



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis doctoral

Departament de Medicina

Caracterización de la diabetes autoinmune latente del adulto en dos centros hospitalarios de Cataluña

Marta Hernández García

Diego Marino Puente
Director

Manuel Luis Puig Domingo
Tutor

ABREVIACIONES

AGEs	Productos de glucosilación avanzada
AI	Anticuerpos anti-insulina
cHDL	Colesterol HDL
CTLA4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
DASP	Programa de estandarización de anticuerpos de la diabetes
FTO	Gen asociado con la masa grasa y obesidad
GAD65-alum	GAD65 recombinante formulado con hidróxido de aluminio
GADA	Anticuerpos anti-decarboxilasa del ácido glutámico 65
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
HbA_{1c}	Hemoglobina glucosilada
HLA-DQB1	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II DQ beta1
HNF1A	Factor de transcripción 1 alfa del hepatocito (HNF1A)
IA-2A	Anticuerpos anti-tirosina fosfatasa
IL-1b	Interleucina 1 beta
IL-1RA	Antagonista del receptor de interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
ICA	Anticuerpos anti-citoplasma de las células del islote
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment – insulin resistance</i>
HUNT	<i>The Nord-Trøndelag Health Study</i>
INS	Gen de la insulina
LADA	Diabetes autoinmune latente del adulto
LCN2	Lipocalina 2
NCEP ATPIII	<i>National Cholesterol Education Program. Adult Treatment Panel III</i>
NIRAD	<i>Non-Insulin Requiring Autoimmune Diabetes</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR-us	Proteína C reactiva ultrasensible
PTPN22	Proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22

SGLT2	Co-transportador de sodio-glucosa tipo 2
TCF7L2	Factor de transcripción 7 tipo 2
TNF-A	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFRsII	Receptor soluble 2 del factor de necrosis tumoral alfa
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
ZnT8A	Anticuerpos anti-transportador de zinc 5

ÍNDICE

ABREVIACIONES	1
ÍNDICE	5
RESUMEN	9
RESUM	13
<i>SUMMARY</i>	17
INTRODUCCIÓN	21
1. DEFINICIÓN DE DIABETES LADA	24
2. EPIDEMIOLOGÍA	24
3. GENÉTICA	27
3.1. GENES ASOCIADOS A LA DIABETES TIPO 1	27
3.2. GENES ASOCIADOS A LA DIABETES TIPO 2	28
4. AUTOINMUNIDAD	29
4.1. INMUNIDAD ADAPTATIVA	29
4.2. INMUNIDAD INNATA	31
5. FUNCIÓN DE LA CÉLULA BETA	32
5.1. ESTUDIOS TRANSVERSALES	32
5.2. ESTUDIOS PROSPECTIVOS	34
6. SENSIBILIDAD A LA INSULINA	35
7. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	35
7.1. FENOTIPO	36
7.2. COMPLICACIONES CRÓNICAS	38
8. TRATAMIENTO	39
8.1. INTERVENCIÓN INMUNOMODULADORA	39
8.2. INSULINA	40
8.3. HIPOGLUCEMIANTES NO INSULÍNICOS	40
8.3.1. METFORMINA	40
8.3.2. SULFONILUREAS	41

8.3.3. TIAZOLIDINEDIONAS	41
8.3.4. INHIBIDORES DE LA DIPEPTIDIL PEPTIDASA-4	41
8.3.5. ANÁLOGOS DEL PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGÓN TIPO 1 (GLP-1)	41
8.3.6. INHIBIDORES DEL COTRANSPORTADOR DE SODIO-GLUCOSA TIPO 2 (SGLT2)	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
RESULTADOS	49
ARTÍCULO 1	51
ARTÍCULO 2	61
ARTÍCULO 3	71
ARTÍCULO 4	85
DISCUSIÓN CONJUNTA	97
CONCLUSIONES	107
PERSPECTIVAS DE FUTURO	110
BIBLIOGRAFÍA	114

RESUMEN

La presente tesis doctoral describe la caracterización fenotípica de los pacientes con diabetes autoinmune latente del adulto (LADA) en Cataluña (centros de Lleida y Barcelona). Para ello, se comparó a estos pacientes con los que presentaban una diabetes tipo 1 clásica diagnosticada en la edad adulta o una diabetes tipo 2, en un total de cuatro estudios transversales diferentes.

En el primer estudio, se detectó un fenotipo clínico y metabólico en los pacientes con diabetes LADA intermedio entre los otros dos tipos de diabetes, con una frecuencia de síndrome metabólico del 37,3% en los pacientes con diabetes LADA, un 15,5% en diabetes tipo 1, y un 67,2% en diabetes tipo 2. El uso de insulina en los pacientes con diabetes LADA (45,7%) fue más frecuente que en aquellos con diabetes tipo 2 (19%), pero el control glucémico fue peor en el primer grupo.

En el segundo estudio, se comparó la secreción de insulina en los mismos tres grupos de diabetes mediante un test estandarizado de estímulo con comida líquida. Para comparar la influencia del tiempo de evolución de la diabetes sobre la secreción de péptido C, diseñamos un protocolo en el que en cada grupo de diabetes se incluían pacientes apareados por tres estratos de tiempo de evolución. La capacidad secretora de la célula beta en los pacientes con diabetes LADA resultó intermedia entre los otros dos grupos; es decir, mayor que en la diabetes tipo 1, y menor que en la diabetes tipo 2, aunque no encontramos diferencias entre los pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 2 en los primeros 18 meses de evolución de la enfermedad.

En el tercer estudio, se exploró la presencia de placas ateromatosas carotídeas en la cohorte de pacientes con diabetes LADA de Lleida, todos sin enfermedad cardiovascular previa, y se comparó con pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2 apareados por edad y sexo. Los pacientes con diabetes tipo 2 presentaban un fenotipo más desfavorable de adiposidad y perfil lipídico que los pacientes con diabetes autoinmune, y el control glucémico era similar entre los tres grupos en el momento del estudio. Encontramos una mayor frecuencia de placas carotídeas en pacientes con diabetes LADA que en la diabetes tipo 1 clásica y en la diabetes tipo 2 (73,2% versus 57,1% y 56,9%, respectivamente). La enfermedad ateromatosa carotídea afectaba además a un mayor número de territorios en los pacientes con diabetes LADA.

En el cuarto estudio, se investigó el perfil de inflamación de bajo grado entre los tres tipos de diabetes. El recuento total de leucocitos y las concentraciones del receptor soluble 2 del factor de necrosis tumoral alfa (TNFRsII) aumentaban gradualmente entre los pacientes con diabetes tipo 1, diabetes LADA y diabetes tipo 2; y la concentración de

adiponectina seguía el patrón contrario, sin encontrarse diferencias para la interleucina 6. También se halló una correlación positiva de la proteína C reactiva ultrasensible, el TNFRsII y el recuento de leucocitos con los marcadores de adiposidad, siendo la correlación inversa de los tres marcadores con la concentración de colesterol HDL. Se elaboró un modelo multivariable de regresión logística en el que los marcadores de inflamación aportaban información adicional al resto de parámetros. Cabe destacar el resultado obtenido para TNFRsII, como predictor de riesgo para diabetes LADA comparado con el riesgo para diabetes tipo 1.

Como conclusión, en Cataluña, los pacientes con diabetes LADA, respecto a los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2, presentan un fenotipo metabólico y de adiposidad, una secreción de insulina, y un perfil inflamatorio de bajo grado intermedio entre la diabetes tipo 1 clásica diagnosticada en la edad adulta y la diabetes tipo 2. Además, en estos pacientes se encuentra una mayor frecuencia de enfermedad cardiovascular preclínica.

Con estos resultados, podemos destacar la heterogeneidad clínica de la diabetes diagnosticada en la edad adulta, y, al menos en nuestro medio, una mayor afectación cardiovascular preclínica en la diabetes LADA. Por este motivo, creemos necesaria su detección precoz mediante marcadores inmunológicos (principalmente anticuerpos anti-decarboxilasa del ácido glutámico 65) en los pacientes diagnosticados de diabetes en la edad adulta.

RESUM

Aquesta tesi doctoral descriu la caracterització fenotípica dels pacients amb diabetis autoimmune latent de l'adult (LADA) a Catalunya (centres de Lleida i Barcelona). Per a això, es va comparar a aquests pacients amb els que presentaven una diabetis tipus 1 clàssica diagnosticada en l'edat adulta o una diabetis tipus 2, en un total de quatre estudis transversals diferents.

Al primer estudi vam detectar un fenotip clínic i metabòlic en els pacients amb diabetis LADA intermedi entre els altres dos tipus de diabetis, amb una freqüència de síndrome metabòlica del 37,3% en els pacients amb diabetis LADA, un 15,5% en diabetis tipus 1, i un 67,2% en diabetis tipus 2. L'ús d'insulina en els pacients amb diabetis LADA (45,7%) va ser més freqüent que en aquells amb diabetis tipus 2 (19%), però el control glucèmic va ser pitjor en el primer grup.

Al segon estudi es va comparar la secreció d'insulina en els mateixos tres grups de diabetis mitjançant un test estandarditzat d'estímul amb menjar líquid. Per comparar la influència del temps d'evolució de la diabetis sobre la secreció de pèptid C, vam dissenyar un protocol en el qual en cada grup de diabetis s'inclouien pacients aparellats per tres estrats de temps d'evolució. La capacitat secretora de la cèl·lula beta en els pacients amb diabetis LADA va resultar intermèdia entre els altres dos grups; és a dir, major que en la diabetis tipus 1, i menor que en la diabetis tipus 2, tot i que no vam trobar diferències entre els pacients amb diabetis LADA i diabetis tipus 2 en els primers 18 mesos d'evolució de la malaltia.

Al tercer estudi es va explorar la presència de plaques ateromatoses carotídies en la cohort de pacients amb diabetis LADA de Lleida, tots sense malaltia cardiovascular prèvia, i es va comparar amb pacients amb diabetis tipus 1 clàssica i diabetis tipus 2 aparellats per edat i sexe. Els pacients amb diabetis tipus 2 presentaven un fenotip més desfavorable d'adipositat i perfil lipídic que els pacients amb diabetis autoimmune, i el control glucèmic era similar entre els tres grups en el moment de l'estudi. Vam trobar una major freqüència de plaques carotídies en pacients amb diabetis LADA que en la diabetis tipus 1 clàssica i en la diabetis tipus 2 (73,2% versus 57,1% i 56,9% de, respectivament). La malaltia ateromatosa carotídia afectava a més a un major nombre de territoris en els pacients amb diabetis LADA.

Al quart estudi es va investigar el perfil d'inflamació de baix grau entre els tres tipus de diabetis. El recompte total de leucòcits i les concentracions del receptor soluble 2 del factor de necrosi tumoral alfa (TNFRsII) augmentaven gradualment entre els pacients amb diabetis tipus 1, diabetis LADA i diabetis tipus 2; i la concentració d'adiponectina

seguia el patró contrari, sense trobar-se diferències per a la interleucina 6. També es va trobar una correlació positiva de la proteïna C reactiva ultrasensible, el TNFRsII i el recompte de leucòcits amb els marcadors d'adipositat. Hi havia a més una correlació inversa dels tres marcadors amb la concentració de colesterol HDL. Es va elaborar un model multivariable de regressió logística en què els marcadors d'inflamació aportaven informació addicional a la resta de paràmetres. Cal destacar el resultat obtingut per TNFRsII, com a predictor de risc per diabetis LADA comparat amb el risc per diabetis tipus 1.

Com a conclusió, a Catalunya, els pacients amb diabetis LADA, respecte als pacients amb diabetis tipus 1 clàssica i diabetis tipus 2, presenten un fenotip metabòlic i d'adipositat, una secreció d'insulina, i un perfil inflamatori de baix grau intermedi entre la diabetis tipus 1 clàssica diagnosticada en l'edat adulta i la diabetis tipus 2. A més, en aquests pacients es troba una major freqüència de malaltia cardiovascular preclínica. Amb aquests resultats, podem destacar l'heterogeneïtat clínica de la diabetis diagnosticada a l'edat adulta, i, almenys en el nostre medi, una major afectació cardiovascular preclínica en la diabetis LADA. Per aquest motiu, creiem necessària la seva detecció precoç mitjançant marcadors immunològics (principalment anticossos anti-decarboxilasa de l'àcid glutàmic 65) en els pacients diagnosticats de diabetis en l'edat adulta.

SUMMARY

The present doctoral thesis describes the phenotypic characterization of patients with latent autoimmune diabetes in adults (LADA) in Catalonia (centers of Lleida and Barcelona). These patients were compared with those with classic type 1 diabetes diagnosed in adulthood or those with type 2 diabetes, in a total of four different cross-sectional studies.

In the first study, the clinical and metabolic phenotype in LADA patients is described. LADA patients showed an intermediate phenotype between the other two types of diabetes, with a frequency of metabolic syndrome of 37.3% in LADA, 15.5% in type 1 diabetes, and 67.2% in type 2 diabetes. The use of insulin in patients with LADA (45.7%) was more frequent than in those with type 2 diabetes (19%), but glycemic control was worse in LADA.

In the second study, residual stimulated insulin secretion was compared in the same three diabetes groups, by means of a standardized mixed meal tolerance test. To compare the influence of diabetes duration on C-peptide secretion, we designed a protocol that included patients the three types of diabetes in three different categories stratified by diabetes duration. The secretory capacity of the beta cell in patients with LADA was intermediate between the other two groups; that is, higher than in type 1 diabetes, and lower than in type 2 diabetes, although we did not find differences between patients with LADA and type 2 diabetes during the first 18 months of diabetes duration.

In the third study, the presence of atheromatous carotid plaques was explored in the cohort of patients LADA in Lleida, all without previous cardiovascular disease, and compared with patients with classic type 1 diabetes and type 2 diabetes, matched by age and sex. Patients with type 2 diabetes had a more unfavorable phenotype of adiposity and lipid profile than patients with autoimmune diabetes, and glycemic control was similar among the three groups at the time of the study. We found a higher frequency of carotid plaques in patients with LADA than in classic type 1 diabetes and type 2 diabetes (73.2% versus 57.1% and 56.9%, respectively). Carotid atheromatous disease also affected a greater number of territories in patients with LADA.

In the fourth study, the low-grade inflammation profile among the three types of diabetes was investigated. The total leukocyte count and soluble tumor necrosis factor-alpha receptor 2 (TNFRsII) concentrations increased gradually between patients with type 1 diabetes, LADA and type 2 diabetes, and the concentrations of adiponectin followed the opposite pattern, without differences for interleukin 6 concentrations. We also found a positive correlation of concentrations of ultrasensitive C reactive protein, TNFRsII and the

leukocyte count with adiposity markers, with an inverse correlation of the three markers with the HDL cholesterol concentration. We built a multivariate logistic regression model that showed that markers of inflammation provided additional information on top of the rest of parameters. It is noteworthy that TNFRsII was a risk predictor of LADA among patients with autoimmune diabetes.

In conclusion, in Catalonia, patients with LADA, with respect to patients with classic type 1 diabetes and type 2 diabetes, present a metabolic and adiposity phenotype, an insulin secretion, and a low-grade inflammatory profile that are intermediate between classic type 1 diabetes diagnosed in adulthood and type 2 diabetes. Furthermore, in these patients there is a greater frequency of preclinical cardiovascular disease. With these results, we can highlight the clinical heterogeneity of adult-onset diabetes, and, at least in our environment, a greater preclinical cardiovascular affectation in LADA. For this reason, we believe that early detection of immunological markers (mainly anti-decarboxylase antibodies of glutamic acid 65) is necessary in patients diagnosed with diabetes in adulthood.

INTRODUCCIÓN

La clasificación actual de la diabetes mellitus incluye dos tipos principales: la diabetes mellitus tipo 1, debida a la destrucción autoinmune de la célula beta pancreática, que generalmente conduce a la deficiencia absoluta de insulina; y la diabetes mellitus tipo 2, debida a un deterioro progresivo de la secreción de insulina en el marco de una resistencia a la misma (1). Sin embargo, sabemos que la diabetes mellitus es una enfermedad muy heterogénea, y la clasificación actual no refleja esta heterogeneidad (2). La hiperglucemia que se produce en ambos tipos de diabetes comporta el desarrollo de daños vasculares de pequeño y gran vaso. La enfermedad cardiovascular aterosclerótica es la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes con diabetes mellitus, y la mayor responsable de los costes directos e indirectos de la enfermedad (3).

El conocimiento médico actual ha demostrado que el tratamiento individualizado de los pacientes (medicina personalizada o de precisión) mejora de manera sustancial los resultados. Este campo está muy desarrollado en el campo de la Oncología Médica (4), en el que se tienen en cuenta marcadores biológicos, entre otros, para elegir la estrategia terapéutica más adecuada para cada paciente. Sin embargo, en el campo de la diabetes aún queda un largo camino por recorrer (5-7). Uno de los factores esenciales para ofrecer un tratamiento individualizado consiste en la adecuación del mismo al mecanismo fisiopatológico de la enfermedad; y, en el caso de la diabetes mellitus, el conocimiento de la existencia de una destrucción autoinmune de la célula beta es determinante para un adecuado tratamiento (8).

Clásicamente, la diabetes mellitus tipo 1 se definía como una diabetes de inicio en la infancia o juventud, en la que debido a la pérdida de secreción de insulina de una forma relativamente rápida y grave se producían síntomas derivados de la misma (poliuria, polidipsia y pérdida de peso), con un cuadro clínico inicial en muchos de los casos en forma de cetoacidosis diabética. Hoy en día se sabe que la tasa de destrucción de célula beta es muy variable, siendo más rápida en niños que en adultos, y que hasta un 50% de los pacientes debutan en la edad adulta (9), pudiendo aparecer a cualquier edad, incluso en la octava o novena década de la vida (1). Debido en parte a este inicio más paulatino, se cree que hasta un 50% de los pacientes diagnosticados de diabetes mellitus tipo 1 en la edad adulta se clasifican erróneamente como “diabetes tipo 2” (10).

Cuando la diabetes mellitus tipo 1 comienza en la edad adulta, la presentación clínica es mucho más heterogénea que en la infancia, abarcando todos los estadios intermedios entre pacientes que debutan con una insulinopenia grave hasta pacientes en los que el deterioro de función de célula beta es mucho más lento y progresivo, haciéndolo clínicamente indistinguible de una diabetes tipo 2, al menos inicialmente. Este hecho

posiblemente se debe a diferencias en la penetrancia de los factores genéticos e inmunológicos implicados en su patogenia (11).

La diabetes mellitus autoinmune de evolución lenta diagnosticada en la edad adulta se denomina LADA, por su acrónimo en inglés *latent autoimmune diabetes in adults* (diabetes autoinmune latente en adultos) (12).

1.- DEFINICIÓN DE DIABETES LADA

La primera referencia a un subgrupo de pacientes con diabetes tipo 2, en los que se detectaba autoinmunidad contra la célula beta pero mantenían en el tiempo la secreción de insulina se remonta a 1977, momento en el que Irvine *et al* describieron que alrededor del 11% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentaban autoanticuerpos anti-citoplasma de las células del islote (ICA). En estos pacientes ICA-positivos (ICA +), el tratamiento con sulfonilureas fracasaba antes, y por lo tanto era necesario iniciar el tratamiento con insulina de manera más precoz, comparado con el grupo ICA negativo (ICA -) (13). En la década de los 90, Tuomi y Zimmet acuñaron el acrónimo LADA, para definir una forma de diabetes autoinmune lentamente progresiva, que se podía controlar inicialmente con fármacos orales antes de requerir tratamiento con insulina (14, 15).

No existe una única definición para la LADA, y los criterios aceptados por los clínicos están basados en consensos previos (16,17). En 2005, la Sociedad de Inmunología de la Diabetes propuso tres criterios para el diagnóstico de la misma (18):

- Presencia de anticuerpos circulantes clásicos de la diabetes tipo 1.
- Edad al diagnóstico mayor de 30 años.
- Ausencia de necesidad de tratamiento con insulina durante los 6 primeros meses después del diagnóstico de la enfermedad.

De estos tres criterios, solo la presencia de anticuerpos circulantes es un criterio objetivo, ya que puede haber sujetos menores de 30 años que tengan una destrucción autoinmune lentamente progresiva de la célula β , y la decisión de iniciar tratamiento con insulina depende en muchos casos de criterios diferentes a los de la propia evolución de la enfermedad (18).

2.- EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de la LADA oscila entre el 2 y el 14% de los pacientes considerados *a priori* como diabetes tipo 2. Los datos de prevalencia son variables, lo que probablemente refleja no solo diferencias entre poblaciones, sino también las diferentes características

de diseño de los estudios de investigación publicados hasta la fecha. En general, la mayor prevalencia de autoinmunidad pancreática positiva en pacientes diagnosticados como diabetes tipo 2 se ha detectado en los países del norte de Europa. Se estima que la prevalencia de este tipo de diabetes autoinmune es mayor que la de la diabetes tipo 1 “clásica”, diagnosticada según la definición tradicional.

En la Tabla 1, se detallan los principales estudios publicados, que reflejan como la prevalencia de LADA entre los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 es alta en Europa (en torno al 10%), y mas baja en Asia y América del Norte (2 -5%). En el estudio multicéntrico *LADA China Study* se describió un gradiente Norte-Sur similar al encontrado en Europa. (19-37).

Tabla 1: Prevalencia de diabetes LADA entre los pacientes diagnosticados de diabetes tipo 2.

	Pacientes estudiados (n)	Población	Diagnóstico de LADA	Anticuerpo utilizado para la definición de LADA	Tiempo hasta insulinización desde el diagnóstico para definir LADA	Criterio de edad (años)
Wod 2018 (37)	3.866	Dinamarca	8,4%	GADA	*	> 18
Stidsen 2018 (36)	5.813	Dinamarca	2.8%**	GADA		> 30
Zaharieva 2017 (35)	128	Bulgaria	10,1%	GADA, IA-2A, ZnT8A	> 6 meses	> 35
Maddaloni 2015 (34)	17.072	Emiratos Árabes Unidos	2,6%	GADA, IA-2A	> 6 meses	30-70
Sachan 2015 (33)	618	Norte de India	1,5%	GADA	> 6 meses	> 30
Hawa 2013 (32)	6.156	Europa (Norte y Sur)	9,7%	GADA, IA-2A, ZnT8A	> 6 meses	30-70
Zhou 2013 (31)	4.880	China	5,9%	GADA	> 6 meses	> 30
Qi 2011 (30)	498	Este de China	9,2 %	GADA	> 6 meses	> 35
Park 2011 (29)	884	República de Corea	4,4 %	GADA, IA-2A, ZnT8A	> 2 meses	35 - 70
Maioli 2010 (28)	5.568	Cerdeña (Italia)	5%	GADA	> 8 meses	35-70
Radtke 2009 (27)	1.049	Noruega	10,1%	GADA	> 12 meses***	> 20

Lee 2009 (26)	1.270	República de Corea	5,1 %	GADA, IA-2A	> 6 meses	> 30
Buzzetti 2007 (25)	4.250	Italia	4,5 %	GADA, IA-2A	> 6 meses	-
Britten 2007 (24)	500	SE Asia (viviendo en Reino Unido)	2,6 %	GADA, IA-2A	-	31-89
Zinman 2004 (23)	4.134	Canadá, Estados Unidos y Europa	4,2%	GADA	> 3años	30-75
Soriguer 2002 (22)	150	España	3,7%	GADA	-	18-65
Tuomi 1999 (21)	1.122	Finlandia	9,3%	GADA	-	-
Bosi 1999 (20)	193	Norte de Italia	2%	GADA, IA-2A	-	> 40
Turner 1997 (19)	3.672	Reino Unido	11,7%	GADA, ICA	-	25-65

GADA: anticuerpos anti-decarboxilasa del ácido glutámico 65. IA-2A: anticuerpos anti-tirosina fosfatasa. ICA: anticuerpos anti-citoplasma de las células del islote. ZnT8A: anticuerpos anti-transportador de zinc 5 (ZnT8A).

