sexo. Estos resultados están de acuerdo con diversos estudios clínicos, donde no se han observado diferencias

entre sujetos con DMID y controles en la concentración de colesterol total y en el de las diferentes fracciones de lipoproteínas^(33,34). De hecho, su mayor riesgo de padecer ECV parece estar basado más en su mayor grado de estrés oxidativo^(35,36) que en una alteración de su perfil lipoproteico.

En resumen, en el presente trabajo hemos puesto de manifiesto en individuos jóvenes con DMID, una disminución en la concentración plasmática de vitaminas A y E, que podría estar relacionada con el mayor riesgo de desarrollar ECV. Estos resultados junto con los hallados por otros autores sugieren la necesidad de desarrollar estudios clínicos, donde se determine la incidencia de ECV en individuos diabéticos tratados con antioxidantes.

AGRADECIMIENTOS

Queremos mostrar nuestro agradecimiento a la sección de Endocrinología y al servicio de Bioquímica del Hospital del Niño Jesús. También queremos mostrar nuestro especial agradecimiento a la Sra. Alicia Blázquez por su colaboración en la obtención de las muestras. Este estudio ha sido financiado con fondos del FIS (94-0398).

BIBLIOGRAFÍA

- Krolewski AS, Kosinski EJ, Warram JH, Leland S, Busick EJ, Asmal AC, Rand LI, Christlieb AR, Bradley RF, Khan CR. Magnitud and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-independent diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 1987; **59**: 750-755.
- García MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannell WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. *Diabetes* 1974; **23**: 105-111.
- Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR. Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* 1987; **317**: 1390-1398.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond Cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; **320**: 915-924.
- Steinbrecher UP, Zhang H, Loughheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radical Biol Med* 1990; **9**: 155-168.
- Rosenfeld ME, Khoo JC, Miller E, Parthasarathy S, Palinski W, Witztum JL. Macrophage-derived Foam cells Freshly Isolated from Rabbit Atherosclerotic Lesions Degrade Modified Lipoproteins, Promote Oxidation of Low Density Lipoproteins, and Contain Oxidation-specific Lipid-Protein Adducts. *J Clin Invest* 1991; **87**: 90-97.
- Trevor-Malden L, Chait A, Raines EW, Ross R. The Influence of Oxidatively Modified Low Density Lipoproteins on Expression of Platelet-derived Growth Factor by Human Monocyte-derived Macrophages. *J Biol Chem* 1991; **266**: 13901-13908.
- Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991; **53**: 326S-334S.
- Riemersma RA, Wood DA, Macintyre CCA, Elton RA, Gey KF, Oliver M. F. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E and carotene. *Lancet* 1991; **337**: 1-5.
- Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the Risk of Coronary Disease in Women. *N Engl J Med* 1993; **328**: 1444.
- Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Golditz GA, Willett WC. Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Heart Disease in Men. *N Engl J Med* 1993; **328**: 1450.
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ, Brown MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; **347**: 781-786.
- Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A. Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 1994; **43**: 1010-1014.
- Cunningham JJ, Ellis SL, McVeigh KL, Levine RE, Calles-Escandon J. Reduced mononuclear leukocyte ascorbic acid content in adults with insulin-dependent diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. *Metabolism* 1991; **40**: 146-149.
- Sato y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K. Lipid peroxide levels in plasma of diabetic patients. *Chem Med* 1979; **21**: 104-107.
- Bonet B, Knopp RH. Accelerated LDL oxidation in diabetic gestation. 2nd Internat Graz Symp on Gestational Diabetes 1992 (Abstract).
- Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism* 1990; **39**: 971-975.
- Morel DW, Chisolm GM. Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J Lipid Res* 1989; **30**: 1827-1834.
- Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Reduced vitamin E and increased lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. *Diabetes* 1991; **40**: 1241-1244.
- Chung BH, Segrest JP, Ray MJ, Brunzell JD, Hokanson JE, Kraus, RM, Beaudrie K, Cone JT. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. *Methods in Enzymology* 1986; **128**: 181-209.

21. Esterbauer H, Strieg G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comm* 1989; **6**: 67-75.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265-275.
23. Viana M, Barbas C, Bonet B, Bonet MV, Castro M, Fraile MV, Herrera E. In vitro effects of a flavonoid-rich extract on LDL oxidation. *Atherosclerosis* 1996; **123**: 83-91.
24. Cuesta D, Castro M. Simultaneous measurement of retinol and alfa-tocopherol in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography* 1986; **380**: 145-149.
25. Basu TK, Tze WJ, Leichter J. Serum vitamin A and retinol-binding protein in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 1989; **50**: 329-331.
26. Krempe M, Ranganathan S, Ritz P, Morin M, Charbonnel B. Plasma vitamin A and E in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (Noninsulin-dependent) adult diabetic patients. *Internat J vit Nutr Res* 1991; **61**: 38-42.
27. Tuitoek PJ, Ziari S, Tsin ATC, Rajotte RV, Suh M, Basu TK. Streptozotocin-induced diabetes in rats is associated with impaired metabolic availability of vitamin A (retinol). *Br J Nutr* 1996; **75**: 615-622.
28. Sommer A, West KP. *Vitamin A deficiency. Health, survival and vision*. New York: Oxford University Press. 1996.
29. Meydani M. Vitamin E. *Lancet* 1995; **345**: 170-175.
30. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G and Waeg G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr* 1991; **53**: 314S-321S.
31. Burton GW and Traber MG. Vitamin E: Antioxidant Activity, Biokinetics, and Bioavailability. *Annu Rev Nutr* 1990; **10**: 357-382.
32. Barret-Connor EL, Cohn BA, Wingard DL, Edelman SL. Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo Study. *JAMA* 1991; **265**: 627-631.
33. The DCCT Research Group. Lipid and lipoprotein levels in patients with IDDM. *Diabetes Care* 1992; **15**: 886-894.
34. Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res* 1987; **28**: 613-628.
35. Baynes JW. Perspectives in diabetes. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; **40**: 405-412.
36. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; **19**: 257-267.