(*) Péptido C basal > 300 pmol/L. (**) El porcentaje es sobre el total de pacientes diagnosticados como diabetes tipo 2 > 18 años, diagnóstico de LADA > 30 años. (***) También incluyen insulinización antes de 12 meses si péptido C > 150 pmol/L.

A la hora de interpretar estas cifras hay que tener en cuenta las siguientes consideraciones sobre los criterios diagnósticos (18):

- **Diabetes diagnosticada en la edad adulta:** el rango de edad en el que se define la edad adulta en los estudios es variable, pudiendo comenzar a los 18 años, aunque habitualmente se sitúa en torno a los 30.
- **Presencia de auto-anticuerpos circulantes clásicos de la diabetes tipo 1:** en los diferentes estudios se determinan anticuerpos anti-decarboxilasa del ácido glutámico 65 (GADA), anti-tirosina fosfatasa (IA-2A), anti-insulina (AI), anti-transportador de zinc 5 (ZnT8A) e ICA. Los anticuerpos más utilizados en la práctica clínica y en los estudios para evaluar la presencia de autoinmunidad en la diabetes mellitus tipo 2 son los GADA (38). La variabilidad intraensayo para la determinación de GADA es baja, y de menos de un 10% para los laboratorios que cumplen el programa de estandarización de anticuerpos de la diabetes (DASP). Aun así, los puntos de corte para considerarlos positivos son diferentes según los estudios, y el significado clínico de títulos bajos de GADA es incierto. Además,

aunque los GADA en la diabetes LADA son más persistentes que en la diabetes tipo 1, los escasos datos de estudios longitudinales muestran una desaparición de los mismos en el 40% de los pacientes a los 10 años de seguimiento (2), y una tasa de fluctuación positivo/negativo del 20% a lo largo de 3 años (39).

- **Tratamiento con fármacos no insulínicos en los primeros 6 meses de la enfermedad:** sin duda, este es el aspecto más variable, y especialmente cuando comparamos estudios epidemiológicos a nivel mundial. En la decisión de iniciar tratamiento con insulina influyen múltiples factores externos al curso clínico de la diabetes, como son el grado de sospecha del médico, el nivel de desarrollo económico de la región, o el tipo de organización de la asistencia sanitaria. En nuestro medio, se ha documentado que uno de los factores más importantes para que un médico decida iniciar insulina en estos pacientes es el disponer de un resultado positivo en la autoinmunidad pancreática (40).

3.- GENÉTICA

Tanto la diabetes tipo 1 como la diabetes tipo 2 son enfermedades poligénicas complejas, habiéndose encontrado más de 60 *loci* de susceptibilidad asociados a dichas enfermedades. En el caso de la diabetes LADA, se ha descrito una asociación con genes implicados en ambos tipos de diabetes (2, 38). Los estudios de susceptibilidad genética en la diabetes LADA se han hecho en su mayor parte para genes ya relacionados con la diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2, lo que dificulta el descubrimiento de nuevos genes relacionados principalmente con la diabetes LADA. El riesgo de padecer diabetes LADA está aumentado si los progenitores padecen tanto diabetes tipo 1 como diabetes tipo 2. Aun así, el riesgo es mucho mayor si el progenitor tiene diabetes tipo 1, lo que apunta hacia un mayor impacto de los genes relacionados con la diabetes tipo 1 clásica (41).

3.1- GENES ASOCIADOS A LA DIABETES TIPO 1:

- **Complejo mayor de histocompatibilidad clase II DQ beta1 (HLA-DQB1).** Es el locus de susceptibilidad más importante para la diabetes tipo 1. Cuando se comparan con los pacientes con diabetes tipo 2, los pacientes con diabetes LADA presentan una asociación positiva con los genotipos de riesgo para diabetes tipo 1, y negativa con los genotipos protectores. Esta asociación es, sin embargo, menor que la que presentan los pacientes con diabetes tipo 1 clásica diagnosticados en la edad adulta, y mayor cuanto más parecido es el fenotipo al de la diabetes tipos 1 clásica (21, 42 - 45). En los pacientes con diabetes LADA estos hallazgos genéticos se correlacionan con la positividad para los GADA:

aquellos pacientes con títulos altos de GADA tienen más alelos de riesgo y menos alelos protectores que los pacientes con títulos bajos. Aun así, se mantienen las diferencias previamente mencionadas entre los pacientes con diabetes LADA con títulos altos de GADA y los pacientes con diabetes tipo 1 diagnosticada en la edad adulta (46). Estudios recientes en población China han encontrado que, a pesar de la fuerte asociación con el HLA, existen discrepancias entre los haplotipos de riesgo para diabetes mellitus tipo 1 y diabetes LADA (47).

- **Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA4) y proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22 (PTPN22)** . Las variantes en estos genes que confieren riesgo de diabetes tipo 1 son más frecuentes en los pacientes con diabetes LADA que en la población control con diabetes mellitus tipo 2 o sin diabetes (48, 49). Los datos no son tan robustos como para la diabetes tipo 1, pero un reciente metanálisis concluye que existe tal asociación (50). De manera similar a lo descrito para el HLA-DQB1, la asociación con PTPN22 es más fuerte en aquellos pacientes con diabetes LADA con títulos más altos de GADA.
- **Gen de la insulina (INS)**. Aunque existen datos discrepantes en la literatura, en los últimos estudios se ha descrito en población china una asociación entre el número variable de repeticiones en tándem (VNTR) en el promotor del gen de la insulina y la diabetes LADA, de manera similar a la de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (51).

3.2- GENES ASOCIADOS A LA DIABETES TIPO 2

- **Factor de transcripción 7 tipo 2 (TCF7L2)**. El alelo de riesgo T del polimorfismo de un solo nucleótido rs7903146 en este factor de transcripción es el factor genético que confiere más riesgo para la diabetes tipo 2 conocido hasta la fecha. Se ha encontrado asociación también con la diabetes LADA, especialmente en aquellos pacientes con menor índice de masa corporal, al igual que ocurre en la diabetes tipo 2 (44, 52) y con título bajo de GADA (53).
- Otros genes relacionados con la diabetes tipo 2 para los que se ha encontrado asociación de variantes genéticas con la diabetes LADA son el gen asociado con la masa grasa y obesidad (FTO) y ZMIZ1 entre otros (54).

Uno de los principales problemas en los estudios previamente descritos es el pequeño tamaño muestral de los mismos, con la consiguiente falta de potencia estadística que avale los resultados encontrados. Recientemente, se ha publicado un estudio en el que se incluyeron 978 pacientes con diabetes LADA de origen europeo, en el que estudiaron

67 polimorfismos de un solo nucleótido relacionados con la diabetes tipo 1 y 71 con la diabetes tipo 2. Los resultados mostraron una mayor asociación con los genes relacionados con la diabetes tipo 1 que con los asociados con la diabetes tipo 2; y no confirman la asociación previamente descrita entre la diabetes LADA y el gen TCF7L2. El único polimorfismo asociado a la diabetes tipo 2 que también se asoció a la diabetes LADA se situaba en el gen del factor de transcripción 1 alfa del hepatocito (HNF1A) (55).

4.- AUTOINMUNIDAD

4.1- INMUNIDAD ADAPTATIVA

La diabetes tipo 1 es una enfermedad producida por autoinmunidad celular. En la diabetes LADA, al igual que en la diabetes tipo 1 clásica, se ha demostrado la presencia de insulinitis mediante gammagrafía pancreática con interleucina 2 (IL-2) marcada con tecnecio⁹⁹, demostrando la presencia de linfocitos activados en el páncreas de estos pacientes (56). En los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 es habitual encontrar positividad para más de un auto-anticuerpo específico de célula beta (ICA, GADA, IA-2A, AI, ZnT8A), y son considerados epifenómenos de la destrucción de las células de los islotes, más que factores patogénicos en sí. El anticuerpo más prevalente en la mayoría de los estudios realizados en diabetes autoinmune del adulto de progresión lenta es el GADA, presente hasta en el 90% de los casos. En este tipo de diabetes la agrupación de múltiples anticuerpos al diagnóstico es menos frecuente que en la diabetes tipo 1 (58).

En el estudio italiano NIRAD (*Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes*), la prevalencia de GADA e IA-2A en 4.350 pacientes con diabetes tipo 2 que no necesitaron insulina al menos seis meses tras el diagnóstico fue del 4,5%, con la siguiente distribución de frecuencia de positividad: GADA + 97%, IA-2A + 4%, y solo IA-2A + 1% (25). Posteriormente, se ha investigado la presencia de ZnT8A en esta población, encontrándose positividad en el 18% de los pacientes previamente catalogados como diabetes LADA por ser GADA +, y en un 1,4% de aquellos GADA - e IA-2A - (58).

Los GADA son, además de los más prevalentes, los anticuerpos que más perduran a medida que avanza la enfermedad. Esto hace que sea el marcador inmunológico más utilizado para detectar la diabetes LADA en un paciente con una diabetes catalogada previamente de tipo 2 (59, 60).

Es interesante resaltar que existen diferencias antigénicas para los GADA entre la diabetes LADA y la diabetes tipo 1 clásica: se ha descrito en la diabetes LADA menor afinidad por el extremo carboxi-terminal y mayor por el N-terminal de la enzima GAD65

que en la tipo 1 clásica (61). Además, aquellos pacientes con diabetes LADA cuyos GADA presentan afinidad por el extremo carboxi-terminal la disminución de péptido C es más rápida (62), son más delgados, se diagnostican más jóvenes, reciben tratamiento con insulina con mayor frecuencia, y presentan un mayor número de auto-anticuerpos asociados a la diabetes (63).

Para los IA-2A, también existen diferencias respecto a los pacientes con diabetes tipo 1 clásica. El epítipo IA-2 (605-979) es el más sensible y específico para la diabetes tipo 1 clásica. Sin embargo, en la diabetes LADA el constructo IA-2 (256-760) es el que ha mostrado los mejores resultados para detectar autoinmunidad en pacientes diagnosticados como diabetes tipo 2 (64) y, además, presenta mayor positividad en aquellos pacientes con un fenotipo más similar al de la diabetes tipo 2 (mayor obesidad, cintura y niveles de ácido úrico). Este dato sugiere un mecanismo patogénico diferente, ligado a la inflamación crónica que se asocia al daño en la célula beta de la diabetes tipo 2 (65).

Distribución bimodal del título de auto-anticuerpos

En 1999, Tuomi *et al* describieron que aquellos pacientes con diabetes LADA que tenían títulos más elevados de GADA presentaban un fenotipo más parecido a la diabetes tipo 1 clásica (21). Son muchos los autores que han descrito desde entonces una distribución bimodal del título de GADA en pacientes con diabetes LADA de diferentes poblaciones (25, 28, 31, 32). Los pacientes con títulos más altos presentan menor índice de masa corporal, menor presencia de síndrome metabólico, y mayor concentración de hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}). En estudios prospectivos, se ha descrito una asociación de estos títulos altos de GADA con el riesgo de necesitar tratamiento con insulina (66). Además, estos pacientes con títulos altos de GADA y fenotipo más similar al de la diabetes tipo 1 clásica presentan mayor prevalencia de genotipos de HLA que confieren riesgo alto y moderado para diabetes tipo 1 (25), así como el genotipo de riesgo de PTPN22 (67).

Autoinmunidad órgano-específica asociada

Cuando se comparan con los pacientes con diabetes tipo 2, los pacientes con diabetes LADA presentan una mayor prevalencia de otros auto-anticuerpos órgano-específicos, como por ejemplo auto-anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea, anti-transglutaminasa, anti-célula parietal gástrica o anti-21-hidroxilasa. La prevalencia es similar a la de los pacientes con diabetes mellitus tipo1 clásica (68), y parece ser superior en aquellos pacientes con títulos altos de GADA (69).

4.2- INMUNIDAD INNATA

Las alteraciones en la inmunidad innata de la diabetes tipo 2 se asocian principalmente a las consecuencias metabólicas de la adiposidad. La obesidad se asocia con una inflamación crónica de bajo grado, que es el resultado de señales quimiotácticas y de estrés producidas por los parámetros alterados de adipocitos y ácidos grasos. En este contexto, se produce un aumento de la secreción de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 1 beta (IL-1 β), y el interferón gamma. Cuando esta inflamación crónica se mantiene en el tiempo conlleva la aparición de los componentes del síndrome metabólico, resistencia a la insulina y diabetes (70) , (71).

Por otro lado, la patogenia de la diabetes tipo 1 es el producto de una interacción compleja entre la célula beta pancreática y los sistemas inmunes adaptativos e innatos. En la diabetes tipo 1, se produce una destrucción autoinmune de la célula beta que se acompaña de la presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos de la célula beta. La citotoxicidad está mediada por linfocitos T, y se ve exacerbada por la liberación de citocinas pro-inflamatorias por parte de las células de la inmunidad innata (macrófagos, células *natural killer* y neutrófilos) (72, 73).

En la diabetes LADA, confluyen las alteraciones inmunológicas de la diabetes tipo 1 clásica con un patrón de adiposidad intermedio entre esta y la diabetes tipo 2. El papel de las alteraciones en la inmunidad innata en la diabetes LADA ha sido poco estudiado hasta el momento.

Pham *et al* (74) estudiaron las diferencias en población europea en el perfil de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α) y anti-inflamatorias (interleucina 10 (IL-10), y antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1RA)) en pacientes con diabetes tipo 1 clásica, tipo 2 y LADA, además de en un grupo control. Los tres tipos de diabetes tenían concentraciones circulantes más elevadas de citocinas que el grupo control. Los pacientes con diabetes tipo 2 presentaron un mayor nivel de IL-6, TNF- α e IL-1RA que los pacientes con diabetes tipo 1 clásica o LADA. A pesar de que la adiposidad estaba claramente relacionada con el nivel de citocinas sistémicas, el perfil diferencial entre la diabetes tipo 2 y las formas de diabetes autoinmunes persistió tras ajustar las diferencias con el índice de masa corporal. No encontraron diferencias en el perfil de citocinas en los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes LADA.

Xiang *et al* (75), mediante un diseño similar en población asiática, analizaron la

distribución de IL-6, lipocalina 2 (LCN2), proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us) y adiponectina (citocina que favorece la sensibilidad a la insulina). Los pacientes con diabetes tipo 2, diabetes tipo 1 clásica y diabetes LADA presentaron unas concentraciones mayores de IL-6 y LCN2 que la población sin diabetes. Sin embargo, la PCR-us solo era mayor que en los controles en los pacientes con diabetes tipo 2 y diabetes LADA; sin embargo, la adiponectina era mayor en los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes LADA que en la población control, y tenía una correlación positiva con los títulos de GADA. En los pacientes con diabetes tipo 2, las concentraciones de adiponectina eran inferiores a los de la población control.

Las moléculas de adhesión y las quimiocinas intervienen en la infiltración de los leucocitos en la pared arterial, proceso involucrado en la formación de la placa aterosclerótica, y sirven como marcadores de disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular (76). Pham *et al* estudiaron el perfil de estos marcadores en pacientes con diabetes tipo 1 clásica, diabetes LADA y diabetes tipo 2. Encontraron mayor concentración de moléculas de adhesión en los pacientes con diabetes tipo 2 que en los otros dos grupos de diabetes autoinmune, sin encontrar diferencias en los niveles de quimiocinas. No encontraron diferencias entre los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes LADA. A pesar de estos hallazgos, las concentraciones de moléculas de adhesión se solapaban entre grupos, por lo que no servirían como marcadores subrogados del tipo de diabetes (77).

Schlott *et al* encontraron una asociación inversa en pacientes con diabetes LADA entre la presencia de IA-2A y ZnT8A y los niveles de algunas citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión. No detectaron la misma asociación para la presencia de GADA, pero sí que describieron una relación inversa entre los títulos de GADA y estas citocinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión (68).

Con los resultados publicados hasta el momento, aunque escasos, podemos concluir que la inflamación sistémica es un fenómeno común en la diabetes tipo 1 clásica, la diabetes tipo 2 y la diabetes LADA, con algunas características diferenciales entre ellas. Esta alteración en la inmunidad innata tendría un efecto sumatorio a la alteración inmune adaptativa presente en la diabetes autoinmune (tipo 1 clásica o LADA) (68).

5.- FUNCIÓN DE LA CÉLULA BETA

En la diabetes LADA, se produce un deterioro progresivo en la función de la célula beta, lo que suele implicar la necesidad de iniciar el tratamiento con insulina de manera más

precoz que en la diabetes tipo 2. Estas diferencias son más patentes a medida que avanza la enfermedad, ya que en el momento del diagnóstico la función de la célula beta suele ser similar en ambos tipos de diabetes. Son pocos los datos que existen en la literatura al respecto, y además las poblaciones estudiadas suelen ser pequeñas y heterogéneas en múltiples aspectos: criterios diagnósticos de LADA, grupo de comparación, tiempo de evolución de la diabetes y, de manera importante, en la metodología empleada para la medición de la reserva pancreática.

5.1 ESTUDIOS TRANSVERSALES:

En el estudio poblacional finlandés “*Botnia Study*”, ya se describió un menor valor de péptido C basal en aquellos pacientes catalogados de diabetes tipo 2 con GADA positivos (21).

En el año 2000, Carlsson *et al* estudiaron un pequeño número de pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 2 con poco tiempo de evolución de la enfermedad. Mediante el test de estimulación con arginina, describieron una menor secreción de insulina en los pacientes con diabetes LADA, con una sensibilidad a la insulina similar en ambos tipos de diabetes (78).

Hosszúfalusi *et al* estudiaron el péptido C en ayunas en pacientes con diabetes tipo 1 clásica diagnosticada en la edad adulta, diabetes LADA y diabetes tipo 2. Las concentraciones de péptido C fueron similares al diagnóstico en los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes LADA, y menores que en la diabetes tipo 2. Sin embargo, en aquellos pacientes con más de 10 años de evolución de la diabetes las concentraciones de péptido C fueron similares entre la diabetes LADA y la diabetes tipo 2, y mayores que en la diabetes tipo 1 clásica (57).

El estudio HUNT (*The Nord-Trøndelag Health Study*) es un estudio de base poblacional llevado a cabo en Noruega en los años 90. En el momento del estudio, los médicos desconocían el estado autoinmunitario de los pacientes con diabetes, y la decisión de tratar con insulina estaba basada en la práctica clínica habitual. Los pacientes catalogados a posteriori como LADA tratados con insulina (GADA + e independencia de la insulina durante más de 12 meses) presentaban una menor concentración de péptido C basal y títulos mayores de GADA que los pacientes no tratados con insulina, cuyos niveles de péptido C eran similares a los de los pacientes con diabetes tipo 2 no tratados con insulina (27).

Juhl *et al* estudiaron la secreción de insulina mediante sobrecarga endovenosa de glucosa y test de comida mixta en 12 pacientes con diabetes LADA. El grupo comparador fueron 12 pacientes con diabetes tipo 2 apareados por edad, y 6 pacientes con diabetes tipo 2 apareados por edad y peso. Los tres grupos presentaban un tiempo de evolución de la enfermedad similar. Observaron un déficit en los parámetros de secreción de insulina en los pacientes con diabetes LADA respecto a los pacientes con diabetes tipo 2; pero estas diferencias desaparecieron cuando se compararon con los pacientes apareados por el peso. En el análisis multivariante, el peso resultó ser el único factor con asociación positiva con la magnitud de la secreción de insulina (79).

5.2 ESTUDIOS PROSPECTIVOS:

En 1995, Niskanen *et al* siguieron a pacientes con diabetes “no insulino-dependiente” (término que se utilizaba entonces para denominar la diabetes tipo 2) desde el inicio clínico, determinando el péptido C basal y estimulado con glucagón a los 5 y 10 años del mismo. Describieron una mayor caída en los niveles de péptido C en aquellos pacientes con autoinmunidad pancreática positiva (80).

Yang *et al* siguieron a un pequeño grupo de pacientes con diabetes LADA durante una media de 5 años, y comparan la evolución del péptido C basal y postprandial con un grupo de pacientes con diabetes tipo 2. Observan una disminución en la función de célula beta más rápida en la diabetes LADA, siendo el factor más fuertemente asociado el título de GADA (81).

Chaillous *et al* siguieron a 12 pacientes con diabetes tipo 2 y 13 con diabetes LADA durante 2 años, y no detectaron cambios significativos en la función de célula beta, mediante la medición de las concentraciones de péptido C estimulado con una comida mixta estandarizada y también con glucagón. Las concentraciones de péptido C estimulado con la comida de prueba fueron siempre menores en el grupo con diabetes LADA, sin encontrar diferencias entre ambos grupos de diabetes con el estímulo con glucagón (82).

Lee *et al* describieron una disminución progresiva de péptido C basal a lo largo de 6 años de seguimiento, detectable a partir del primer año, en pacientes con diabetes LADA de Corea. La disminución fue mayor en los pacientes con títulos altos de GADA. No se observó, sin embargo, este deterioro en la función de célula beta en un grupo control de pacientes con diabetes tipo 2 (83).

Thunander *et al* describieron un deterioro del péptido C basal y estimulado con glucagón en pacientes LADA seguidos durante 3 años. No encontraron asociación entre parámetros clínicos o niveles de GADA con la progresión de la insulinopenia, siendo el péptido C basal inicial el único parámetro que predecía la disminución del péptido C (84). Cabe remarcar que en este estudio se realizó una intervención aleatorizada mediante tratamiento precoz con insulina, no consiguiendo ningún efecto sobre el deterioro de la secreción de péptido C en el seguimiento.

Un aspecto que cada vez cobra más relevancia es la importancia del título de GADA en la presentación y evolución clínica de los pacientes LADA: en el estudio prospectivo “LADA China Study” los pacientes con diabetes LADA con títulos bajos de GADA presentaron un péptido C postprandial similar al de los pacientes con diabetes tipo 2 tres años después del diagnóstico (85).

6.- SENSIBILIDAD A LA INSULINA

Los datos respecto a la sensibilidad a la insulina son muy escasos, y existe controversia sobre de su papel en la diabetes LADA. Behme *et al* evaluaron la resistencia a la insulina mediante el modelo HOMA-IR (*homeostasis model assessment – insulin resistance*): los pacientes con diabetes tipo 2 presentaban mayor resistencia a la insulina que los pacientes LADA; y éstos una resistencia similar a los pacientes con diabetes tipo 1 de larga evolución (86). El índice de masa corporal se correlacionaba con HOMA-IR. Los pacientes catalogados como diabetes tipo 2 y positivos para GADA del estudio ADOPT presentaban una menor resistencia a la insulina (HOMA-IR) que aquellos con GADA negativos (23) Sin embargo, en un estudio en el que la sensibilidad se midió mediante clamp normoglucémico-hiperinsulinémico los resultados fueron similares en los pacientes con LADA y diabetes tipo 2 agrupados por edad e índice de masa corporal (79). Rosário *et al* compararon pacientes con LADA con pacientes con diabetes tipo 1 diagnosticada en la edad adulta, y detectaron una mayor resistencia a la insulina (HOMA-IR) en los primeros (87). Chiu *et al* encontraron una mayor resistencia a la insulina en pacientes con LADA y diabetes tipo 2 respecto a un grupo control (HOMA-IR y *qualitative insulin sensitivity check index*). Los dos grupos de diabetes presentan una resistencia a la insulina similar, y fuertemente correlacionada con el índice de masa corporal. Sin embargo, es probable que la metodología de selección de los pacientes minimicen las diferencias entre los dos grupos de diabetes (88).

7.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

7.1- FENOTIPO

En comparación con los pacientes con diabetes tipo 2, los pacientes con diabetes LADA son más jóvenes al diagnóstico y progresan más rápidamente hacia la insulinopenia. En cuanto a las características clínicas y bioquímicas desfavorables desde el punto de vista cardiovascular (componentes del síndrome metabólico) existe un solapamiento entre los pacientes con LADA con los otros dos tipos, diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2, encontrándose de manera general los pacientes LADA en un punto intermedio.

Comparación con diabetes tipo 1 clásica: En uno de los primeros estudios diseñados específicamente para conocer las características fenotípicas relacionadas con el síndrome metabólico de los pacientes con diabetes LADA, Hosszúfalusi *et al* no encontraron diferencias entre éstos (n= 54) y los pacientes con diabetes tipo 1 clásica diagnosticada en la edad adulta (n=57). Sin embargo, cuando se comparaban con los pacientes con diabetes tipo 2 (n=190), los pacientes LADA eran más delgados, con menor índice cintura-cadera, niveles más bajos de colesterol total y triglicéridos, y más altos de cHDL, y menor presencia de hipertensión arterial (57). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en Brasil, Rosário *et al* compararon 54 pacientes LADA con 45 pacientes con diabetes tipo 1 clásica diagnosticada en la edad adulta. Los pacientes LADA presentaban más componentes de síndrome metabólico (obesidad, hipertensión y dislipemia) que los pacientes con diabetes tipo 1 clásica (87).

Comparación con diabetes tipo 2: En el estudio BOTNIA, los pacientes clasificados como diabetes tipo 2 pero con positividad para GAD (n = 104) presentaban menos obesidad, índice cintura-cadera, hipertensión arterial y niveles de triglicéridos que los pacientes GADA - (n = 1.017) (21). El estudio ADOPT fue un estudio de intervención farmacológica en pacientes con diabetes tipo 2 de reciente diagnóstico llevado a cabo en Norteamérica y Europa. Cuando se comparan los pacientes GADA + (n=174) con los pacientes GADA - (n=3.960), no se encuentran diferencias en cuanto a obesidad, índice cintura-cadera o hipertensión arterial, pero sí se detectó un fenotipo menos desfavorable de lípidos en los pacientes GADA + (23). En el estudio de intervención en diabetes tipo 2 de diagnóstico reciente UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*), se observó una menor proporción de pacientes síndrome metabólico entre aquellos pacientes con diabetes tipo 2 y autoinmunidad positiva (n = 526) respecto a los que tenían autoinmunidad negativa (n = 4.019) (89). El estudio NIRAD es un estudio nacional llevado a cabo en Italia a principios de los años 2.000, con el fin de estudiar la diabetes autoinmune en aquellos pacientes catalogados de diabetes tipo 2 que acudían a centros

especializados en diabetes. De los 4.250 pacientes reclutados, 193 presentaban autoinmunidad pancreática positiva, y se diferenciaban de éstos en que presentaban un perfil más favorable para todos los componentes del síndrome metabólico (25). El estudio LADA China es un estudio de características similares al anterior, llevado a cabo hace una década en China. Los pacientes reclutados fueron 4.880, y la prevalencia de GADA + fue del 5.9%. Los pacientes GADA + presentaron también una menor prevalencia de todos los componentes del síndrome metabólico (31). En el estudio europeo ACTION LADA, se compararon pacientes reclutados en centros especializados en diabetes afectos de diabetes tipo 1 clásica (n = 288), LADA (n = 117) y diabetes tipo 2 (n = 288). La presencia de síndrome metabólico, eliminando la glucemia como variable, era similar en pacientes con diabetes LADA, diabetes tipo 1 y población general, y menor que en el grupo de pacientes con diabetes tipo 2 (90).

Hay que destacar que la diabetes LADA es una entidad heterogénea, con fenotipos muy variables que van desde el del paciente delgado, clásicamente asociado a la diabetes tipo 1, hasta el del paciente obeso con múltiples factores de riesgo cardiovascular característico de la diabetes tipo 2. Esta variabilidad clínica está claramente asociada al título de GADA y al número de auto-anticuerpos contra antígenos de célula beta. En diversos estudios, se apunta a una distribución bimodal del título de anticuerpos, siendo las características de aquellos pacientes con títulos altos de GADA más similares a las de los pacientes con diabetes tipo 1: menor presencia de síndrome metabólico, menor secreción de péptido C y mayor frecuencia de tratamiento insulínico, mayor asociación con otras enfermedades autoinmunes, y mayor asociación con genotipos predisponentes a diabetes tipo 1 y menor con protectores (21, 25, 28, 31, 32, 58, 91).

A nivel individual existe un gran solapamiento entre las características clínicas de los pacientes con LADA y con diabetes tipo 2, especialmente en las fases iniciales de la enfermedad, lo que dificulta el diagnóstico correcto del paciente (92). Con la intención de encontrar una herramienta clínica que ayudara al diagnóstico de la diabetes LADA al diagnóstico, Furlanos *et al* realizaron un estudio retrospectivo en pacientes de Australia. Las cinco características clínicas más frecuentes en el momento del diagnóstico en los pacientes con LADA, comparados con la diabetes tipo 2 fueron: diagnóstico antes de los 50 años, síntomas agudos de hiperglucemia, índice de masa corporal < 25 Kg/m², y antecedentes personales y familiares de enfermedades autoinmunes. Estas características las validaron en un estudio prospectivo, y resultaron en una sensibilidad del 90% y una especificidad del 71% para el diagnóstico de LADA si se cumplían dos o más de ellas (93).

7.2- COMPLICACIONES CRÓNICAS

Respecto a las complicaciones crónicas de la diabetes, los estudios de los que disponemos son muy escasos, y hasta el momento no se han encontrado diferencias relevantes con los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2.

Isomaa *et al* estudiaron 59 pacientes con diabetes LADA, 59 pacientes con diabetes tipo 2 y 111 pacientes con diabetes tipo 1 clásica. A pesar de tener un fenotipo metabólico más favorable, los pacientes con diabetes LADA no presentaron diferencias en lo que respecta a enfermedad o mortalidad cardiovascular cuando se compararon con el grupo con diabetes tipo 2, siendo mayor en estos grupos que en los pacientes con diabetes tipo 1. Cabe remarcar que el control glucémico resultó un predictor independiente de enfermedad isquémica coronaria en los pacientes con diabetes LADA, pero no en los pacientes con diabetes tipo 2. Respecto a las complicaciones microvasculares, no encontraron diferencias entre pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 2, y ambos presentaban una mayor prevalencia de neuropatía diabética y menor de retinopatía diabética que los pacientes con diabetes tipo 1 (94).

El estudio Fremantle Diabetes fue un estudio longitudinal prospectivo de base comunitaria llevado a cabo en Australia, en el que se siguió anualmente durante 10 años a 1.210 pacientes con diabetes tipo 2 y 45 pacientes con diabetes LADA. La prevalencia e incidencia de complicaciones microvasculares, macrovasculares y mortalidad por cualquier causa fue similar entre ambos grupos de pacientes, con excepción de la nefropatía diabética, que fue más prevalente en la diabetes tipo 2. Ambos grupos no diferían en edad ni tiempo de evolución de la diabetes, y la presencia de síndrome metabólico era superior en los pacientes con diabetes tipo 2 (95).

En el estudio poblacional HUNT, los pacientes con diabetes LADA tenían una mayor cociente albúmina/creatinina, ajustado por posibles variables de confusión, que los pacientes con diabetes tipo 1 y similar al de los pacientes con diabetes tipo 2. Estas diferencias, no encontradas en el estudio de Isomaa *et al* las atribuyeron en parte a que en el mencionado estudio los pacientes provenían de un medio hospitalario, mientras que el estudio HUNT era de base poblacional (96).

En el estudio poblacional HUNT2, con una media de seguimiento prospectivo de 9 años, los pacientes con diabetes LADA, a pesar de tener un perfil metabólico más favorable, presentaban un aumento en la mortalidad por cualquier causa (*Odds ratio* (OR) 1,50 (IC 95% 1,16 – 1,95), mortalidad cardiovascular (OR 1,68 (IC 95% 1,18 – 2,40) y mortalidad

por cardiopatía isquémica coronaria (OR 2,54 (IC 95% 1,60 – 4,05) respecto a la población sin diabetes similar al de los pacientes con diabetes tipo 2. La mayor parte del exceso de mortalidad, tanto en los pacientes con diabetes autoinmune como en los pacientes con diabetes tipo 2 se relacionaba con un mal control glucémico (97).

El estudio CARDS fue un ensayo de intervención con atorvastatina versus placebo en pacientes con diabetes tipo 2, sin enfermedad cardiovascular y con al menos un factor de riesgo añadido a la diabetes. Tras 3,9 años de seguimiento la prevalencia e incidencia de complicaciones microvasculares y macrovasculares fue igual entre los pacientes GADA - (n = 2.252) y GADA + (n = 173). Los pacientes GADA + tenían una mayor duración de la diabetes y una menor presencia de síndrome metabólico (91).

Lu *et al*/ estudiaron 31 pacientes con diabetes LADA y los compararon con pacientes con diabetes tipo 2, apareados en proporción 2 a 1 por edad, sexo y tiempo de evolución de la diabetes. Los pacientes con diabetes LADA tenían una menor presencia de todos los parámetros del síndrome metabólico, con excepción de la hiperglucemia. Los pacientes con diabetes LADA y una duración de la diabetes inferior a 5 años presentaban una menor prevalencia de retinopatía y neuropatía; pero esta diferencia desaparecía cuando la duración de la enfermedad era mayor de 5 años. No encontraron diferencias en la prevalencia de ateromatosis carotídea (estudiada mediante ecografía) o enfermedad cardiovascular clínica entre ambos tipos de diabetes (98).

Un estudio reciente de base poblacional no ha encontrado diferencias en la prevalencia de retinopatía diabética en pacientes con diagnóstico reciente (menos de 1 año) de diabetes tipo 2 (n = 2.288) y de diabetes LADA (n = 163) (99).

8.- TRATAMIENTO

En el momento actual no existen recomendaciones específicas para el tratamiento de la diabetes LADA. La información de la que disponemos es además muy limitada, no solo por el escaso número de estudios, sino también por la gran variabilidad de las características clínicas y bioquímicas de los pacientes que son incluidos en los ensayos clínicos.

8.1- INTERVENCIÓN INMUNOMODULADORA

Este tipo de diabetes es un modelo muy interesante para el estudio de terapias inmunomoduladoras en las fases iniciales de la enfermedad, dada la mayor masa de célula beta residual en el momento del diagnóstico comparada con la de la diabetes tipo

1. A pesar de esto, solo disponemos hasta el momento de un estudio en fase II, aleatorizado y controlado con placebo, en el que se utilizó como antígeno GAD65 recombinante formulado con hidróxido de aluminio (GAD65-alum). Al administrarse a pacientes con diabetes LADA con menos de 5 años de evolución se consiguió una mejoría del péptido C basal y estimulado (100).

8.2- INSULINA

Los pacientes con diabetes LADA se tratan con insulina más frecuentemente que los pacientes con diabetes tipo 2, con cifras que oscilan entre el 40 y el 85% (27, 19, 91). A pesar de esto, y de que la insulina se inicia de manera más precoz que en la diabetes tipo 2, los pacientes con diabetes LADA, especialmente pasados unos años tras el diagnóstico, tienen peor control glucémico (101).

El criterio para iniciar la insulinoterapia es heterogéneo, tal y como se demostró en un cuestionario enviado a diabetólogos de 9 centros europeos (40). A la hora de prescribir insulina todos los centros utilizaron la HbA_{1c} y la pérdida de peso como criterio, 8 centros consideraron también la cetosis, 7 centros las complicaciones y 6 centros las preferencias del paciente. En aquellos centros donde se disponía de la medición de GADA el tiempo hasta la insulinización fue menor.

El inicio de insulina en fases tempranas de la enfermedad parece ser una de las mejores opciones terapéuticas en estos pacientes, a pesar de que la evidencia no es concluyente. Solo hay dos estudios prospectivos de intervención precoz con insulina en pacientes con diabetes LADA, con muestras pequeñas y tratamientos heterogéneos en el grupo control (102, 84). En el primero, los resultados apuntan a una mejor preservación de la función de célula beta en los pacientes con diabetes LADA tratados con insulina comparados con los tratados con sulfonilureas, mientras que en el segundo se consigue un mejor control glucémico en los pacientes tratados con insulina, pero sin encontrar diferencias en la preservación de la función insulinosecretora de la célula beta.

8.3- HIPOGLUCEMIANTES NO INSULÍNICOS

8.3.1- METFORMINA

La metformina es el fármaco de elección para el tratamiento inicial de la diabetes tipo 2. No disponemos de estudios específicos en la diabetes LADA (103). Dada la eficacia y seguridad de este fármaco, y que estos pacientes presentan un fenotipo intermedio entre la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2, la metformina se suele utilizar en la práctica habitual para tratar a los pacientes con diabetes LADA.

8.3.2- SULFONILUREAS

Hay pocos estudios de intervención con este fármaco en pacientes con diabetes LADA, y son muy heterogéneos, siendo el comparador habitual la insulina. Generalmente, el control glucémico es peor y la disminución de la secreción de célula beta es mayor con las sulfonilureas, por lo que todo apunta a que no son un fármaco de elección para este tipo de diabetes (102, 103).

8.3.3- TIAZOLIDINEDIONAS

Estos fármacos insulino-sensibilizadores tienen también efecto antiinflamatorio e inmunomodulador. Existe un pequeño estudio en el que empleando rosiglitazona combinada con insulina parecía preservarse mejor la función de célula beta que con sulfonilureas o insulina sola (104). No hay estudios en pacientes con diabetes LADA en el que se evalúe el tratamiento con pioglitazona, la única tiazolidinediona disponible actualmente.

8.3.4- INHIBIDORES DE LA DIPEPTIDIL PEPTIDASA-4

Estos fármacos tienen efecto protector de la célula beta in vitro y en modelos animales. En un pequeño ensayo no controlado de 30 pacientes con diabetes LADA se añadió saxagliptina al tratamiento con insulina a 15 de ellos. Al cabo de 12 meses los parámetros de función de célula beta fueron mejores que en el grupo control, sin encontrarse diferencias en el control glucémico (105). Se han encontrado resultados similares a los 2 años en un estudio exploratorio de los pacientes con autoinmunidad positiva (n=118) que participaron en un ensayo clínico en diabetes tipo 2, en el que se comparaba glimepirida con linagliptina (106). Recientemente, se ha publicado un análisis post-hoc de un ensayo clínico fase III en el que a los pacientes con diabetes tipo 2 (a los que se ha estudiado la presencia de GADA a posteriori) se les asignaba de manera aleatorizada saxagliptina o placebo durante 24 semanas. El fármaco fue eficaz y seguro (comparado con placebo) tanto en pacientes GADA + como GADA -, con mayor efecto hipoglucemiante en los pacientes con autoinmunidad positiva. La función de célula beta mejoró en ambos grupos (107).

8.3.5- ANÁLOGOS DEL PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGÓN TIPO 1 (GLP-1) :

En un análisis post-hoc de ensayos clínicos con el análogo GLP 1 dulaglutida en pacientes con diabetes tipo 2 los efectos hipoglucemiantes resultaron similares en los pacientes con GADA positivos y negativos (108) Sin embargo, la presencia de autoinmunidad pancreática positiva resultó ser un factor predisponente de mala respuesta

en un estudio prospectivo diseñado para evaluar predictores de respuesta a análogos de GLP1 (exenatida y liraglutida) en la vida real (109).

8.3.6- INHIBIDORES DEL COTRANSPORTADOR DE SODIO-GLUCOSA TIPO 2 (SGLT2):

En el momento actual no disponemos de datos en la literatura sobre el uso de estos fármacos en la diabetes LADA. Este grupo de fármacos incrementa el riesgo de padecer cetoacidosis diabética, especialmente en los pacientes con baja reserva insulínica y situaciones cetogénicas concomitantes. Dado que los pacientes con diabetes LADA presentan una menor secreción de insulina en general que los pacientes diabetes con tipo 2, se sugiere la determinación de GADA antes de iniciar el tratamiento. En el caso de que se confirmara la positividad para GADA, habría que evitar este tratamiento o bien monitorizar a los pacientes de una manera más estrecha (110).

En resumen, el conocimiento actual sobre el mejor abordaje terapéutico en estos pacientes es escaso e insuficiente para hacer cualquier tipo de recomendación. La evidencia actual apunta hacia la evitación del uso de sulfonilureas y la utilización de insulina como primera opción cuando el control no es bueno con metformina. Necesitamos estudios diseñados adecuadamente para comparar la eficacia de los distintos fármacos en la diabetes LADA. No hay estudios en los que se evalúen las complicaciones de la diabetes, la calidad de vida o el impacto económico con las diferentes terapias.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

La diabetes autoinmune latente del adulto es una entidad heterogénea, caracterizada por una destrucción autoinmune progresiva de la célula beta. Es, probablemente, el tipo de diabetes autoinmune más frecuente, pero aún existen grandes áreas de incertidumbre sobre ella, empezando incluso por el cuestionamiento de su propia existencia como una entidad clínica diferenciada.

No existen unas recomendaciones específicas para el diagnóstico de este tipo de diabetes mediante la determinación de auto-anticuerpos, y debido a su heterogeneidad clínica, en la mayoría de los casos los pacientes son diagnosticados erróneamente de diabetes tipo 2. Sin embargo, en la diabetes LADA el proceso de destrucción autoinmune de la célula beta tiene implicaciones en la historia natural de la enfermedad, su pronóstico y su tratamiento. Comparados con los pacientes con diabetes tipo 2, los pacientes con diabetes LADA tienen un perfil metabólico más favorable pero un control glucémico peor. No disponemos de datos sobre diabetes LADA en España.

Por ello, en los trabajos que integran la presente tesis doctoral se investigó la caracterización clínica, la capacidad de secreción de insulina, el perfil inflamatorio de bajo grado y la afectación cardiovascular preclínica en los pacientes con diabetes LADA, y se compararon todos estos aspectos con los de los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2.

HIPÓTESIS

La hipótesis de partida que nos propusimos era que los pacientes con diabetes LADA presentan unas características clínicas y metabólicas intermedias entre la diabetes tipo 1 clásica y la diabetes tipo 2, con una frecuencia de afectación cardiovascular preclínica similar a la de los otros dos grupos principales de diabetes.

Hipótesis 1: Los pacientes con diabetes LADA de Cataluña presentan un fenotipo intermedio entre los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2.

Hipótesis 2: Estos pacientes con diabetes LADA presentan una secreción de insulina intermedia entre la de los pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2.

Hipótesis 3: Estos sujetos con diabetes LADA presentan un grado de ateromatosis preclínica carotídea similar al de los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2.

Hipótesis 4: Los pacientes con diabetes LADA presentan un perfil inflamatorio de bajo grado intermedio entre el de los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los pacientes con diabetes autoinmune latente del adulto en Cataluña.

A continuación, se enuncian los objetivos específicos y el detalle de cada uno de ellos. Además, cada uno de ellos se numera de manera correspondiente a los enunciados de las hipótesis específicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1. Caracterizar clínica y metabólicamente los pacientes con diabetes LADA, y compararlos con pacientes con diabetes tipo 1 clásica de inicio en la edad adulta y pacientes con diabetes tipo 2 en términos de:**
 - 1.1. Parámetros de adiposidad.
 - 1.2. Factores de riesgo cardiovascular asociado.
 - 1.3. Parámetros de control glucémico.
 - 1.4. Tratamiento prescrito.
 - 1.5. Parámetros de función de célula beta.
 - 1.6. Perfil de auto-anticuerpos circulantes dirigidos contra antígenos de célula beta.

- 2. Caracterizar la función de célula beta de los pacientes con diabetes LADA mediante el estímulo de la secreción de insulina con un test estandarizado de comida mixta, y compararla con la de los pacientes con diabetes tipo 1 clásica de diagnóstico en la edad adulta y la de los pacientes con diabetes tipo 2.**
 - 2.1. Comparación de la concentración de péptido C estimulado en los pacientes con diabetes LADA con y sin tratamiento con insulina.
 - 2.2. Comparación global de la concentración de péptido C estimulado entre los tres tipos de diabetes.
 - 2.3. Comparación de la concentración de péptido C estimulado entre los tres tipos de diabetes en grupos estratificados por tiempo de evolución de la diabetes

- 3. Caracterizar la aterosclerosis preclínica en los pacientes con diabetes LADA sin enfermedad cardiovascular clínica, y compararla con los pacientes con diabetes tipo 1 y con pacientes con diabetes tipo 2.**
 - 3.1. Evaluar la presencia y extensión de placas de ateroma carotídeas en los tres grupos de pacientes.

- 3.2. Evaluar los factores asociados a la presencia de placas carotídeas.
- 4. Caracterizar la inflamación de bajo grado en pacientes con diabetes LADA, y compararla con la de los pacientes con diabetes tipo 1 clásica de diagnóstico en la edad adulta y con la de pacientes con diabetes tipo 2.**
- 4.1. Determinar las concentraciones circulantes de interleucina 6, proteína C reactiva ultra-sensible, fracción 2 del receptor soluble del factor de necrosis tumoral alfa, y el recuento de leucocitos totales. Comparación de los resultados entre los tres grupos de pacientes.
- 4.2. Correlacionar los perfiles de inflamación de bajo grado con otros parámetros de adiposidad y de riesgo cardiovascular.
- 4.3. Desarrollar un modelo de predicción del tipo de diabetes mediante la incorporación de los biomarcadores de inflamación de bajo grado a las variables clínicas y bioquímicas habituales.

RESULTADOS

ARTÍCULO 1

La diabetes autoinmune latente del adulto (LADA) se sitúa entre la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2: evidencia en adultos en una región de España.

Para caracterizar a los pacientes con diabetes LADA de nuestro entorno, diseñamos un estudio transversal en el que comparamos 82 pacientes con diabetes LADA, 78 pacientes con diabetes tipo 1, y 485 pacientes con diabetes tipo 2. Todos los pacientes se habían diagnosticado de diabetes después de los 30 años de edad, y entre 30 y 70 años. Aquellos pacientes que no recibían tratamiento con insulina tenían un tiempo de evolución de la diabetes menor a 5 años.

Este estudio fue la extensión a tres años de un estudio multicéntrico europeo previo. Todos los pacientes fueron reclutados en consultas especializadas de Endocrinología y Nutrición del *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* (Barcelona), y del *Hospital Universitari Arnau de Vilanova* (Lleida).

De todos los pacientes recogimos datos clínicos, y realizamos una extracción en ayunas para la determinación de parámetros de control glucémico y lipídico, y determinación de GADA mediante un *kit* comercial de ELISA. Se congelaron muestras de suero a -80°C para una posterior determinación de péptido C (mediante un ensayo de quimioluminiscencia), y también de IA-2A. Los IA-2A se determinaron en 75 pacientes con LADA y 68 pacientes con diabetes tipo 1 también con un *kit* comercial de ELISA.

Los tres grupos presentaron una distribución de sexos similar, pero los pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 2 tenían una mayor edad que los pacientes con diabetes tipo 1. Además, los pacientes con diabetes LADA tenían un mayor tiempo de evolución de la diabetes que los otros dos grupos. Los pacientes con diabetes LADA tenían un fenotipo intermedio entre los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 respecto a parámetros de adiposidad y de tensión arterial. Asimismo, los parámetros de dislipemia diabética (triglicéridos y colesterol HDL (cHDL)) seguían el mismo patrón intermedio entre ambos tipos de diabetes. La prevalencia de síndrome metabólico (NCEP ATP III) fue intermedia en los pacientes con diabetes LADA (37%) entre la de los pacientes con diabetes tipo 1 (15%) y diabetes tipo 2 (67%).

En los pacientes con diabetes LADA, las concentraciones de péptido C fueron también intermedias entre los pacientes con diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. En el análisis estratificado por duración de la diabetes (< 12 meses, 12-36 meses, > 36 meses), las concentraciones de péptido C en los pacientes con diabetes LADA se solapaban con las de los pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2, pero el número de pacientes incluidos en el segmento de mayor tiempo de evolución fue pequeño y dificultaba la interpretación de los resultados.

El control glucémico (HbA_{1c}) fue similar en los pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 1, y en ambos peor que en los pacientes con diabetes tipo 2. Los pacientes con diabetes LADA recibían más frecuentemente tratamiento con insulina (46%) que los pacientes con diabetes tipo 2 (19%). Ajustado por edad, peso y tiempo desde el diagnóstico, la tasa de riesgo instantáneo (*hazard ratio*) para recibir tratamiento con insulina de los pacientes diabetes LADA respecto a los pacientes con diabetes tipo 2 fue de 8,3.

Respecto a la autoinmunidad contra la célula beta, los pacientes con diabetes LADA presentaron con mayor frecuencia GADA positivos que los pacientes con diabetes tipo 1, sin encontrarse diferencias entre ambos grupos para los IA-2A. Los títulos de autoanticuerpos fueron similares entre ambos grupos. Encontramos una correlación negativa entre el título de GADA (distribuido en terciles) y las concentraciones de péptido C en los pacientes con diabetes LADA, pero no así en los pacientes con diabetes tipo 1.

En conclusión, los pacientes con diabetes LADA en nuestro entorno presentan un perfil metabólico intermedio entre el de los pacientes con diabetes tipo 1 clásica diagnosticada en la edad adulta y la diabetes mellitus tipo 2, con una frecuencia de síndrome metabólico intermedia entre ambos grupos de diabetes. Además, los pacientes con diabetes LADA tienen una función de célula beta basal menor, y un control glucémico peor, que los pacientes con diabetes tipo 2. La función de célula beta en los pacientes con diabetes LADA se correlaciona negativamente con los títulos de GADA.

Mollo A, Hernandez M, Marsal JR, Esquerda A, Rius F, Blanco-Vaca F, Verdaguer J, Pozzilli P, de Leiva A, Mauricio D; Action LADA 8. **Latent autoimmune diabetes in adults is perched between type 1 and type 2: evidence from adults in one region of Spain.** Diabetes Metab Res Rev. 2013;29:446-51. doi: 10.1002/dmrr.2411.

Erratum in: Diabetes Metab Res Rev. 2013 Nov;29(8):693. Action LADA 8 [added]; multiple investigator names added. Diabetes Metab Res Rev. 2018;34(5):e3017.

Addendum. [Diabetes Metab Res Rev. 2018]

ARTÍCULO 2

Secreción de insulina en pacientes con diabetes autoinmune latente del adulto (LADA): a medio camino entre la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. ACTION LADA 9

Para conocer la producción endógena de insulina de los pacientes con diabetes LADA y compararla con la de los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2, diseñamos un estudio transversal en el que incluimos pacientes con los tres tipos de diabetes, agrupados por tiempo de evolución de la enfermedad, con el objetivo de medirles el péptido C estimulado.

El objetivo era reclutar 10 pacientes con cada tipo de diabetes en cada uno de los siguientes grupos: 6-18 meses de evolución, 19 meses - 5 años de evolución, y 5 a 10 años de evolución. Los pacientes debían haber sido diagnosticados entre los 30 y 70 años de edad, y no tener insuficiencia renal u otras circunstancias que interfirieran en la medición de la secreción de péptido C. Los pacientes se reclutaron en las consultas especializadas de Endocrinología y Nutrición del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y del Hospital Universitari Arnau de Vilanova.

A todos los pacientes se les determinó la autoinmunidad pancreática (GADA e IA-2A) mediante kits comerciales de ELISA.

Para evaluar la capacidad de secreción de insulina de la célula beta se les administró, en ayunas, 6 ml/kg de una comida mixta de prueba (Boost HP, Nestle ®) según método estandarizado. Se extrajeron muestras sanguíneas para determinar el péptido C en los tiempos -5 min, 0, 10, 20, 30, 50, 90 y 120 minutos después de la ingesta. El péptido C se midió mediante quimioluminiscencia.

Finalmente, incluimos 32 pacientes con diabetes LADA, 33 con diabetes tipo 1 clásica, y 30 con diabetes tipo 2. No hubo diferencias entre los grupos en cuanto a edad, sexo o tiempo de evolución de la enfermedad. Como en el estudio previo (artículo 1), los pacientes con diabetes LADA tenían peor control glucémico que los pacientes con diabetes tipo 2, y recibían tratamiento con insulina en mayor número. No hubo diferencias en el control glucémico entre los pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 1 clásica.

La capacidad de secreción de la célula beta en los pacientes con diabetes LADA resultó ser intermedia entre la de los pacientes con diabetes tipo 1 (mayor) y diabetes tipo 2 (menor), expresada en términos de pico y de área bajo la curva de péptido C después de una comida de prueba. Esta diferencia persistió tras el ajuste por posibles variables de confusión como la glucemia, la HbA_{1c}, la edad, el sexo y el índice de masa corporal. En el análisis estratificado por grupos de tiempo de evolución de la diabetes, estas diferencias persistían, excepto en el grupo de menor duración de la diabetes: no se encontraron diferencias en los parámetros antes mencionados de péptido C en aquellos pacientes con

diabetes LADA y diabetes tipo 2 que tenían entre 6 y 18 meses de evolución de la enfermedad.

Los valores de péptido C estimulado en los pacientes con diabetes LADA tratados con insulina (n=20) fueron siempre menores que los de los pacientes con diabetes tipo 2 tratados con insulina (n=8), a pesar de tener una media de tiempo de evolución de la diabetes similar.

En conclusión, este es el primer estudio que compara la producción endógena estimulada de insulina por el método estándar recomendado para su estudio en pacientes con diabetes LADA, diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2. Además, los pacientes estaban apareados por tiempo de evolución de la enfermedad. Los resultados mostraron una capacidad de secreción de insulina en los pacientes diabetes LADA intermedia entre la de los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2, con excepción de los pacientes con diabetes LADA y tipo 2 de poco tiempo de evolución, que presentan una secreción similar.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Insulin secretion in patients with latent autoimmune diabetes (LADA): half way between type 1 and type 2 diabetes: action LADA 9

Marta Hernandez^{1,2†}, Angels Mollo^{3†}, Josep Ramon Marsal^{4,5,6}, Aureli Esquerda⁷, Ismael Capel^{8,9}, Manel Puig-Domingo¹⁰, Paolo Pozzilli^{11,12}, Alberto de Leiva^{8,9}, Didac Mauricio^{2,10*} and on behalf of the Action LADA consortium

Abstract

Background: The study of endogenous insulin secretion may provide relevant insight into the comparison of the natural history of adult onset latent autoimmune diabetes (LADA) with types 1 and 2 diabetes mellitus. The aim of this study was to compare the results of the C-peptide response to mixed-meal stimulation in LADA patients with different disease durations and subjects with type 2 and adult-onset type 1 diabetes.

Methods: Stimulated C-peptide secretion was assessed using the mixed-meal tolerance test in patients with LADA (n = 32), type 1 diabetes mellitus (n = 33) and type 2 diabetes mellitus (n = 30). All patients were 30 to 70 years old at disease onset. The duration of diabetes in all groups ranged from 6 months to 10 years. The recruitment strategy was predefined to include at least 10 subjects in the following 3 disease onset categories for each group: 6 to 18 months, 19 months to 5 years and 5 to 10 years.

Results: At all time-points of the mixed-meal tolerance test, patients with LADA had a lower stimulated C-peptide response than the type 2 diabetes group and a higher response than the type 1 diabetes group. The same results were found when the peak or area under the C-peptide curve was measured. When the results were stratified by time since disease onset, a similar pattern of residual insulin secretory capacity was observed.

Conclusions: The present study shows that the magnitude of stimulated insulin secretion in LADA is intermediate between that of type 1 and type 2 diabetes mellitus.

Keywords: Latent autoimmune diabetes in adults, Type 1 diabetes mellitus, Type 2 diabetes mellitus, Insulin secretion, C-peptide

Background

The increased frequency of insulin treatment in adult patients with latent autoimmune diabetes (LADA) is a result of an accelerated pancreatic beta-cell loss due to autoimmune damage [1]. The measurement of the endogenous insulin secretion may provide relevant insight into the comparison of the natural history of LADA with the natural histories of types 1 and 2 diabetes; however, limited data are available regarding fasting or stimulated

C-peptide secretion in LADA [2-8]. Stimulated C-peptide is currently accepted as the reference outcome for assessing beta-cell secretory response in trials studying the prevention of beta-cell loss in established autoimmune diabetes [9]. In addition, no studies have assessed the insulin secretory response using the standardised mixed-meal tolerance test (MMTT) in patients with LADA. Therefore, the aim of our study was to assess the stimulated C-peptide response in LADA patients with different disease durations and to compare the results to those of subjects with type 2 and adult-onset type 1 diabetes.

* Correspondence: didacmauricio@gmail.com

†Equal contributors

²Institut de Recerca Biomedica de Lleida, Universitat de Lleida, Lleida, Spain

¹⁰Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Univesitari Germans

Trias i Pujol, Carretera Canyet, S/N, 08916 Badalona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



Methods

Participants and clinical data

In this cross-sectional study, we enrolled 32 subjects with LADA, 33 subjects with type 1 and 30 subjects with type 2 diabetes mellitus. A total of 11 study subjects, 4 with LADA and 7 with type 1 diabetes, were recruited in Hospital de Sant Pau. All other subjects were included at Hospital Arnau de Vilanova. All study subjects were 30 – 70 years old at the time of diagnosis. Type 1 and type 2 diabetes mellitus were diagnosed according to the standard criteria as described previously [8], and LADA was defined as patients aged 30 – 70 years at the diagnosis of diabetes who did not require insulin for at least 6 months after diagnosis, with glutamic acid decarboxylase (GAD) autoantibody (GADAb) or tyrosine phosphatase autoantibody (IA-2Ab) positivity. The study was initially part of the Action LADA project that was extended locally for an additional period of 3 years [10]. The study protocol was designed to recruit 10 subjects in the following disease duration categories for each group: 6 – 18 months, 19 months – 5 years, and 5 – 10 years from diagnosis. This number of subjects was established based on previous studies that yielded clear differences when this sample size was used to compare LADA and type 2 diabetes [1,2]. Thus, at least 30 patients of each diabetes type were included. None of the subjects had impaired kidney function, liver disease or any other condition known to interfere with the C-peptide response. Patients were included consecutively after they signed a written informed consent document. The study protocol was approved by the local Ethics Committee of the two centers where patients were recruited, i.e. Hospital de Sant Pau (Barcelona) and Hospital Arnau de Vilanova (Lleida).

For each subject, age, sex, weight, height, body mass index, and disease duration were obtained as recently described [8]. The time to start of insulin was calculated as the time between the date of diagnosis and the date of the first insulin treatment. In addition, glucose and HbA1c levels were tested using standard laboratory assays. A detailed description of the methods was recently published [8].

Antibody measurements

Antibodies to islet cell antigens (GADA65 and IA-2) were measured with two commercially available ELISA kits: GAD65 Autoantibody ELISA and IA-2 Autoantibody ELISA (both from DRG Diagnostic, Marburg, Germany), as previously described [11,12]. Optimal cut-off values for positivity were set at 5 and 15 U/mL for GADAb and IA-2Ab, respectively. Both assays showed good performance when tested in the Diabetes Antibody Standardization Program Workshops. In the Diabetes Antibody Standardization Program Workshop 2007,

sensitivities and specificities were 94% and 97% for GADAb, respectively, and 66% and 95% for IA-2Ab; in the Diabetes Antibody Standardization Program Workshop 2009, the figures were 82% and 95% for GADAb, and 60% and 100% for IA-2Ab, respectively.

Mixed meal tolerance test

The test was performed following the same procedures as those described in the European C-Peptide Trial in which our group participated [13]. Briefly, after an overnight fasting period, all study subjects were scheduled to start the test before 10 a.m. the next morning. Subjects were asked to withhold any short-acting insulin for at least 6 hours before the test. The standard meal consisted of 6 ml/kg of a Boost HP drink (Nestle Nutrition, Vevey, Switzerland); the subjects were given up to 360 ml for up to 5 minutes. C-peptide samples were collected at times –5 and 0 minutes before (the mean of these two values was taken as the fasting concentration), and 10, 20, 30, 60, 90 and 120 minutes after the final intake of the mixed-meal.

C-peptide was measured by a chemiluminescence assay (Immulite 2000, Siemens Medical Solutions Diagnostics, LA, USA), with reference values of 0.30 – 2.4 nmol/l (intra and interassay coefficients of variation were less than 5%). The lower detection limit was 0.03 nmol/l. Any value below the lower detection limit was arbitrarily assigned a concentration of 0.029 nmol/l.

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as the mean (\pm SD) or the median (interquartile range (IQR)) where appropriate. Categorical variables are described using the absolute and relative frequencies. Variables with a skewed distribution were log-transformed before analysis. Comparisons between groups were performed using the non-parametric Mann–Whitney *U* test for numerical variables and the χ^2 test for percentages. The area under the curve of C-peptide (AUCCP) was computed from all timed collections using the trapezoidal rule [9]. The analyses of the AUCCP and peak C-peptide were adjusted for sex, body mass index, age, duration of diabetes, fasting glucose, HbA1c and basal C-peptide. The results were considered to be statistically significant if the two-sided p-value was less than 0.05. All analyses were performed with SPSS for Windows version 15.0 (Chicago, USA).

Results

The clinical characteristics of the study groups are shown in Table 1. There were no differences in terms of age, sex distribution and disease duration among the 3 study groups. As already found in previous studies in our setting [8], type 2 diabetic subjects demonstrated better glycemic control than patients with LADA and

Table 1 Clinical characteristics and C-peptide stimulated secretion of the 3 study groups

	Type 1 diabetes	Type 2 diabetes	LADA	p ^a	p ^b
Women, n (%)	17 (51.5%)	9 (30%)	11 (34.4%)	0.166	0.715
Age, years	46.9 (10.6)	53.7 (12.9)	49.6 (10.6)	0.170	0.260
Disease duration, months ^c	31 [12–56]	31 (10 – 83)	38.5 [13.5 – 59]	0.618	0.897
BMI, kg/m ²	24.7 (4.2)	30.1 (5.5)	27.9 (4.8)	0.004	0.110
Fasting glucose, mmol/l	9.0 (3.49)	7.44 (1.92)	8.84 (3.45)	0.929	0.147
HbA1c, %	7.5 (1.4)	6.9 (1.0)	8.3 (2.4)	0.265	0.012
HbA1c, mmol/mol	58.4 (15.5)	52.2 (11.4)	67.6 (26.7)		
Insulin treatment, n (%)	33 (100%)	8 (26.7%)	20 (62.5%)	<0.001	0.005
Sulphonylurea treatment, n (%)	-	8 (20%)	5 (15.6%)	-	0.652
Categories, n				0.867	0.765
6 – 18 m	10	10	10		
19 m – 5 years	12	10	10		
5 – 10 years	11	10	12		
AUC C-peptide, nmol/l ^d	41.3 (46.4)	275.5 (121.2)	140.8 (102.2)	<0.001	<0.001
	19.2 (16.8 – 54.9)	245.1 (182.6 – 370.8)	112.1 (54.6 – 231.2)		
Peak C-peptide, nmol/l ^{c,d}	0.45 (0.50)	3.01 (1.29)	1.50 (1.05)	<0.001	<0.001
	0.16 (0.16 – 0.60)	2.54 (2.18 – 3.67)	1.44 (0.68 – 2.32)		

^ap value for comparisons between type 1 diabetes and LADA; ^bp value for comparison between type 2 diabetes and LADA; ^cdistributed variables; ^dpeak and AUC C-peptide results are given as mean (SD) and also as median (IQR).

type 1 diabetes. In addition, the frequency of insulin treatment was higher in LADA subjects than in type 2 diabetic subjects.

Concerning treatment of hyperglycemia, insulin treatment was more frequent in LADA than in type 2 diabetes (62.5% vs. 26.7; $p = 0.005$) (Table 1). The distribution of the number of insulin-treated type 2 diabetic subjects according to disease duration was 2, 3 and 3 in categories 6 – 18 months, 19 months – 5 years, and 5 – 10 years, respectively. The corresponding distribution of insulin treatment in patients with LADA was 5, 6 and 9 in disease duration categories 6 – 18 months, 19 months – 5 years, and 5 – 10 years, respectively. The frequency of sulphonylurea drug use was similar in patients with type 2 diabetes and LADA (not significantly different). Six type 2 diabetic subjects were under sulphonylureas, all with a disease duration longer than 5 years. Five patients with LADA were under sulphonylurea treatment (3 in the disease duration category 19 months – 5 years, and 2 in the duration category 5 – 10 years). Only one patient with LADA was treated with sitagliptin, without any other study subjects treated with a dipeptidylpeptidase – 4 inhibitor.

Subjects with LADA showed a capacity of stimulated C-peptide secretion that is intermediate between types 1 and 2 diabetic patients, both in terms of the peak secretion and the AUCPP (Table 1). In LADA, these measures of insulin secretion were significantly lower than in type 2 diabetic subjects and significantly higher than in type 1 subjects. These differences remained unchanged after

adjusting for other confounding variables as age, sex, body mass index, HbA1c and glucose. This lower residual insulin secretion capacity was also confirmed when subjects were stratified by disease duration (Figure 1, and Additional files 1 and 2). Detailed results for AUCPP and peak C-peptide secretion according to disease duration are shown in Additional files 1 and 2. Most measures of C-peptide secretion were significantly different between patients with LADA and those with type 1 or type 2 diabetes; the only exception was the comparison between the sub-analysis of the peak C-peptide and AUCPP of LADA and type 2 diabetes in subjects with shorter diabetes duration (6 to 18 months).

Concerning the stimulated C-peptide in insulin-treated patients, those with LADA showed a lower response that was lower than that of type 2 diabetic subjects. Patients with LADA showed an AUCPP (102.4 ± 112.3 nmol/l) and peak C-peptide (1.25 ± 1.08 nmol/l) that were below those of type 2 diabetes patients (AUCPP: 200.1 ± 91.7 nmol/l; peak C-peptide: 2.23 ± 0.85 nmol/l) ($p = 0.043$ and $p = 0.038$, respectively). This finding is specially relevant considering that the disease duration of this 2 sub-groups of insulin-treated patients is not different (type 2 diabetes: 45.6 ± 42.8 months; LADA: 46 ± 32.2 months). Concerning non-insulin treated patients, those with LADA also had a lower C-peptide response, with an AUCPP (174.7 ± 74.8 nmol/l) and peak C-peptide (1.92 ± 0.87 nmol/l) in comparison with type 2 diabetic patients (AUCPP: 302.9 ± 120.5 nmol/l; peak

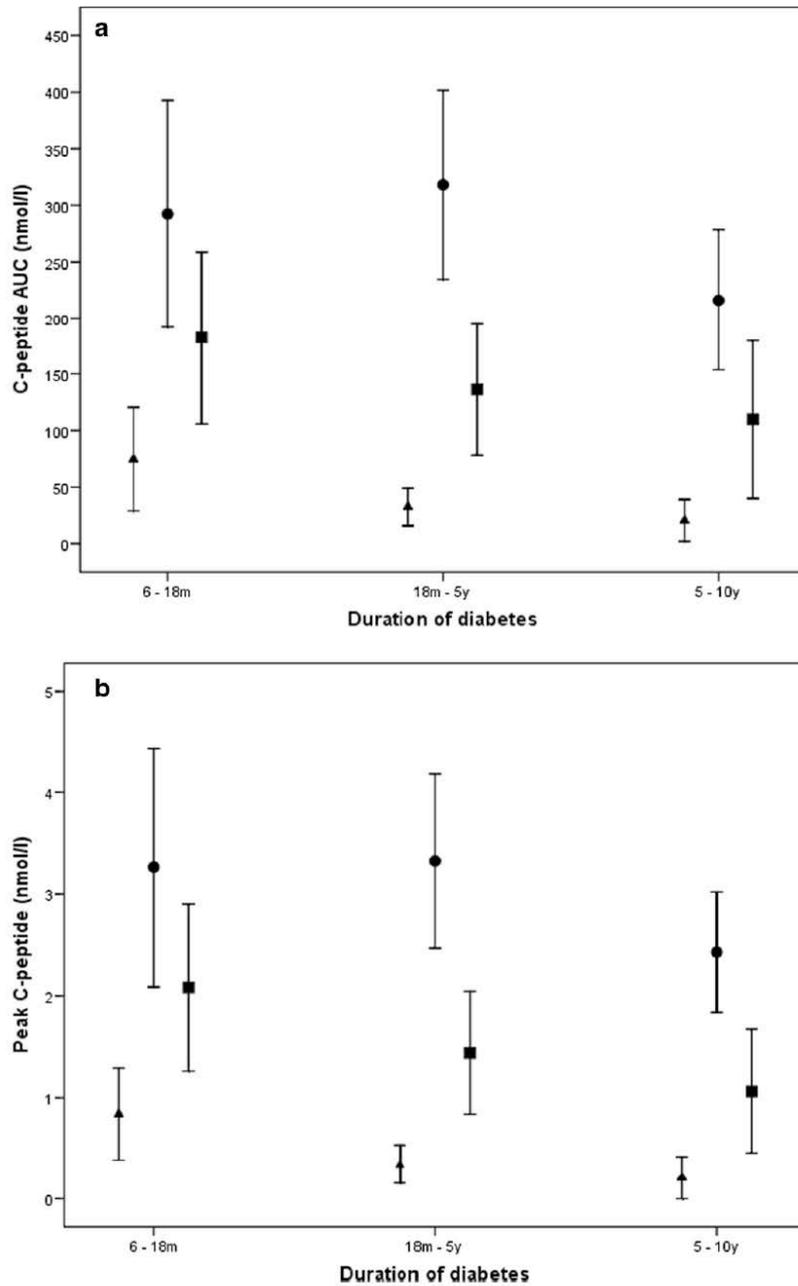


Figure 1 The results of the mixed-meal tolerance test (panel a: area under the curve; panel b: peak C-peptide) of the different study groups (33 with type 2, 32 with LADA and 30 with type 2 diabetes), stratified according to the duration of diabetes mellitus.

Footnote: Triangles, circles and squares denote mean values with 95% CI of C-peptide in type 1 diabetes, type 2 diabetes and LADA, respectively. The differences between LADA and type 1 and type 2 diabetes are statistically significant except for the comparison of the peak and AUCCP of LADA and type 2 diabetes in subjects with a shorter diabetes duration (6 to 18 months). The number of patients treated with insulin was 8 in the group of type 2 diabetes and 20 in the group of LADA. For further details, see Table 1, and Additional files 1 and 2.

C-peptide: 3.29 ± 1.32 nmol/l) ($p = 0.002$ and $p = 0.001$, respectively).

Discussion

The current findings clearly show that subjects with LADA, as defined in the Action LADA, have a different capacity of meal-stimulated insulin secretion at different disease stages. This is the first study to use the standardised MMTT to assess the residual stimulated insulin secretion in LADA patients based on different periods of disease duration.

The current findings are consistent with some previous studies in the literature. The fasting C-peptide results are similar to the values found in previous studies [3,4,6,8]. The current differences in fasting C-peptide confirm our previous findings in a larger population sample [8]. Also, the results show a consistent lower stimulated C-peptide secretion in those patients with LADA with or without insulin-treatment with respect to the respective counterparts with type 2 diabetes. Hosszúfalusi et al. also described the same initial pattern of differences with type 1 and type 2 diabetes; however, C-peptide secretion in patients with longer-duration LADA overlapped with the values for type 2 diabetic patients. In addition, over 6 years of follow-up, two prospective cohort studies with subjects of Asian origin consistently showed a more rapid loss of insulin secretion in LADA, measured as fasting C-peptide, than in type 2 diabetes [4,6].

However, the most relevant information concerning residual insulin secretion in patients with LADA comes from Swedish studies. A study by Carlsson et al. demonstrated a decreased glucagon- and arginine-stimulated C-peptide secretion in a small group of LADA patients when compared to antibody-negative type 2 diabetic subjects [2]. Previously, the most relevant follow-up data of stimulated insulin secretion were described in sub-studies of a Swedish cohort of type 2 diabetic subjects [1]. In this group glucose- and glucagon-stimulated insulin secretion were clearly different in autoimmune diabetes when compared to antibody negative type 2 diabetic patients up to 3 years after diagnosis. A comparison with type 1 diabetic subjects demonstrated improved insulin secretion in LADA that subsequently disappeared after 1 year of follow-up. In addition, data from a recent Swedish intervention study showed that during 36 months of follow-up, the glucagon stimulated C-peptide response decreased in patients with conventionally treated LADA [7].

The main limitation of this study is its cross-sectional design. Ideally, the characterisation of the natural history of insulin secretion in LADA subjects would be analysed in prospective follow-up studies. Based on the results of the current study, a prospective characterisation of the

time-course of the loss of the insulin secretory capacity and the comparison with other diabetes types would require a multi-centre study with long-term follow-up. Another limitation is the number of subjects studied; however, this is the first study to use the reference MMTT method to compare the stimulated C-peptide response in LADA to the responses in types 1 and 2 diabetes on different stages of disease duration.

Conclusions

The present study shows that the stimulated insulin secretion capacity in LADA is intermediate between that of types 1 and 2 diabetes. This finding provides new data and further contributes to the characterisation of the natural history of LADA.

In addition, the study results may be helpful for future intervention trials aimed at preserving the residual insulin secretory capacity in subjects with autoimmune diabetes. Potential future prevention trials should be designed accordingly.

Additional files

Additional file 1: Results of the mixed-meal tolerance test: area under the curve C-peptide (nmol/l) of the different study groups stratified according to the duration of diabetes mellitus.

Additional file 2: Results of the mixed-meal tolerance test: peak C-peptide (nmol/l) of the different study groups stratified according to the duration of diabetes mellitus.

Abbreviations

AUCCP: Area under the curve C-peptide; GADAb: Glutamic acid decarboxylase autoantibody; IA-2Ab: Tyrosine phosphatase autoantibody; IQR: Interquartile range; LADA: Latent autoimmune diabetes in adults; MMTT: Mixed-meal tolerance test.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

DM designed the study. MH, AM, AE, IC, JRE and DM collected the data. MH, AM, AE, and DM analysed data for the study. All authors contributed to the interpretation of the data. MH and DM drafted the manuscript. All authors critically reviewed and edited the manuscript. All authors gave their final approval of the version to be published.

Authors' information

Members of the Action LADA Group:
Professor Richard David Leslie, Dr Mohammed I Hawa, Blizzard Institute, Queen Mary University of London, London, UK
Professor Paolo Pozzilli MD, University Campus Bio-Medico, Rome.
Professor Rhys Williams MD, Dr Sinead Brophy PhD Swansea University, Swansea.
Professor Henning Beck-Nielsen MD and Dr Knud Yderstraede MD, University Hospital of Odense, Odense.
Dr Steven Hunter, MD and Professor David Hadden MD, Royal Victoria Hospital, Belfast.
Professor Raffaella Buzzetti MD, University La Sapienza, University of Rome.
Professor Werner Scherbaum MD and Professor Hubert Kolb, PhD, University of Düsseldorf, Düsseldorf.
Dr Nanette C. Schloot, MD German Diabetes Centre, University of Düsseldorf, Düsseldorf and Clinic for Metabolic Diseases at University Hospital

Düsseldorf. N.Schloot is on leave of absence from the German Diabetes Center and is currently employed by Lilly Deutschland, Bad Homburg, Germany. Dr Jochen Seissler, MD, Ludwig-Maximilians-University, Munich. Professor Guntram Schernthaner MD, Rudolfstiftung Hospital, Vienna. Professor Jaakko Tuomilehto MD and Dr Cinzia Sarti MD, National Institute for Health and Welfare, Helsinki. Professor Alberto De Leiva PhD, and Dr Eulalia Bruges MSc Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. Dr Didac Mauricio MD, University Hospital Germans Trias Pujol, Badalona, Spain. Professor Charles Thivolet, MD, Hôpital Edouard Herriot, Lyon.

Acknowledgments

We would like to thank the following staff members of the centres involved in the study: Anna Ramirez and Jose Rodríguez-Espinosa (Hospital de Sant Pau) and Nuria Garcia and Esther Rubinat (Hospital Arnau de Vilanova). We would also like to thank Pilar Garcia-Lorda from Nestle Nutrition in Spain for kindly providing the Boost HP. Marta Hernandez is a PhD student of the PhD Programme of the Autonomous University of Barcelona ("Doctorat en Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona"). This study was funded by a grant from Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (Project FIS 061 104). The Action LADA project was funded by the 5th Framework Programme of the European Union and Develogen.

Author details

¹Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain. ²Institut de Recerca Biomedica de Lleida, Universitat de Lleida, Lleida, Spain. ³Centre d'Atenció Primària de Cervera, Institut Català de la Salut, Lleida, Spain. ⁴Unitat de Suport a la Recerca de Lleida, Institut Universitari d'Investigació en Atenció Primària Jordi Gol, Lleida, Spain. ⁵Unidad de Epidemiología, Servicio de Cardiología, Hospital Universitari Vall Hebrón, Barcelona, Spain. ⁶Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain. ⁷Clinical Laboratory, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain. ⁸Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sant Pau - IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain. ⁹CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, Barcelona, Spain. ¹⁰Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera Canyet, S/N, 08916 Badalona, Spain. ¹¹Department of Endocrinology and Diabetes, University Campus Bio-Medico, Rome, Italy. ¹²Centre of Diabetes, Barts and the London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK.

Received: 9 March 2014 Accepted: 5 January 2015

Published: 9 January 2015

References

1. Stenström G, Gottsäter A, Bakhtadze E, Berger B, Sundkvist G. Latent autoimmune diabetes in adults. Definition, prevalence, β -cell function, and treatment. *Diabetes*. 2005;54(Suppl2):S68–72.
2. Carlsson A, Sundqvist G, Groop L, Tuomi T. Insulin and glucagon secretion in patients with slowly progressing autoimmune diabetes (LADA). *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:76–80.
3. Hosszúfalusi N, Vátay A, Rajczy K, Prohászka Z, Pozsonyi E, Horváth L, et al. Similar genetic features and different islet cell autoantibody pattern of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) compared with adult-onset type 1 diabetes with rapid progression. *Diabetes Care*. 2003;26:452–7.
4. Yang L, Zhou Z-G, Huang G, Ouyang L-L, Li X, Yan X. Six-year follow-up of pancreatic β -cell function in adults with latent autoimmune diabetes. *World J Gastroenterol*. 2005;11:2900–5.
5. Chaillous L, Bouhanick B, Kerlan V, Mathieu E, Lecomte P, Duduzeau PH, et al. Clinical and metabolic characteristics of patients with latent autoimmune diabetes in adults (LADA): absence of rapid beta-cell loss in patients with tight metabolic control. *Diabetes Metab*. 2010;36:64–70. doi:10.1016/j.diabet.2009.07.004.
6. Lee SA, Lee WJ, Kim EH, Yu JH, Jung CH, Koh EH, et al. Progression to insulin deficiency in Korean patients with type 2 diabetes mellitus positive for anti-GAD antibody. *Diabet Med*. 2011;28:319–24. doi:10.1111/j.1464-5491.2010.03186.x.
7. Thunander M, Thorgeirsson H, Törn C, Pettersson C, Landin-Olsson M. β -cell function and metabolic control in latent autoimmune diabetes in adults

with early insulin versus conventional treatment: a 3-year follow-up. *Eur J Endocrinol*. 2011;164:239–45. doi:10.1530/EJE-10-0901.

8. Mollo A, Hernandez M, Marsal JR, Esquerda A, Rius F, Blanco-Vaca F, et al. Latent autoimmune diabetes (LADA) is perched between type 1 and type 2: evidence from adults in one region of Spain. *Diab Metab Res Rev*. 2013;29:693. doi:10.1002/dmrr.2411.
9. Greenbaum CJ, Harrison LC. Guidelines for intervention trials in subjects with newly diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes*. 2003;52:1059–65.
10. Brophy S, Yderstraede K, Mauricio D, Hunter S, Hawa M, Pozzilli P, et al. Time to insulin initiation cannot be used in defining latent autoimmune diabetes of the adult. *Diabetes Care*. 2008;31:439–41.
11. Palomer X, Mauricio D, Rodríguez-Espinosa J, Zapico E, Mayoral C, González-Sastre F, et al. Evaluation of two nonisotopic immunoassays for determination of glutamic acid decarboxylase and tyrosine phosphatase autoantibodies in serum. *Clin Chem*. 2004;50:1378–82.
12. Chen S, Willis J, Maclean C, Ananieva-Jordanova R, Amoroso MA, Brooking H, et al. Sensitive non-isotopic assays for autoantibodies to IA-2 and to a combination of both IA-2 and GAD65. *Clin Chim Acta*. 2005;357:74–83.
13. Greenbaum CJ, Mandrup-Poulsen T, McGee PF, Battelino T, Haastert B, Ludvigsson J, et al. Mixed-meal tolerance test versus glucagon stimulation test for the assessment of beta-cell function in therapeutic trials in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2008;31:1966–71.

doi:10.1186/1472-6823-15-1

Cite this article as: Hernandez et al.: Insulin secretion in patients with latent autoimmune diabetes (LADA): half way between type 1 and type 2 diabetes: action LADA 9. *BMC Endocrine Disorders* 2015 15:1.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ARTÍCULO 3

Aterosclerosis preclínica en pacientes con diabetes
autoinmune latente del adulto (LADA), diabetes tipo 2 y
diabetes tipo 1 clásica

El objetivo de este trabajo fue comparar la frecuencia de aterosclerosis preclínica (ateromatosis carotídea) en pacientes con diabetes LADA, diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2.

Para ello, diseñamos un estudio transversal en el que incluimos a todos los pacientes con diabetes LADA controlados en consultas externas del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida que no tenían enfermedad clínica cardiovascular (cardiopatía isquémica coronaria, enfermedad vascular cerebral y arteriopatía ocluyente), ni nefropatía diabética establecida (definida como cociente albúmina/creatinina mayor de 300 mg/g y/o filtrado glomerular estimado < 60 ml/min).

Los pacientes con diabetes tipo 2, con iguales criterios de inclusión que los del grupo con diabetes LADA, fueron seleccionados apareados por edad y sexo con una proporción de 3:1. El tamaño muestral se basó en resultados previos de estudios previos del grupo de investigación en diabetes tipo 2. Los pacientes provenían de las consultas de cribado de retinopatía diabética en población general con diabetes tipo 2 en el área sanitaria de Lleida. Todos los pacientes con diabetes tipo 2 tenían GADA (-).

Los pacientes con diabetes tipo 1 clásica, con iguales criterios de inclusión, se seleccionaron apareados en proporción 2:1 por edad y sexo en las consultas especializadas de diabetes del Hospital Universitari Arnau de Vilanova (Lleida), y Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona).

De todos los pacientes, se recogieron variables clínicas. Se catalogó como dislipemia o hipertensión si los pacientes recibían tratamiento farmacológico para estas dos entidades, respectivamente. Se realizó una analítica sanguínea en ayunas, y una recogida de la primera micción matutina.

A todos los pacientes se les realizó una ecografía carotídea de alta resolución en modo B con el mismo ecógrafo, de manera no enmascarada, y realizadas por dos exploradores. Se evaluaron de manera bilateral la carótida común, carótida interna y carótida externa. Se midió el grosor íntima-media, y se catalogó como presencia de placa cuando éste era >1.5 mm, y protuía en la luz arterial. Se definió múltiples placas como presencia de placa en más de uno de los seis territorios explorados.

Finalmente, incluimos 71 pacientes con LADA, 191 pacientes con diabetes tipo 2, y 116 pacientes con diabetes tipo 1. Los pacientes tenían la misma distribución de edad y sexo, tabaquismo, HbA_{1c} e hipertensión arterial. La duración de la diabetes fue mayor en los pacientes con diabetes tipo 1 que en los LADA, y en éstos mayor que en la diabetes tipo

2. Los pacientes con diabetes tipo 2 presentaron un fenotipo más desfavorable de adiposidad y perfil lipídico. Los pacientes con diabetes tipo 1 tenían mayor frecuencia de retinopatía diabética, pero la frecuencia de microalbuminuria fue similar entre los tres grupos.

La frecuencia de placa ateromatosa carotídea fue mayor en los pacientes con diabetes LADA que en los pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2 (73,2% versus 57,1 y 56,9%, respectivamente). También lo fue la presencia de múltiples placas (45,1% versus 33,6% y 27,2%, respectivamente). En el modelo multivariable de regresión logística la edad, el tipo de diabetes (diabetes LADA), el tabaquismo y la hipertensión arterial fueron las variables relacionadas con la presencia de placa.

Para evaluar la influencia del tiempo de evolución de la diabetes en la presencia de placas carotídeas comparamos a los pacientes con diabetes tipo 2 y diabetes LADA, divididos en terciles de tiempo de evolución. No incluimos a los pacientes con diabetes tipo 1 puesto que por el diseño de estudio (pacientes apareados por edad) había muy pocos pacientes con poco tiempo de evolución. En el primer tercil, la presencia de placa carotídea fue inferior aunque no de manera estadísticamente significativa en los pacientes con LADA que en los pacientes con diabetes tipo 2. Sin embargo, en los siguientes terciles la frecuencia de placa se mantuvo estable en los pacientes con diabetes tipo 2, y aumentó considerablemente en el grupo con diabetes LADA.

En resumen, este es el primer trabajo diseñado para evaluar la enfermedad ateromatosa preclínica en pacientes con diabetes LADA y compararla con la de los pacientes con diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2 provenientes de una población homogénea. Los resultados muestran sorprendentemente una mayor prevalencia en los pacientes con diabetes LADA, a pesar de que los pacientes con diabetes tipo 2 presentan un fenotipo de adiposidad y lipídico más desfavorable. La enfermedad ateromatosa en los pacientes con diabetes LADA es, además, más extensa.

Según los resultados obtenidos, el tiempo de evolución de la diabetes juega un papel desfavorable en el desarrollo de la aterosclerosis en la diabetes LADA, y no así en la diabetes tipo 2; ello, unido a la fisiopatología de la enfermedad, nos hace pensar que la exposición a una mayor carga de hiperglucemia (en niveles mayores y en tiempo de exposición) juega un papel predominante en el desarrollo de la ateromatosis carotídea en estos pacientes.

ORIGINAL INVESTIGATION

Open Access



Preclinical carotid atherosclerosis in patients with latent autoimmune diabetes in adults (LADA), type 2 diabetes and classical type 1 diabetes

Marta Hernández^{1,2,3} , Carolina López^{2,3}, Jordi Real^{4,5}, Joan Valls^{3,6}, Emilio Ortega-Martinez de Victoria⁷, Federico Vázquez⁸, Esther Rubinat², Minerva Granado-Casas^{2,8}, Nuria Alonso⁸, Teresa Molí⁹, Angels Betriu^{3,9}, Albert Lecube^{1,2,3}, Elvira Fernández⁹, Richard David Leslie¹⁰ and Dídac Mauricio^{3,8*}

Abstract

Background: LADA is probably the most prevalent form of autoimmune diabetes. Nevertheless, there are few data about cardiovascular disease in this group of patients. The aim of this study was to investigate the frequency of carotid atherosclerotic plaques in patients with LADA as compared with patients with classic type 1 diabetes and type 2 diabetes.

Methods: Patients with LADA were matched for age and gender in different proportions to patients with type 2 diabetes, and classic type 1 diabetes. None of the patients had clinical cardiovascular disease. All subjects underwent B-mode carotid ultrasound to detect atheroma plaques. Demographics were obtained from all subjects.

Results: We included 71 patients with LADA, 191 patients with type 2 diabetes and 116 patients with type 1 diabetes. Carotid atherosclerosis was more frequent in patients with LADA compared with type 2 diabetes (73.2% vs. 56.9%, $P = 0.0018$) and classic type 1 diabetes (57.1%, $P = 0.026$); these changes occurred despite healthier macrovascular risk profiles in the former. Age ($P < 0.001$), smoking ($P = 0.003$) and hypertension ($P = 0.019$) were independently associated with carotid atherosclerosis. Multiple plaques were also more frequent in patients with LADA as compared with classic type 1 diabetes and type 2 diabetes (45.1% and 33.6% vs. 27.2%, respectively, $P = 0.022$). The frequency of carotid plaques increased with increasing diabetes duration in LADA patients compared with type 2 diabetes (85.7% vs. 58.8%, inverse OR 5.72 [1.5–21.8]; $P = 0.009$).

Conclusions: LADA patients do not present with less carotid atherosclerosis than patients with type 1 and type 2 diabetes. Their macrovascular risk occurs despite a healthier macrovascular risk profile than those patients with type 2 diabetes.

Keywords: Carotid plaque, Atherosclerosis, Late onset autoimmune diabetes, LADA, Type 1 diabetes, Type 2 diabetes

Background

Macrovascular disease is the leading cause of morbidity and mortality in patients with both type 1 diabetes and

type 2 diabetes [1]. Latent autoimmune diabetes of the adults (LADA), that is patients with adult-onset autoimmune diabetes who do not initially require insulin, represent 4–14% of subjects previously diagnosed with type 2 diabetes [2]. LADA can be estimated to have a higher prevalence than classic type 1 diabetes in both children and adults. Notwithstanding its clinical relevance, data about cardiovascular events and mortality in patients with LADA are limited. It could be anticipated that

*Correspondence: didacmauricio@gmail.com

⁸ Department of Endocrinology and Nutrition, CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases, Health Sciences Research Institute & University Hospital Germans Trias i Pujol, Carretera Canyet S/N, Badalona 08916, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2017. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

patients with LADA would be less likely to develop macrovascular disease than patients with type 2 diabetes, as they have a reduced risk of metabolic syndrome [3–5]. However, most studies to date, despite their limited size, population heterogeneity and variable disease duration, have failed to show such a reduced risk, and indeed many find an increased risk [6–9].

Preclinical atherosclerosis can be detected and quantified non-invasively by carotid ultrasound, which is a strong predictor of cardiovascular events [10–16]. Although there is still controversy in this field, established carotid atherosclerosis (carotid plaques), detected by ultrasound imaging, improves risk stratification when added to traditional risk factors. Indeed, individuals with carotid plaques are considered a very-high risk category according to the most recent guidelines, and carotid artery plaque assessment using ultrasonography may be considered to be a valid risk modifier in cardiovascular prediction [17–19]. Patients with diabetes mellitus are at high risk of cardiovascular events; therefore, the added potential of carotid plaque detection in risk assessment would be different from those cases without diabetes [20–22]. However, primary prevention targets are often not reached in patients with diabetes, and carotid plaque detection could focus more intensive preventive strategies in these cases, especially in those patients without known organ damage or important associated cardiovascular risk factors [18, 19, 23].

The current study was initially designed to assess the difference in preclinical carotid plaque burden in patients with LADA, as compared to type 2 diabetes. After the results of the initial study, we extended the comparison to age and gender matched patients with classic onset type 1 diabetes.

Methods

This was a cross-sectional study to evaluate carotid atherosclerotic disease in patients with LADA in comparison with patients with type 2 diabetes and classic onset type 1 diabetes.

Study subjects

All adult patients attending local diabetes outpatient clinics in the province of Lleida, Spain, who were screened for diabetes-associated autoantibodies and defined as LADA if they had diabetes diagnosed over 30 years of age, with positive glutamic acid decarboxylase (GAD) antibodies and without need of insulin treatment in the first 6 months after diagnosis [24]. From this cohort of 80 LADA patients, we invited all the patients that fulfilled the inclusion criteria ($n = 71$, acceptance rate: 100%): absence of clinical cardiovascular disease and without established diabetic nephropathy

[urine albumin-to-creatinine ratio (UACR) < 300 mg/g and estimated (MDRD4) glomerular filtration rate (eGFR) > 60 ml/min/1.73 m²].

Age- and sex-matched subjects with type 2 diabetes were randomly selected to a 3:1 proportion and for classic onset type 1 diabetes on a 2:1 proportion from the same local cohort using the same cardiovascular and renal inclusion criteria. All patients selected with type 2 diabetes were negative for GAD antibodies.

The absence of clinical macrovascular disease in all subjects was confirmed by clinical assessment and review of patients' medical records to verify absence of heart failure, cerebrovascular disease, coronary heart disease, or peripheral arterial disease (all of them clinically assessed, including any form of diabetic foot disease).

All the participants signed an informed consent form and the Ethics Committee of both participant centers approved the study.

Clinical assessment

For each subject, age, sex, weight, height, body mass index and waist circumference were measured by standardized methods. Blood pressure (mean of 2 measurements 5 min apart) was measured using a blood pressure monitor (HEM-7001E, Omron, Spain) after 10 min in the seated position. Patients were specifically interviewed about the treatment of diabetes and smoking habit. Former smokers were those who had quit at least for 1 year before enrollment. A patient was arbitrarily considered to have previous hypertension or dyslipidemia if she/he was taking medication for the given condition.

Fasting blood and urine samples were collected and analyzed locally, using standardized assays to measure glucose, glycosylated haemoglobin, the lipid profile [including high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and triglycerides] creatinine and the albumin-to-creatinine ratio. Glomerular filtration rate was estimated by the modification of diet in renal disease formula (MDRD4). GAD antibodies were measured with a commercially available ELISA kit (DRG Diagnostic, Marburg, Germany), as previously described [25]. Optimal cut-off value for positivity was set at 5 U/ml. The assay showed good performance when tested in the Diabetes Antibody Standardization Program (DASP) Workshops. In DASP 2007, sensitivities and specificities for GAD antibodies were 94 and 97% and in DASP 2009 were 82 and 95%, respectively.

Carotid ultrasound imaging

All the study participants underwent the same carotid ultrasound protocol. Carotid ultrasound imaging was performed using a high resolution B-mode ultrasound (Sequoia 512, Siemens, North Rhine-Westphalia,

Germany) equipped with a 15-Mhz linear array probe. A standardized imaging protocol was performed to evaluate intima-media-adventitia thickness (IMT) as has been described before [26]. The analysis of the presence of atheromatous plaques was performed indistinctly by two readers in a non-blinded fashion. Plaques were identified using B-mode and color Doppler examinations in both the longitudinal and transverse planes to consider circumferential asymmetry. Plaques were defined according to the Mannheim consensus [27]. We examined bilateral carotid arteries (common, bifurcation and internal) to evaluate the presence of plaques. Subclinical carotid atherosclerosis was defined as the presence of at least one plaque in any of the carotid territories explored. The presence of multiple plaques, defined by the presence of plaques in more than one of the explored territories, was considered to reflect more severe atherosclerotic disease [28, 29].

Sample size

For the comparison of LADA and classic type 1 diabetes with type 2 diabetes, we hypothesized a carotid plaque frequency of 50% for the former two and 70%, for the latter; the latter was based on the known frequency in our local cohort, and the former on a presumed reduced frequency. We calculated that with LADA ($n = 62$) and type 2 diabetes ($n = 186$) we would have 80% power, at $P < 0.05$ to detect differences. Using the 2:1 proportion for classic type 1 diabetes we calculated a minimum sample size of 104 subjects (80% power, $P < 0.05$).

Statistical analysis

A comparison of the characteristics between groups was performed expressing the quantitative variables as mean and standard deviation, and qualitative variables as frequencies and percentages. The statistical significance of differences between groups was assessed using the Chi square test for comparison of proportions, and analysis of variance (ANOVA) for comparison of means. Multiple pairwise comparisons were performed using Bonferroni correction. To assess whether the frequency of plaque and/or multiple plaque was associated with the type of diabetes the crude Odds Ratio was calculated and subsequently adjusted with the respective confidence intervals at 95%. The adjustment variables, besides the type of diabetes, were duration of diabetes, age, sex, smoking, hypertension, dyslipidemia and retinopathy at the time of inclusion. Age and duration of diabetes were categorized according to tertiles, and adjusted models were introduced by functions smoothing splines, with a focus on automatic smoothing parameter selection. The adjusted ORs were estimated using generalized additive models with logit link with package “gam” [30, 31] from R 3.2.1

statistical software [32]. The goodness of fit of the models was assessed with the Hosmer–Lemeshow test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

We recruited 71 patients with LADA, 191 patients with type 2 diabetes and 116 patients with type 1 diabetes. The clinical characteristics of the study groups are shown in Table 1. Patients with LADA, classic type 1, and type 2 diabetes were similar in age, gender distribution, current smoking status, use of antihypertensive drugs, and HbA1c concentrations. As patients were matched by age, the diabetes duration was longer in patients with type 1 diabetes than in patients with LADA, but also, in the latter duration was longer than in type 2 diabetes (23.7 ± 12.4 , 13.2 ± 9.7 and 8.7 ± 7.9 years, respectively, $P < 0.001$). While the prevalence of diabetic retinopathy, as expected given the longer disease duration, was higher in type 1 diabetes than in LADA and type 2 diabetes, the frequency of microalbuminuria was similar. About half the patients with LADA were treated with metformin, and the majority were receiving insulin. Patients with type 2 diabetes, as expected, exhibited a more adverse lipid profile and anthropometric measures than the other two cohorts, though fewer were on statin treatment.

For carotid ultrasound findings: mean carotid IMT was lower in patients with type 1 diabetes compared to both LADA and type 2 diabetes (Table 1). As shown in Fig. 1 subclinical carotid atherosclerosis (presence of atherosclerotic plaques) was more frequent in patients with LADA than in patients with type 1 diabetes and type 2 diabetes [73.2% vs. 57.1% ($P = 0.026$) and 56.9% ($P = 0.018$), respectively]. Multiple plaques were also more frequent in patients with LADA than in type 1 diabetes and type 2 diabetes [45.1% vs. 33.6% ($P = 0.077$), and 27.2% ($P = 0.019$), respectively] (Fig. 1).

Carotid plaques were also related to older age, longer diabetes duration, hypertension, retinopathy and dyslipidemia (Table 2).

A multivariate logistic regression model including age, diabetes duration, gender, type of diabetes, retinopathy, hypertension, smoking and dyslipidemia (Table 3) revealed that age, but not gender, type of diabetes, and the presence of hypertension and smoking habit were associated with carotid atherosclerosis. The adjusted inverse OR for the presence of carotid plaques in patients with LADA as compared with those with type 1 and type 2 diabetes was 2.44 [(1.65–3.6); $P = 0.0225$] and 2.06 [(1.47–2.9); $P = 0.0334$], respectively.

To explore the impact of disease duration on carotid plaque frequency in patients with LADA, we limited the analysis to patients with LADA and type 2 diabetes, as few patients with type 1 diabetes had a short diabetes

Table 1 Characteristics of study subjects Table 1

Variables	Type 1 diabetes (n = 116)	LADA (n = 71)	Type 2 diabetes (n = 191)	P value
Age (years)	56.5 ± 10.8	58.3 ± 11.6	58.3 ± 10.5	0.321
Male n (%)	52 (44.8)	37 (52.1)	105 (55)	0.224
BMI (kg/m ²)	26.5 ± 3.9	27.4 ± 5	31.3 ± 5.3	<0.001 ^a
Waist (cm)	91.6 ± 13.3	96.3 ± 14	104.8 ± 11.7	<0.001
Diabetes duration (years)	23.7 ± 12.4	13.2 ± 9.7	8.7 ± 7.9	<0.001
Smoking (current/past/never) n (%)	21 (18.1)/33 (28.4)/62 (53.4)	17 (23.9)/22 (31)/32 (45.4)	41 (21.5)/66 (34.6)/83 (43.5)	0.647
Anti-hypertensive treatment n (%)	54 (46.6)	37 (52.1)	98 (51.3)	0.667
Statin treatment n (%)	73 (62.9)	42 (59.2)	71 (37.2)	<0.001 ^a
Antiplatelet agents n (%)	50 (43.1)	40 (56.3)	59 (30.9)	0.002 ^b
Metformin treatment n (%)	0	31 (43.7)	138 (72.3)	<0.001
Insulin treatment n (%)	100	63 (88.7)	37 (19.4)	<0.001
Fasting glycemia (mg/dl)	170.9 ± 79.1	143.8 ± 53.4	151.7 ± 52.6	0.006 ^c
HbA1c (%)	7.7 ± 1	7.7 ± 1.1	7.4 ± 1.3	0.07
HbA1c (mmol/mol)	60.6 ± 12.5	61 ± 11.4	57.3 ± 18.6	0.07
Total cholesterol (mg/dl)	184.9 ± 29.8	178.9 ± 37.8	185.6 ± 35.3	0.357
LDL-cholesterol (mg/dl)	102.6 ± 25.4	102 ± 24.8	110.6 ± 29.4	0.015 ^a
HDL-cholesterol (mg/dl)	65.9 ± 14.6	61.5 ± 18.2	48.4 ± 12.1	<0.001 ^a
Triglycerides (mg/dl)	79.9 ± 36.4	100.5 ± 72.9	141.3 ± 78.7	<0.001 ^a
Diabetic retinopathy n (%)	52 (44.8)	13 (18.3)	36 (18.8)	<0.001 ^c
Microalbuminuria > 30 mg/g creatinine	10 (8.6)	7 (9.9)	12 (6.3)	0.563
Urinary albumin:creatinine ratio (mg/g)	12.2 ± 29.8	20.1 ± 69.6	14.5 ± 32.9	0.451
Mean IMT	0.750 ± 0.109	0.775 ± 0.147	0.793 ± 0.135	0.047 ^c

Values are expressed as the mean ± SD or percentages

LADA latent autoimmune diabetes in adults, BMI body mass index, HDL high-density lipoprotein, LDL low-density lipoprotein, HbA1c glycosylated haemoglobin

^a Type 2 diabetes different from LADA and type 1 diabetes

^b Type 2 diabetes different from LADA

^c Type 1 diabetes different from LADA and type 2 diabetes

duration. We divided patients with LADA and type 2 diabetes into age-adjusted tertiles of disease duration: ≤5, 6–11, ≥12 years. Table 4 shows the results of this analysis; within 5 years of diabetes duration the prevalence of carotid plaques was lower, though not significantly so, in patients with LADA than in those with type 2 diabetes [26.7% vs. 54.8%, inverse OR 0.38 (0.11–1.39); $P = 0.137$]. However, with increasing diabetes duration the frequency of carotid atherosclerotic plaques increased in patients with LADA, but not in patients with type 2 diabetes [81.8% vs. 50%, inverse OR 5.72 (1.5–21.8); $P = 0.009$].

Discussion

In this study, we unexpectedly found an increased frequency of subclinical carotid atherosclerosis in patients with LADA, as compared to subjects with classic type 1 diabetes and type 2 diabetes. That excess frequency of carotid disease was also evident when assessing multiple plaques in LADA compared with the other cohorts. We did not find the same results for cIMT as for carotid

plaque, potentially due to the high variability and low intra-individual reproducibility of the former measurement [33]. Moreover, the pathophysiology underlying the development of carotid plaque and cIMT is distinct and the evidence regarding the value of cIMT in cardiovascular risk prediction is contradictory and of debatable value [34–36]. Most recent clinical guidelines on cardiovascular risk do not recommend carotid IMT for individual risk prediction [18, 37]. In contrast, the presence of carotid plaques has been shown to be a good predictor of future cardiac events [15, 18].

The high frequency of carotid plaques, despite the increased use of statins in LADA cases, remained after adjusting for the main cardiovascular risk factors, including diabetes duration. The current cross-sectional study does not allow for the identification of potential causes of our unexpected finding of higher atherosclerotic burden in LADA, even though patients with type 2 diabetes tend to exhibit, as in other studies, a worse cardiovascular risk profile including higher blood pressure, more obesity and an adverse lipid profile. In both the Freemantle Study [38]

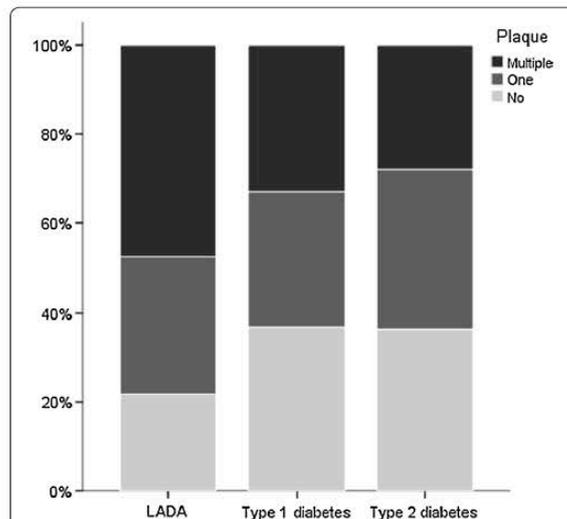


Fig. 1 Carotid atherosclerosis in patients with LADA, type 1 and type 2 diabetes. The percentage of patients with carotid plaques was significantly higher in the LADA group (73.2%) than in the group of patients with type 1 diabetes (57.1%, $P = 0.026$) and type 2 diabetes (56.9%, $P = 0.018$). The difference was mainly due to the percentage of patients with multiple plaques, which was higher in LADA (45.1%), than in type 1 diabetes (33.6%), $P = 0.077$ and type 2 diabetes (27.2%), $P = 0.019$. *LADA* latent autoimmune diabetes in adults

Table 2 Univariate analysis for the presence of carotid atherosclerotic plaques

	Odds ratio (95% confidence interval)	P value
Diabetes		
LADA	1	
Type 1 diabetes	0.482 (0.254–0.916)	0.026
Type 2 diabetes	0.486 (0.267–0.884)	0.018
Diabetic retinopathy	1.954 (1.195–3.196)	0.008
Male sex	1.275 (0.844–1.926)	0.248
Dyslipidemia	1.808 (1.192–2.747)	0.005
Hypertension	2.639 (1.721–4.032)	<0.001
Smoker/former smoker	1.464 (0.868–2.469)	0.152
Diabetes duration (tertiles)		
≤5 years	1	
6–11 years	1.360 (0.779–2.375)	0.279
≥12 years	1.875 (1.140–3.084)	0.013
Age (tertiles)		
≤52 years	1	
53–63 years	2.267 (1.371–3.748)	<0.001
≥64 years	3.707 (2.177–6.313)	<0.001

LADA latent autoimmune diabetes in adults

Table 3 Adjusted Odds ratio for the presence of carotid atherosclerotic plaques

	Adjusted odds ratio (95% confidence interval)	P value
Diabetes		
LADA	1	
Type 1 diabetes	0.410 (0.278–0.606)	0.0225
Type 2 diabetes	0.485 (0.345–0.682)	0.0334
Diabetic retinopathy	1.258 (0.910–1.741)	0.4790
Female sex	0.764 (0.603–0.967)	0.2530
Dyslipidemia	1.252 (0.980–1.599)	0.3587
Hypertension	1.773 (1.389–2.264)	0.0189
Smoker/former smoker	2.471 (1.824–3.349)	0.0029

Odds ratio was adjusted by age and diabetes duration using a generalized additive model

LADA latent autoimmune diabetes in adults

and the Collaborative Atorvastatin Study [7], patients designated LADA had comparable cardiovascular disease as the patients with type 2 diabetes; while in the Botnia study [6] after 13 years of diabetes 56% of LADA patients had ischemic heart disease and 5% had had cerebrovascular events. To date, only one other study has assessed the frequency of carotid atherosclerosis in patients with LADA and type 2 diabetes [8], and none have assessed the frequency in the three cohorts we assessed. That Chinese study was retrospective and not designed to answer the question we posed here, but they did find a comparable frequency of carotid atherosclerosis compared with type 2 diabetes patients. Taken together, these studies indicate that patients with adult-onset diabetes, irrespective of the cause of the diabetes, are at risk of carotid and coronary atherosclerosis. It is difficult to understand why this should be, given that autoimmune diabetes cases are less likely to have the metabolic syndrome and related features [7]. Two possibilities suggest themselves. First, the time of onset of autoimmune diabetes antedates the disease by months, even years, and it remains possible that LADA patients have had low-grade disease many years before clinical presentation, as can be the case with type 2 diabetes. However, the duration of LADA pre-disease is unknown both in this study and in general, while the risk of atherosclerosis in these cases was increased with increasing diabetes duration post-diagnosis. Second, patients with LADA are not well managed and are consistently shown to have higher HbA1c levels than comparable cohorts of patients with type 2 diabetes [4, 39–41]. Higher HbA1c has been found to be associated with

Table 4 Age-adjusted frequency of carotid atherosclerotic plaques in patients with LADA and type 2 diabetes, divided by tertiles of disease duration

Diabetes duration	N	Carotid plaque (%)	Inverse OR (95% confidence interval)	P value
≤5 years				
Type 2 diabetes	84	54.8		0.137
LADA	15	26.7	0.38 (0.11–1.39)	
6–11 years				
Type 2 diabetes	60	50		0.009
LADA	22	81.8	5.72 (1.5–21.8)	
≥12 years				
Type 2 diabetes	47	70.2		0.038
LADA	34	88.2	4.19 (1.06–16.6)	

LADA latent autoimmune diabetes in adults

higher coronary and carotid atherosclerotic burden in non-diabetic patients [42]. Additionally, deranged glycaemic control has been independently related to coronary heart disease in both LADA patients [6], and diabetes patients in general [40, 43]. Higher HbA1c concentrations have also been related to cardiovascular disease in the non-diabetic population in prospective studies, including the Norfolk cohort of European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study [44] and The Copenhagen City Heart Study [45].

In subjects with diabetes, other potential different pathophysiological mechanisms may be involved in the atherosclerotic process. First, advanced glycation end products (AGEs) which are increased in diabetes are pro-oxidants that induce oxidative stress and are thought to play a major role in atherosclerosis [46, 47]. Although diet is the principal source of AGEs, their concentrations rise with increasing blood glucose. An increased level of advanced AGEs has been associated with cardiovascular disease in type 1 diabetes [48] and type 2 diabetes [49]; no such data is available in LADA. Secondly, patients with systemic autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus, have an increased risk of atherosclerosis, with both cellular and humoral components of the immune system involved in its pathogenesis and some shared genetic risk [50], although the precise mechanisms underlying the high cardiovascular risk in these patients is unclear [51]. It is well known that chronic inflammation plays an important role in atherogenesis [52, 53], and inflammatory markers associated with macrovascular disease are elevated both in patients with type 1 diabetes and type 2 diabetes [54, 55]. Moreover, poor glycaemic control and hypoglycaemic episodes are related to pro-inflammatory status [56, 57], and may be additional contributing factors in atherosclerosis in patients with autoimmune diabetes [58]. Unfortunately, in the current study we did not determine any markers of chronic inflammation in the

LADA patients, though we have previously demonstrated such changes in LADA patients [59].

Nevertheless, this study has some weaknesses. First of all, the size of the populations studied is relatively small, and some important information is missing, notably the familial history of premature cardiovascular disease. While we found no differences in HbA1c between the three diabetes groups, this is a cross-sectional study, and the relationship between glycaemic control and atherosclerosis can only be answered with a prospective design. The situation is made more complex because most of the patients with LADA in this study had already been referred to specialized care, usually because of poor glycaemic control. The specialized diabetes care of all the patients with type 1 diabetes and most of the patients with LADA may explain the increased use of statins and antiplatelet agents in these groups compared to that of patients with type 2 diabetes, since the latter are usually under general practitioner's care. Since LADA patients were recruited from a specialty-based cohort our results may show a bias; however, this group of LADA subjects is likely representative of LADA patients in general in Spain.

Nevertheless, despite its limitations, our study has the strength of comparing for the first time these three groups of diabetes, which come from a homogeneous population. While we use the term LADA throughout the text for clarity, we would prefer that LADA is called adult-onset autoimmune diabetes since there is no firm evidence that LADA can be categorically distinguished from type 1 (autoimmune) diabetes.

Conclusions

Our results indicate that the frequency of preclinical carotid atherosclerosis in patients with adult-onset initially non-insulin requiring autoimmune diabetes, also called LADA, is comparable, even greater, than in adults of similar age with classic type 1 diabetes and type 2 diabetes. Our data should be confirmed

in both cross-sectional and prospective studies in other populations. However, the results draw attention to the importance of macrovascular disease in patients with diabetes, irrespective of the cause of the disease, and emphasize the potential value of rigorous treatment of macrovascular risk factors even in patients with autoimmune diabetes.

Abbreviations

LADA: latent autoimmune diabetes in adults; IMT: intima-media-arterial thickness.

Authors' contributions

MH, RDL and DM wrote the manuscript. AB, TM, EF, and ER performed all ultrasound examinations. EO, JR and JV performed the statistical analysis. CL, FV, JS, AB, NA, MG and AL contributed to all other data collection. DM and MH conceived the study and participated in its design and coordination. All authors contributed to the discussion and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Department of Endocrinology and Nutrition, University Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain. ² Nursing School, Universitat de Lleida, Lleida, Spain. ³ Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, Lleida, Spain. ⁴ Unitat de Suport a la Recerca Lleida, Institut Universitari d'Investigació en Atenció Primària Jordi Gol (IDIAP Jordi Gol), Barcelona, Spain. ⁵ Epidemiologia i Salut Pública, Universitat Internacional de Catalunya, Sant Cugat del Vallès, Spain. ⁶ Department of Basic Medical Sciences, Universitat de Lleida, Lleida, Spain. ⁷ Department of Endocrinology and Nutrition, CIBEROBN-Spanish Biomedical Research Centre in Physiopathology of Obesity, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. ⁸ Department of Endocrinology and Nutrition, CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases, Health Sciences Research Institute & University Hospital Germans Trias i Pujol, Carretera Canyet S/N, Badalona 08916, Spain. ⁹ UDETM, Department of Nephrology, University Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain. ¹⁰ The Blizard Institute, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, London, UK.

Acknowledgements

This work has been carried out within the framework of the Doctorate in Medicine of the Autonomous University of Barcelona.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethical approval

The Ethics Committee of University Hospital Arnau de Vilanova and University Hospital Germans Trias i Pujol approved the study.

Funding

This project was funded by Grants Nos. PI12/00183 and PI15/00625, both included in Plan Nacional de I + D + I, and co-financed by Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Evaluación, Ministry of Economy and Competitiveness, and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM) is an initiative from Instituto de Salud Carlos III, Spain.

Informed consent

All the participants signed an informed consent form.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 20 April 2017 Accepted: 21 July 2017

Published online: 28 July 2017

References

1. Rawshani A, Rawshani A, Franzén S, Eliasson B, Svensson AM, Miftaraj M, et al. Mortality and cardiovascular disease in type 1 and type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2017. doi:10.1056/NEJMoa1608664.
2. Laugesen E, Østergaard JA, Leslie RD. Danish Diabetes Academy Workshop and Workshop Speakers. Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. *Diabet Med*. 2015. doi:10.1111/dme.12700.
3. Hawa MI, Thivolet C, Mauricio D, Alemanno I, Cipponeri E, Collier D, et al. Metabolic syndrome and autoimmune diabetes: action LADA 3. *Diabetes Care*. 2009. doi:10.2337/dc08-1419.
4. Mollo A, Hernandez M, Marsal JR, Esquerda A, Rius F, Blanco-Vaca F, et al. Latent autoimmune diabetes in adults is perched between type 1 and type 2: evidence from adults in one region of Spain. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013. doi:10.1002/dmrr.2411.
5. Hawa MI, Kolb H, Schloot N, Beyan H, Paschou SA, Buzzetti R, et al. Adult-onset autoimmune diabetes in Europe is prevalent with a broad clinical phenotype: action LADA 7. *Diabetes Care*. 2013. doi:10.2337/dc12-0931.
6. Isomaa B, Almgren P, Henricsson M, Taskinen MR, Tuomi T, Groop L, et al. Chronic complications in patients with slowly progressing autoimmune type 1 diabetes (LADA). *Diabetes Care*. 1999;22:1347.
7. Hawa MI, Buchan AP, Ola T, Wun CC, DeMicco DA, Bao W, et al. LADA and CARDS: a prospective study of clinical outcome in established adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes Care*. 2014. doi:10.2337/dc13-2383.
8. Lu J, Hou X, Zhang L, Hu C, Zhou J, Pang C, et al. Associations between clinical characteristics and chronic complications in latent autoimmune diabetes in adults and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015. doi:10.1002/dmrr.2626.
9. Martinell M, Dorkhan M, Stålhammar J, Storm P, Groop L, Gustavsson C. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy at diagnosis (DRAD) in patients recently diagnosed with type 2 diabetes (T2D) or latent autoimmune diabetes in the adult (LADA). *J Diabetes Complicat*. 2016. doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.08.009.
10. van der Meer IM, Bots ML, Hofman A, del Sol AI, van der Kuip DA, Witteman JC. Predictive value of noninvasive measures of atherosclerosis for incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 2004. doi:10.1161/01.CIR.0000120708.59903.1B.
11. Rundek T, Arif H, Boden-Albala B, Elkind MS, Paik MC, Sacco RL. Carotid plaque, a subclinical precursor of vascular events: the Northern Manhattan Study. *Neurology*. 2008. doi:10.1212/01.wnl.0000303969.63165.34.
12. Nambi V, Chambless L, Folsom AR, He M, Hu Y, Mosley T, et al. Carotid intima-media thickness and presence or absence of plaque improves prediction of coronary heart disease. The ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) Study. *J Am Coll Cardiol*. 2010. doi:10.1016/j.jacc.2009.11.075.
13. Polak JF, Pencina MJ, Pencina KM, O'Donnell CJ, Wolf PA, D'Agostino RB Sr. Carotid-wall intima-media thickness and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2011. doi:10.1056/NEJMoa1012592.
14. Vigili de Kreutzenberg S, Fadini GP, Guzzinati S, Mazzucato M, Volpi A, Coracina A, et al. Carotid plaque calcification predicts future cardiovascular events in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2015. doi:10.2337/dc15-0327.
15. Baber U, Mehran R, Sartori S, Schoos MM, Sillesen H, Muntendam P, et al. Prevalence, impact, and predictive value of detecting subclinical coronary and carotid atherosclerosis in asymptomatic adults: the Biomag study. *J Am Coll Cardiol*. 2015. doi:10.1016/j.jacc.2015.01.017.
16. Polak JF, Szklo M, O'Leary DH. Carotid intima-media thickness score, positive coronary artery calcium score, and incident coronary heart disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2017. doi:10.1161/JAHA.116.004612.
17. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013. doi:10.1093/eurheartj/ehf151.

18. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: the Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis*. 2016. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.037.
19. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Cardiovascular Disease. *Endocr Pract*. 2017. doi:10.4158/EP171764.APPGL.
20. den Ruijter HM, Peters SA, Groenewegen KA, Anderson TJ, Britton AR, Dekker JM, et al. Common carotid intima-media thickness does not add to Framingham risk score in individuals with diabetes mellitus: the USE-IMT initiative. *Diabetologia*. 2013. doi:10.1007/s00125-013-2898-9.
21. Rassi CH, Churchill TW, Tavares CA, Fahel MG, Rassi FP, Uchida AH, et al. Use of imaging and clinical data to screen for cardiovascular disease in asymptomatic diabetics. *Cardiovasc Diabetol*. 2016. doi:10.1186/s12933-016-0334-4.
22. Vouillarmet J, Helfre M, Maucourt-Boulch D, Riche B, Thivolet C, Grange C. Carotid atherosclerosis progression and cerebrovascular events in patients with diabetes. *J Diabetes Complicat*. 2016. doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.01.022.
23. American Diabetes Association. Cardiovascular disease and risk management. *Diabetes Care*. 2017. doi:10.2337/dc17-S012.
24. Leslie RD, Kolb H, Schloot NC, Buzzetti R, Mauricio D, De Leiva A, et al. Diabetes classification: grey zones, sound and smoke: action LADA 1. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008. doi:10.1002/dmrr.877.
25. Palomer X, Mauricio D, Rodríguez-Espinoza J, Zapico E, Mayoral C, González-Sastre F, et al. Evaluation of two nonisotopic immunoassays for determination of glutamic acid decarboxylase and tyrosine phosphatase autoantibodies in serum. *Clin Chem*. 2004. doi:10.1373/clinchem.2004.031799.
26. Betriu A, Martínez-Alonso M, Arcidiacono MV, Cannata-Andia J, Pascual J, Valdivielso JM, et al. Prevalence of subclinical atherosclerosis and associated risk factors in chronic kidney disease: the NEFRONA study. *Nephrol Dial Transplant*. 2014. doi:10.1093/ndt/gfu038.
27. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amareno P, Bornstein N et al. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004–2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis*. 2007. doi:10.1159/000097034.
28. Störk S, van den Beld AW, von Schacky C, Angermann CE, Lamberts SW, Grobbee DE, et al. Carotid artery plaque burden, stiffness, and mortality risk in elderly men: a prospective, population-based cohort study. *Circulation*. 2004. doi:10.1161/01.CIR.0000134966.10793.C9.
29. Hollander M, Bots ML, Del Sol AI, Koudstaal PJ, Witteman JC, Grobbee DE, et al. Carotid plaques increase the risk of stroke and subtypes of cerebral infarction in asymptomatic elderly: the Rotterdam study. *Circulation*. 2002;105:2872–7.
30. Figueiras A, Cadarso-Suárez C. Application of nonparametric models for calculating odds ratios and their confidence intervals for continuous exposures. *Am J Epidemiol*. 2001;154(3):264–75.
31. Hastie T, Tibshirani R. Generalized additive models. *Encycl Stat Sci*. 2006. doi:10.1002/0471667196.ess0297.pub2.
32. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing 2013. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. Accessed 16 May 2016.
33. Naqvi TZ, Lee MS. Carotid intima-media thickness and plaque in cardiovascular risk assessment. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014. doi:10.1016/j.jcmg.2013.11.014.
34. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.628875.
35. Den Ruijter HM, Peters SA, Anderson TJ, Britton AR, Dekker JM, Eijkemans MJ, et al. Common carotid intima-media thickness measurements in cardiovascular risk prediction: a meta-analysis. *JAMA*. 2012. doi:10.1001/jama.2012.9630.
36. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2012. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.044.
37. Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB Sr, Gibbons R, et al. ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013. doi:10.1016/j.jacc.2013.11.005.
38. Myhill P, Davis WA, Bruce DG, Mackay IR, Zimmet P, Davis TM. Chronic complications and mortality in community-based patients with latent autoimmune diabetes in adults: the Fremantle Diabetes Study. *Diabet Med*. 2008. doi:10.1111/j.1464-5491.2008.02562.x.
39. Balme M, McAllister I, Davis WA, Davis TM. Retinopathy in latent autoimmune diabetes of adults: the Fremantle Diabetes Study. *Diabet Med*. 2002. doi:10.1046/j.1464-5491.2002.00739.x.
40. Olsson L, Grill V, Midtjell K, Ahlbom A, Andersson T, Carlsson S. Mortality in adult-onset autoimmune diabetes is associated with poor glycemic control: results from the HUNT Study. *Diabetes Care*. 2013. doi:10.2337/dc13-0564.
41. Andersen CD, Bennet L, Nyström L, Lindblad U, Lindholm E, Groop L, et al. Worse glycaemic control in LADA patients than in those with type 2 diabetes, despite a longer time on insulin therapy. *Diabetologia*. 2013. doi:10.1007/s00125-012-2759-y.
42. Scicali R, Giral P, Gallo A, Di Pino A, Rabuazzo AM, Purrello F. HbA1c increase is associated with higher coronary and peripheral atherosclerotic burden in non diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2016. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.003.
43. Paul SK, Klein K, Thorsted BL, Wolden ML, Khunti K. Delay in treatment intensification increases the risks of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2015. doi:10.1186/s12933-015-0260-x.
44. Khaw KT, Wareham N, Luben R, Bingham S, Oakes S, Welch A, et al. Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of european prospective investigation of cancer and nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ*. 2001;322:15.
45. Eskesen K, Jensen MT, Galatius S, Vestergaard H, Hildebrandt P, Marott JL, et al. Glycated haemoglobin and the risk of cardiovascular disease, diabetes and all-cause mortality in the Copenhagen City Heart Study. *J Intern Med*. 2013. doi:10.1111/j.1365-2796.2012.02594.x.
46. Vlassara H, Striker GE. Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2013. doi:10.1016/j.ecl.2013.07.005.
47. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854.
48. Monnier VM, Sun W, Gao X, Sell DR, Cleary PA, Lachin JM, Research Group, et al. Skin collagen advanced glycation endproducts (AGEs) and the long-term progression of sub-clinical cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2015. doi:10.1186/s12933-015-0266-4.
49. Kilhovd BK, Juutilainen A, Lehto S, Rönnemaa T, Torjesen PA, Hanssen KF, et al. Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes: a population-based 18 year follow-up study. *Diabetologia*. 2007. doi:10.1007/s00125-007-0687-z.
50. Sherer Y, Shoenfeld Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006. doi:10.1038/ncprheum0092.
51. Matsuura E, Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Turiel M, Lopez LR, Nurmohamed MT. Is atherosclerosis an autoimmune disease? *BMC Med*. 2014. doi:10.1186/1741-7015-12-47.
52. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005. doi:10.1056/NEJMr043430.
53. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179705.
54. Calle MC, Fernandez ML. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2012. doi:10.1016/j.diabet.2011.11.006.
55. Aguilera E, Serra-Planas E, Granada ML, Pellitero S, Reverter JL, Alonso N, et al. Relationship of YKL-40 and adiponectin and subclinical

- atherosclerosis in asymptomatic patients with type 1 diabetes mellitus from a European Mediterranean population. *Cardiovasc Diabetol*. 2015. doi:10.1186/s12933-015-0287-z.
56. Heier M, Margeisdottir HD, Brunborg C, Hanssen KF, Dahl-Jørgensen K, Seljeflot I. Inflammation in childhood type 1 diabetes; influence of glycemic control. *Atherosclerosis*. 2015. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.11.018.
 57. Kiec-Wilk B, Matejko B, Razny U, Stankiewicz M, Skupien J, Klupa T, et al. Hypoglycemic episodes are associated with inflammatory status in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2016. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.002.
 58. Giménez M, Gilabert R, Monteagudo J, Alonso A, Casamitjana R, Paré C, et al. Repeated episodes of hypoglycemia as a potential aggravating factor for preclinical atherosclerosis in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2011. doi:10.2337/dc10-1371.
 59. Schloot NC, Pham MN, Hawa MI, Pozzilli P, Scherbaum WA, Schott M, et al. Inverse relationship between organ-specific autoantibodies and systemic immune mediators in type 1 diabetes and type 2 diabetes: action LADA 11. *Diabetes Care*. 2016. doi:10.2337/dc16-0293.

ARTÍCULO 4

El perfil de inflamación de bajo grado puede ayudar a diferenciar a los pacientes con diabetes LADA, diabetes tipo 1 clásica de inicio en la edad adulta y diabetes tipo 2

El objetivo de este trabajo era conocer si las concentraciones circulantes de mediadores de la inflamación de bajo grado relacionados con la adiposidad podía ser útil en la diferenciación de los pacientes con diabetes LADA, diabetes tipo 1 clásica de inicio en la edad adulta (diabetes tipo 1), y diabetes tipo 2.

Para ello, incluimos 75 pacientes con diabetes LADA, 65 con diabetes tipo 1 y 390 con diabetes tipo 2. Se utilizaron muestras congeladas de los pacientes que participaron en el estudio inicial sobre el fenotipo de la diabetes LADA (artículo 1).

Las determinaciones realizadas fueron: la proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us) se analizó mediante un ensayo inmunturbidimétrico; y la adiponectina, el receptor soluble 2 del factor de necrosis tumoral alfa (TNFRsII), y la IL-6 se determinaron mediante kits de ELISA tipo sándwich.

El recuento total de leucocitos y las concentraciones de TNFRsII aumentaban gradualmente entre los pacientes con diabetes tipo 1, diabetes LADA y diabetes tipo 2, y las de adiponectina seguían el patrón contrario. No encontramos diferencias para la IL-6.

Cuando comparamos entre grupos, la única diferencia que encontramos entre los pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 1 fue que los primeros tenían valores superiores de TNFRsII. Comparados con los pacientes con diabetes tipo 2, los pacientes con diabetes autoinmune tenían concentraciones más elevadas de adiponectina, y más bajas de PCR-us y del recuento total de leucocitos.

Respecto a los marcadores de adiposidad, los hallazgos fueron similares en los tres tipos de diabetes: la PCR-us, el TNFRsII y el recuento de leucocitos se correlacionaron positivamente con el índice de masa corporal, el índice cintura-cadera y la concentración de triglicéridos en los tres tipos de diabetes. La correlación con el cHDL fue inversa en todos los grupos para los tres marcadores. Además, también en los tres tipos de diabetes la adiponectina y el TNFRsII se correlacionaron positivamente con la edad, y la IL-6 y la PCR-us con la hemoglobina glucosilada. La presión arterial sistólica se correlacionó positivamente solo con la PCR-us.

Se construyó un modelo de regresión logística para los distintos tipos de diabetes, en el que se introdujeron las covariables que se asociaban clínicamente o bien con el análisis estadístico previo. Una edad mayor y mayor concentración de TNFRsII aumentaban la probabilidad de diabetes LADA en relación a la diabetes tipo 1, mientras que las concentraciones elevadas de cHDL y PCR-us la disminuían. En el modelo para la diabetes tipo 2 una mayor edad, índice de masa corporal y recuento total de leucocitos

disminuían la probabilidad de diabetes LADA, mientras que las concentraciones aumentadas de cHDL la aumentaban. Los modelos creados con estos parámetros explicaban un 35% del tipo de diabetes en la comparación de LADA con la diabetes tipo 1, y un 15% en el modelo de diabetes LADA en comparación con la diabetes tipo 2.

Como conclusión, describimos un perfil inflamatorio de bajo grado en una población europea de pacientes con diabetes LADA, que fue intermedio entre el de los pacientes con diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. Estos marcadores por sí solos no sirven para discriminar los tres tipos de diabetes, pero cuando los asociamos con otros marcadores disponibles en la práctica médica habitual (edad, índice de masa corporal y cHDL) aportan información adicional que ayudan al correcto fenotipado de la diabetes.

Castelblanco E, Hernández M, Castelblanco A, Gratacòs M, Esquerda A, Molló À, Ramírez-Morros A, Real J, Franch-Nadal J, Fernández-Real JM, Mauricio D. **Low-grade Inflammatory Marker Profile May Help to Differentiate Patients With LADA, Classic Adult-Onset Type 1 Diabetes, and Type 2 Diabetes.** *Diabetes Care.* 2018;41(4):862-868. doi: 10.2337/dc17-1662.

DISCUSIÓN CONJUNTA

Para la realización de esta tesis hemos investigado algunos de los campos de incertidumbre de la diabetes autoinmune latente del adulto (38, 111, 112). Para ello, diseñamos cuatro estudios transversales en los pacientes con diabetes LADA atendidos en dos centros hospitalarios de Cataluña: el Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, y el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Se compararon los resultados con los obtenidos en pacientes con diabetes tipo 1 clásica (diagnosticada en la edad adulta en la mayoría de los estudios), y pacientes con diabetes tipo 2.

Los aspectos que se investigaron fueron la caracterización clínica, la reserva pancreática de insulina, la enfermedad cardiovascular preclínica y la inflamación crónica de bajo grado.

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LA DIABETES LADA

Los resultados que obtuvimos confirman un fenotipo intermedio en los pacientes con diabetes LADA entre aquel de los pacientes con diabetes tipo 1 clásica diagnosticada en la edad adulta y la diabetes tipo 2, respecto a parámetros de adiposidad, tensión arterial, dislipemia diabética y síndrome metabólico. Nuestros resultados son acordes con los estudios publicados cuando se compararon pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 2, algunos de base poblacional (21, 23, 25, 31). Sin embargo, los estudios publicados que comparaban la diabetes LADA con la diabetes tipo 1 diagnosticada en la edad adulta arrojan resultados menos consistentes, algunos en una dirección similar a los nuestros (32, 34, 87, 113), y otros en los que no se encuentran diferencias entre ambos tipos de diabetes autoinmune (57, 90). El menor número de pacientes incluidos en los estudios, la ausencia de base poblacional, la falta de consistencia fisiopatológica en los criterios diagnósticos, y el solapamiento entre las cohortes estudiadas, incluyendo la nuestra, son los principales motivos que creemos que explican esta variabilidad de resultados.

Comparados con los pacientes con diabetes tipo 1 clásica, los pacientes con diabetes LADA presentaron mayor frecuencia de positividad para los auto-anticuerpos GADA, y el título de estos anticuerpos se correlacionó de manera inversa con la concentración de péptido C en los pacientes con diabetes LADA, pero no así en los pacientes con diabetes tipo 1 clásica. Esta asociación negativa entre títulos altos de GADA en pacientes con diabetes LADA ya ha sido descrita en estudios poblacionales (21, 27, 31); además, en estudios prospectivos se ha asociado un título alto de GADA con una pérdida más rápida de secreción de péptido C en la diabetes LADA (26, 81, 85). Paralelamente, y de manera consistente con estos últimos hallazgos, el tratamiento con insulina es más común en pacientes con diabetes LADA con títulos altos de GADA (32, 66).

En nuestro estudio, a pesar de recibir más frecuentemente tratamiento con insulina, el control glucémico fue peor en los pacientes con diabetes LADA que en los pacientes con diabetes tipo 2, resultados similares a los ya descritos por otros autores (25, 34, 95, 97, 101). No encontramos diferencias entre los dos tipos de diabetes autoinmune en el control glucémico, aunque los estudios publicados hasta el momento indican un peor control en los pacientes con diabetes tipo 1 clásica que en la diabetes LADA (34, 113). De nuevo, la diferencia entre los participantes en los diferentes estudios y el diseño de los mismos explican la discordancia de los resultados.

Este es el primer trabajo en el que se realizó una descripción fenotípica de los pacientes con diabetes LADA en España, y se comparan con pacientes con diabetes tipo 1 clásica diagnosticada en la edad adulta y diabetes tipo 2. Para confirmar estos resultados iniciales, sería deseable la realización de un estudio sin el sesgo de selección de nuestros pacientes (contexto hospitalario/especializado), y con medición de la secreción estimulada de la célula beta para caracterizar mejor la reserva pancreática como paso ulterior en este aspecto de la investigación.

En España, tan solo hay datos publicados después de nuestro estudio en 2017. Se trata de un estudio retrospectivo de pacientes con diabetes LADA atendidos en las consultas especializadas de la Comunidad de Madrid. Es difícil comparar estos pacientes con los incluidos en nuestro estudio, ya que la metodología es diferente, y además no consta el tiempo de evolución de la diabetes; pero, en general, lo más destacable es que en el estudio de Madrid los pacientes presentaban unas concentraciones de péptido C más bajas que los pacientes del estudio de Cataluña, recibían más frecuentemente tratamiento con insulina, y tenían un índice de masa corporal más bajo (114). De nuevo, podemos aducir los motivos anteriormente expuestos para justificar las diferencias entre los estudios.

FUNCIÓN DE CÉLULA BETA EN LOS PACIENTES CON DIABETES LADA

El test de estímulo con una comida líquida mixta estandarizada es la prueba de elección para medir la capacidad de secreción de la célula beta, ya que es más sensible, reproducible, y mejor tolerado que el estímulo con glucagón (115). Nuestro estudio es el primero que utilizó esta prueba en pacientes con diabetes LADA para comparar la secreción de insulina endógena con la de pacientes con diabetes tipo 1 clásica diagnosticados en la edad adulta y pacientes con diabetes tipo 2.

Para comparar la influencia del tiempo de evolución de la diabetes en la secreción de

péptido C, y dado que se trataba de un estudio transversal, diseñamos un protocolo en el que en cada grupo de diabetes se incluían pacientes apareados por tres estratos de tiempo de evolución de la diabetes (menos de 18 meses, de 19 meses a 5 años y de 5 a 10 años). La capacidad de secreción de la célula beta en los pacientes con diabetes LADA resultó intermedia entre la de los pacientes con diabetes tipo 1 (mayor) y diabetes tipo 2 (menor), expresada en términos de pico y de área bajo la curva de péptido C. De manera interesante, no encontramos diferencias entre los pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 2 en los primeros 18 meses de la enfermedad.

Este perfil intermedio entre la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2 ha sido descrito con anterioridad, pero solo mediante medición de péptido C basal (57); además, en aquel estudio no se encontraron diferencias entre la diabetes tipo 1 clásica y la diabetes LADA en los pacientes con menos de 10 años de evolución de la enfermedad, ni tampoco entre los pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 2 de más de 10 años de evolución.

Los mejores datos de los que disponemos para conocer la historia natural de la enfermedad son los provenientes de estudios prospectivos de hasta 10 años de seguimiento, en los que se comparó el péptido C basal (81, 83) y estimulado con glucagón (80) en pacientes con diabetes LADA y con diabetes tipo 2. En ellos, se confirmó que la pérdida de función de célula beta es más precoz en los primeros que en los segundos.

En el momento de redactar esta tesis solo había dos estudios publicados en los que se utilizó la prueba de comida mixta estandarizada para comparar la reserva pancreática en pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 2 (82, 79). En el primero se compararon un pequeño número de pacientes con diabetes LADA (n=13) y diabetes tipo 2 (n=12), siendo las concentraciones de péptido C estimulado menores en los pacientes con diabetes LADA (82). Cabe destacar que, probablemente debido a su menor sensibilidad, las diferencias no se observaron cuando se midió la secreción de insulina mediante el estímulo con glucagón endovenoso. En el segundo estudio, también con grupos pequeños (12 con diabetes LADA, y 18 con diabetes tipo 2), las diferencias en las concentraciones de péptido C estimulado encontradas inicialmente entre ambos tipos de diabetes resultaron estar asociadas únicamente con la adiposidad (79).

El principal factor limitante de estos hallazgos es que se trata de estudio transversales. Para poder conocer mejor la historia natural de la función de la célula beta en los pacientes con diabetes LADA sería necesario realizar estudios prospectivos y con un mayor número de pacientes.

ATEROSCLEROSIS PRECLÍNICA EN LOS PACIENTES CON DIABETES LADA

A pesar de tener una gran relevancia clínica, el campo del conocimiento sobre cómo afectan las complicaciones crónicas a los pacientes con diabetes LADA es uno de los menos estudiados. La enfermedad cardiovascular es la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes con diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2 (116). La aterosclerosis preclínica es un fuerte predictor de eventos cardiovasculares (117-120), y se puede detectar y cuantificar de manera no invasiva mediante ecografía carotídea.

En nuestro estudio, se exploró de manera transversal la presencia de placas ateromatosas carotídeas en la cohorte de Lleida, seleccionando los pacientes con diabetes LADA sin enfermedad cardiovascular conocida ni presencia de proteinuria. Como grupos comparadores se estudió a pacientes con diabetes tipo 1 clásica (Lleida y Badalona), y diabetes tipo 2 (Lleida) apareados por edad y sexo en proporción 2:1. Los pacientes con diabetes tipo 2 presentaban un fenotipo más desfavorable de adiposidad y perfil lipídico que los pacientes con diabetes autoinmune, y el control glucémico era similar entre los tres grupos en el momento del estudio. Los resultados obtenidos, ajustados por las diferentes variables de confusión, incluido el tiempo de evolución de la diabetes, reflejan una mayor frecuencia de placas ateromatosas en los pacientes con diabetes LADA que en la diabetes tipo 1 clásica y en la diabetes tipo 2 (73,2% versus 57,1% y 56,9%, respectivamente). La enfermedad ateromatosa carotídea afectaba, además, a un mayor número de territorios en los pacientes con diabetes LADA. Esta afectación más difusa se considera un enfermedad ateromatosa más grave (121).

En estudios prospectivos, la prevalencia e incidencia de enfermedad cardiovascular y de mortalidad cardiovascular o por cualquier causa fue similar en los pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 2, a pesar de presentar los primeros de manera constante un mejor perfil de riesgo cardiovascular que los pacientes con diabetes tipo 2 (91, 95, 97). Tampoco se han encontrado diferencias con los pacientes con diabetes tipo 1 en el único estudio prospectivo en el que se incluían este tipo de pacientes (97). Además, en este último estudio el exceso de mortalidad en todos los grupos de diabetes se relacionaba con el mal control glucémico].

En nuestro trabajo, cuando comparamos a los pacientes con diabetes tipo 2 y diabetes LADA divididos en terciles de tiempo de evolución, observamos que en el primer tercil la presencia de placa carotídea era inferior, aunque no de manera estadísticamente

significativa en los pacientes con LADA. Sin embargo, en los siguientes terciles la frecuencia de placa se mantuvo estable en los pacientes con diabetes tipo 2, y aumentó considerablemente en el grupo con diabetes LADA. Estos resultados, si bien habría que confirmarlos mediante estudios prospectivos, apuntan a una aceleración del proceso ateromatoso en los pacientes con diabetes LADA con respecto a la diabetes tipo 2.

El mal control glucémico se ha asociado con un aumento de la enfermedad cardiovascular en pacientes sin diabetes (122, 123), y con diabetes tipo 1 clásica (124, 125), diabetes tipo 2 (126), y diabetes LADA (94, 97). Es difícil comparar la enfermedad cardiovascular entre los dos tipos principales de diabetes, dadas las diferencias en la historia natural y del fenotipo asociado a las mismas. Sin embargo, Juutilainen *et al* describieron, tras 18 años de seguimiento de pacientes diagnosticados en la edad adulta (a partir de los 30 años) de diabetes tipo 1 clásica y de diabetes tipo 2, un impacto similar de la diabetes en la enfermedad cardiovascular y la mortalidad global (127). Además, la hiperglucemia tenía un impacto mucho mayor en la mortalidad cardiovascular en los pacientes con diabetes tipo 1. La falta de intensificación en el tratamiento hipoglucemiante en los dos primeros años del diagnóstico se ha asociado a un aumento de incidencia de enfermedad cardiovascular en la diabetes tipo 2 (128). Además, un estudio reciente refleja que en la vida real el deterioro del control glucémico en los pacientes con diabetes LADA a partir del diagnóstico es mucho más acelerado que en los pacientes con diabetes tipo 2 (129).

Tomando en conjunto todos estos datos, nuestra hipótesis es que el peor control glucémico en la diabetes LADA respecto a la diabetes tipo 2, especialmente en los primeros años del diagnóstico, y probablemente agravado por el desconocimiento tanto del paciente como del médico del proceso autoinmune/insulinopénico subyacente, acelera en nuestra población el proceso de desarrollo de aterosclerosis.

Cabe destacar que, además de la glucemia y el resto de factores clásicos de riesgo cardiovascular, hay otras alteraciones que se han asociado a la enfermedad ateromatosa y que probablemente presenten características diferenciales en la diabetes LADA respecto a los otros tipos de diabetes, como pueden ser los productos de glucosilación avanzada (AGEs) (13, 131), la alteración de la inmunidad sistémica humoral y celular (132-134), la variabilidad glucémica (135, 136), las hipoglucemias (137, 138), o la inflamación crónica de bajo grado (139).

En el momento actual, solo hay publicado otro estudio en el que se evaluó la presencia de placas carotídeas en pacientes con diabetes LADA, y se comparaba con la de los

pacientes con diabetes tipo 2, resultando una prevalencia de enfermedad ateromatosa preclínica similar en ambos grupos (98). Es importante, sin embargo, destacar que se trató de un estudio retrospectivo, realizado en población asiática, y que no fue diseñado para evaluar la ateromatosis carotídea, por lo que es difícil comparar sus resultados con los nuestros.

Dada la relevancia clínica de los hallazgos obtenidos creemos que son necesarios nuevos estudios, idealmente prospectivos y de base poblacional, para la confirmación de nuestros resultados y la investigación de la significación clínica en términos de enfermedad cardiovascular en estos pacientes.

PERFIL DE INFLAMACIÓN DE BAJO GRADO EN LOS PACIENTES CON DIABETES LADA

En este estudio, describimos el perfil inflamatorio de bajo grado en una población europea de pacientes con diabetes LADA, intermedio entre el de los pacientes con diabetes tipo 1 clásica diagnosticada en la edad adulta y el de los pacientes con diabetes tipo 2. Los marcadores que determinamos fueron: la IL-6 y la PCR-us, que se asocian al síndrome metabólico (140, 141); la adiponectina, proteína con acción hormonal con propiedades anti-inflamatorias y sensibilizadoras a la insulina, relacionada con la fisiopatología de la diabetes tipo 2 (141, 142); el recuento total de leucocitos, que está relacionado con la inflamación crónica producida por la obesidad (71); y también el receptor soluble 2 del factor de necrosis tumoral alfa (TNFRsII), que se correlaciona con la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (141), y que además está relacionado con la activación de los linfocitos T CD4⁺ reguladores, los cuales tienen un papel clave en la tolerancia a auto-antígenos (143).

En este estudio, el recuento total de leucocitos y las concentraciones de TNFRsII aumentaban gradualmente entre los pacientes con diabetes tipo 1, diabetes LADA y diabetes tipo 2, y la concentración de adiponectina seguía el patrón contrario, sin encontrarse diferencias para la IL-6. También se halló una correlación de la PCR-us, el TNFRsII y el recuento de leucocitos con los marcadores de adiposidad, siendo la correlación inversa de los tres marcadores con la concentración de cHDL.

Estudios previos, con un diseño similar al nuestro, realizados en población europea (74) y asiática (144) arrojaron resultados similares sobre el incremento gradual de TNF-A y el recuento de leucocitos entre la diabetes tipo 1 clásica, la diabetes LADA y la diabetes tipo 2, con un patrón contrario para la adiponectina. Sin embargo, al comparar las diferencias

entre grupos encontramos algunas discrepancias: en el estudio europeo (74) la concentración de TNF-A fue mayor en los pacientes con diabetes tipo 2 que en los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y diabetes LADA, pero sin encontrar diferencias entre los dos últimos grupos. Esta diferencia entre los estudios puede ser debida a que en nuestro trabajo medimos el receptor soluble 2 del TNF-A, que es una molécula más estable que el TNF-A. En el estudio en población asiática, las concentraciones de adiponectina fueron similares en los pacientes con diabetes tipo 2 clásica y diabetes LADA, y menores que en la diabetes tipo 1. La diferencia puede ser explicada por las diferencias en la adiposidad y de frecuencia de síndrome metabólico entre las dos poblaciones, siendo la prevalencia de síndrome metabólico igual entre los pacientes con diabetes tipo 2 y diabetes LADA en el estudio de Xiang *et al* (144). Por el contrario, los pacientes de nuestro estudio tenían menos frecuencia de síndrome metabólico que los pacientes con diabetes tipo 2 (artículo 1 de esta tesis doctoral).

En nuestro estudio, al contrario que en estudios previos (74, 144) no encontramos diferencias entre los tres tipos de diabetes para la IL-6. La razón de esta discrepancia puede ser que las concentraciones de IL-6 circulantes son muy bajas, con una vida media corta y una gran variabilidad diurna (145). Por el contrario, la PCR-us es más estable, y tiene una mayor vida media, por lo que se considera más adecuada como marcador de inflamación sistémica (146).

En nuestro trabajo, estos marcadores de inflamación de bajo grado no servían por sí solos para discriminar entre los tres tipos de diabetes. Realizamos un modelo multivariable de regresión logística, incluyendo estos marcadores junto a variables asociadas bien clínicamente o bien en el análisis estadístico previo, y obtuvimos unos modelos en los que los marcadores de inflamación aportaban información adicional al resto de parámetros. De estos modelos, cabe destacar el resultado obtenido para TNFRsII como predictor de riesgo para diabetes LADA comparado con el riesgo para diabetes tipo 1. TNFRsII es el receptor primario para los linfocitos T CD4⁺ reguladores, siendo fundamental para su activación (143). Los linfocitos T CD4⁺ reguladores activados son indispensables para la tolerancia para auto-antígenos; además, en pacientes con diabetes tipo 1, se ha descrito un defecto en su activación y una tendencia a la asociación con menor reserva de péptido C y peor control glucémico (147). Las concentraciones más elevadas que hemos encontrado para este marcador en la diabetes LADA podrían, por tanto, apuntar a su implicación directa en la fisiopatología de este tipo de diabetes, que tiene una progresión hacia la insulinopenia más lenta que la diabetes tipo 1.

Dado el diseño transversal de este estudio, no podemos establecer una relación de causa-efecto entre la inflamación crónica de bajo grado y el síndrome metabólico o el la autoinmunidad que presentan los pacientes. Además, el número de sujetos incluidos con diabetes autoinmune fue mucho menor que el de los pacientes con diabetes tipo 2, lo que limita el poder estadístico del estudio. La ausencia de grupo control, y de otros parámetros clínicos y epidemiológicos que influyen en el perfil inflamatorio de bajo grado es otro factor limitante. Creemos, por tanto, que es necesaria la validación de los modelos obtenidos en otras poblaciones de manera independiente.

CONCLUSIONES

Los pacientes con diabetes autoinmune latente del adulto estudiados en dos centros especializados de Cataluña presentan:

1. Un fenotipo de adiposidad y una frecuencia de síndrome metabólico intermedia entre los pacientes con diabetes tipo 1 clásica de inicio en la edad adulta y los pacientes con diabetes tipo 2.
2. Una función de célula beta basal más reducida, y un peor control glucémico que los pacientes con diabetes tipo 2.
3. Una menor función de célula beta, medida como péptido C basal, con títulos altos de anticuerpos anti-decarboxilasa del ácido glutámico 65.
4. Una capacidad de secreción de insulina intermedia entre la de los pacientes con diabetes tipo 1 clásica de inicio en la edad adulta y los pacientes con diabetes tipo 2. Sin embargo, en los primeros 18 meses de evolución de la enfermedad, esta capacidad de secreción de insulina es similar en los pacientes con diabetes LADA y diabetes tipo 2.
5. Una frecuencia de aterosclerosis carotídea preclínica comparable, e incluso mayor, a los pacientes con diabetes tipo 1 clásica y los pacientes con diabetes tipo 2. La extensión de la aterosclerosis también es mayor en los pacientes con diabetes LADA. Esta enfermedad ateromatosa carotídea solo es más avanzada que en los pacientes con diabetes tipo 2 a partir de los 6 años tras el diagnóstico de la enfermedad.
6. Un perfil de marcadores de inflamación relacionados con la adiposidad diferencial respecto a la diabetes tipo 1 clásica diagnosticada en la edad adulta y la diabetes tipo 2.
7. Un perfil de marcadores de inflamación de bajo grado que aportan un valor añadido a otros marcadores de riesgo clásicos para discriminar de los otros tipos de diabetes.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

Para conocer mejor las características clínicas de la diabetes LADA en nuestro entorno, son necesarios más estudios, idealmente de base poblacional, que requerirían de una estrategia multicéntrica nacional. Uno de los objetivos principales debería ser el de obtener una herramienta de predicción de riesgo de diabetes autoinmune ante un nuevo diagnóstico de diabetes en la edad adulta, lo que ayudaría a mejorar el tratamiento y, probablemente, el pronóstico de estos pacientes.

Para profundizar en la historia natural de la enfermedad son necesarios estudios prospectivos de secreción estimulada de péptido C mediante tests estandarizados en pacientes con diabetes LADA, y compararla con la de sus homólogos con diabetes tipo 1 clásica y diabetes tipo 2. En estos estudios, sería importante investigar la correlación entre la titulación de auto-anticuerpos circulantes y la evolución de la capacidad secretora de insulina de la célula beta. Uno de los objetivos del tratamiento en la diabetes LADA debe ser el de conservar la función de la célula beta, por lo que este test de medición de reserva pancreática es el que se debería emplear en estudios de intervención inmunomoduladora o terapéutica en estos pacientes.

En cuanto a las complicaciones crónicas de la diabetes, y, en especial, respecto a la enfermedad cardiovascular, son necesarios estudios con mayor tamaño muestral, e idealmente prospectivos para confirmar los resultados de la presente tesis doctoral. En caso de confirmarse, deben explorarse los diferentes factores potencialmente implicados.

Respecto al perfil inflamatorio de bajo grado en la diabetes LADA, para confirmar nuestros resultados son necesarios más estudios, con un mayor número de pacientes incluidos, especialmente con diabetes autoinmune e, idealmente, con una población de control. En estos estudios, deberían incluirse factores que no hemos tenido en cuenta y que pueden alterar los niveles de los biomarcadores inflamatorios, como el patrón dietético, la actividad física o las comorbilidades de la diabetes como la presencia de enfermedad cardiovascular, el hígado graso no alcohólico, o el síndrome del ovario poliquístico. Además, los estudios con diseño prospectivo ayudarían a aproximarse a las posibles relaciones de causalidad en la asociación multidireccional de adiposidad-autoinmunidad-inflamación crónica de bajo grado.

Finalmente, debemos destacar que mediante esta tesis doctoral hemos demostrado que la diabetes LADA en nuestro medio es una entidad clínica y metabólicamente diferenciada de la diabetes tipo 1 diagnosticada en la edad adulta y de la diabetes tipo 2.

En los últimos años, existe un creciente interés en la comunidad científica en relación a la heterogeneidad de la diabetes diagnosticada en la edad adulta. Los autores resaltan la importancia que el mejor conocimiento de sus bases fisiopatológicas así como de la interacción de éstas con factores ambientales, puedan tener en un mejor tratamiento para los pacientes, en línea con la medicina personalizada (2, 6 - 8, 148). Recientemente, se ha descrito como los pacientes con autoinmunidad positiva pertenecen a un grupo diferenciado en la diabetes diagnosticada en la edad adulta, con implicaciones en la evolución de la enfermedad y de su necesidad de tratamiento, y también de sus complicaciones (149). Creemos por tanto que la determinación de marcadores inmunológicos debe formar parte de la evaluación inicial ante el diagnóstico de una diabetes en la edad adulta, con el fin de poder ofrecer a los pacientes una mejor información sobre la historia natural de la enfermedad, y opciones de tratamiento más adecuadas y precisas.

BILIOGRAFÍA

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37 suppl.1:S81-90.
2. Tuomi T, Santoro N, Caprio S et al. The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet*. 2014; 383:1084-94.
3. American Diabetes Association. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018; 41(Suppl 1):S86-S104.
4. Dietel M, Jöhrens K, Laffert MV, et al. A 2015 update on predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther*. 2015; 22:417–430
5. Raz I, Riddle MC, Rosenstock J, Buse JB, Inzucchi SE, Home PD, Del Prato S, Ferrannini E, Chan JC, Leiter LA, Leroith D, DeFronzo R, Cefalu WT. Personalized management of hyperglycemia in type 2 diabetes: reflections from a Diabetes Care Editors' Expert Forum. *Diabetes Care*. 2013 Jun; 36(6):1779-88.
6. Leslie RD, Palmer J, Schloot NC, Lernmark A. Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment. *Diabetologia*. 2016. Jan; 59(1):13-20.
7. Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, Grant SF, Gavin JR 3rd, Aguilar RB. The Time Is Right for a New Classification System for Diabetes: Rationale and Implications of the β -Cell-Centric Classification Schema. *Diabetes Care*. 2016; 39(2):179-86.
8. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, Groop PH, Handelsman Y, Insel RA, Mathieu C, McElvaine AT, Palmer JP, Pugliese A, Schatz DA, Sosenko JM, Wilding JP, Ratner RE. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*. 2017; 66:241–255
9. Thomas NJ, Jones SE, Weedon MN, Shields BM, Oram RA, Hattersley AT. Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018; 6(2):122-129.
10. Hope SV, Wienand-Barnett S, Shepherd M, King SM, Fox C, Khunti K, Oram RA, Knight BA, Hattersley AT, Jones AG, Shields BM. Practical Classification Guidelines for Diabetes in patients treated with insulin: a cross-sectional study of the accuracy of diabetes diagnosis. *Br J Gen Pract*. 2016; 66(646):e315-22.
11. Howson JM, Rosinger S, Smyth DJ, Boehm BO; ADBW-END Study Group, Todd JA. Genetic analysis of adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes*. 2011; 60(10):2645-53.
12. Stenström G, Gottsäter A, Bakhtadze E, Berger B, Sundkvist G. Latent autoimmune diabetes in adults: definition, prevalence, beta-cell function, and treatment. *Diabetes*. 2005; 54 Suppl 2:S68-72.

13. Irvine WJ, Gray RS, McCallum CJ, Duncan LJP. Clinical and pathogenic significance of pancreatic-islet-cell antibodies in diabetics treated with oral hypoglycaemic agents. *Lancet*. 1977; 1:1025–1027.
14. Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR: Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes*. 1993; 42:359–362.
15. Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, Lang DA: Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med*. 1994; 11:299–303.
16. Leslie RD, Kolb H, Schloot NC, Buzzetti R, Mauricio D, De Leiva A, et al. Diabetes classification: grey zones, sound and smoke: Action LADA 1. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008; 24:511-9.
17. Naik RG, Brooks-Worrell BM, Palmer J. Latent autoimmune diabetes in adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:4635-4.
18. Fourlanos S, Dotta D, Greenbaum CJ et al. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent. *Diabetologia*. 2005; 48:2206-2212.
19. Turner R, Stratton I, Horton V et al. UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet*. 1997; 350:1288-1293.
20. Bosi EP, Garancini MP, Poggiali F, Bonifacio E, Gallus G. Low prevalence of islet autoimmunity in adult diabetes and low predictive value of islet autoantibodies in the general adult population of northern Italy. *Diabetologia*. 1999; 42(7):840-4.
21. Tuomi A, Carlsson H, Li B et al. Clinical and genetic characteristics of type 2 diabetes with and without GAD antibodies. *Diabetes* 1999; 48:150-157.
22. Soriguer-Escofet F, Esteve I, Rojo-Martinez G et al. Prevalence of latent autoimmune diabetes of adults (LADA) in Southern Spain. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002; 56:213-20.
23. Zinman B, Kahn SE, Haffner SM et al. Phenotypic characteristics of GAD antibody–positive recently diagnosed patients with type 2 diabetes in North America and Europe. *Diabetes*. 2004; 53:3193-3200.
24. Britten AC, Jones K, Törn C, Hillman M, Ekholm B, Kumar S, et al. Latent autoimmune diabetes in adults in a South Asian population of the U.K. *Diabetes Care*. 2007; 30:3088–90.
25. Buzzetti R, Di Pietro S, Giaccari A, et al. High titer of autoantibodies to GAD identifies a specific phenotype of adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes Care*. 2007; 30:932-8.
26. Lee SH, Kwon HS, Yoo SJ, Ahn YB, Yoon KH, Cha BY, Lee KW, Son HY. Identifying latent

- autoimmune diabetes in adults in Korea: the role of C-peptide and metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* 2009; 83(2):e62-5.
27. Radtke MA, Midthjell K, Nilsen TI, et al. Heterogeneity of patients with latent autoimmune diabetes in adults: linkage to autoimmunity is apparent only in those with perceived need for insulin treatment: results from the Nord-Trøndelag Health (HUNT) study. *Diabetes Care.* 2009; 32:245-50.
 28. Maioli M, Pes GM, Delitala G et al. Number of autoantibodies and HLA genotype, more than high titers of glutamic acid decarboxylase autoantibodies, predict insulin dependence in latent autoimmune diabetes of adults. *Eur J Endocrinol.* 2010; 163:541-9.
 29. Park Y, Hong S, Park L, Woo J, Baik S, Nam M, et al. LADA prevalence estimation and insulin dependency during follow-up. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011; 27:975–9.
 30. Qi X, Sun J, Wang J, Wang PP, Xu Z, Murphy M, Jia J, Wang J, Xie Y, Xu W. Prevalence and correlates of latent autoimmune diabetes in adults in Tianjin, China: a population-based cross-sectional study. *Diabetes Care.* 2011; 34:66–70.
 31. Zhou Z, Xiang Y, Ji L et al. Frequency, immunogenetics, and clinical characteristics of latent autoimmune diabetes in China (LADA China study): a nationwide, multicenter, clinic-based cross-sectional study. *Diabetes.* 2013; 62:543-50.
 32. Hawa MI, Kolb H, Schloot N et al. Adult-onset autoimmune diabetes in Europe is prevalent with a broad clinical phenotype. Action LADA 7. *Diabetes Care.* 2013; 36:908-13.
 33. Sachan A, Zaidi G, Sahu RP, Agrawal S, Colman PG, Bhatia E. Low prevalence of latent autoimmune diabetes in adults in northern India. *Diabet Med.* 2015; 32(6):810-3.
 34. Maddaloni E, Lessan N, Al Tikirti et al. Latent autoimmune diabetes in adults in the United Arab Emirates: clinical features and factors related to insulin requirement. *PLoS ONE.* 2015; 10(8):e0131837
 35. Zaharieva ET, Velikova TV, Tsakova AD, Kamenov ZA. Prevalence of Positive Diabetes-Associated Autoantibodies among Type 2 Diabetes and Related Metabolic and Inflammatory Differences in a Sample of the Bulgarian Population. *J Diabetes Res.* 2017; 2017:9016148.
 36. Stidsen JV, Henriksen JE, Olsen MH, Thomsen RW, Nielsen JS, Rungby J, Ulrichsen SP, Berencsi K, Kahlert JA, Friberg SG, Brandslund I, Nielsen AA, Christiansen JS, Sørensen HT, Olesen TB, Beck-Nielsen H. Pathophysiology-based phenotyping in type 2 diabetes: A clinical classification tool. *Diabetes Metab Res Rev.* 2018; 34(5):e3005.
 37. Wod M, Thomsen RW, Pedersen L, Yderstraede KB, Beck-Nielsen H, Højlund K. Lower mortality and cardiovascular event rates in patients with Latent Autoimmune Diabetes In Adults (LADA) as compared with type 2 diabetes and insulin deficient diabetes: A cohort study of 4368 patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018; 139:107-113.

38. Laugesen E, Østergaard JA, Leslie RD et al. Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. *Diabet Med.* 2015; 32:843-52.
39. Huang G, Yin M, Xiang Y, Li X, Shen W, Luo S, Lin J, Xie Z, Zheng P, Zhou Z. Persistence of glutamic acid decarboxylase antibody (GADA) is associated with clinical characteristics of latent autoimmune diabetes in adults: a prospective study with 3-year follow-up. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016 Sep; 32(6):615-22.
40. Brophy S, Yderstraede K, Mauricio D et al. Time to insulin initiation cannot be used in defining autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Care.* 2008; 31:439-41.
41. Hjort R, Alfredsson L, Andersson T, Carlsson PO, Grill V, Groop L, Martinell M, Rasouli B, Storm P, Tuomi T, Carlsson S. Family history of type 1 and type 2 diabetes and risk of latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Diabetes Metab.* 2017; 43(6):536-542.
42. Horton V, Stratton I, Bottazzo GF, Shattock M, Mackay I, Zimmet P, Manley S, Holman R, Turner R. Genetic heterogeneity of autoimmune diabetes: age of presentation in adults is influenced by HLA DRB1 and DQB1 genotypes (UKPDS 43). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Diabetologia.* 1999; 42(5):608-16.
43. Desai M, Zeggini E, Horton VA, Owen KR, Hattersley AT, Levy JC, Walker M, Gillespie KM, Bingley PJ, Hitman GA, Holman RR, McCarthy MI, Clark A. An association analysis of the HLA gene region in latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetologia.* 2007; 50(1):68-73.
44. Cervin C, Lyssenko V, Bakhtadze E, Lindholm E, Nilsson P, Tuomi T, Cilio CM, Groop L. Genetic similarities between latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2008; 57(5):1433-7.
45. Furlanos S, Elkassaby S, Varney MD, Colman PG, Harrison LC. Higher body mass index in adults at diagnosis of the slowly progressive form of type 1 diabetes mellitus is associated with lower risk HLA genes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014; 104(3):e69-71.
46. Andersen MK, Lundgren V, Turunen JA et al. Latent autoimmune diabetes in adults differs genetically from classical type 1 diabetes diagnosed after the age of 35 years. *Diabetes Care.* 2010; 33:2062-64.
47. Luo S, Lin J, Xie Z, Xiang Y, Zheng P, Huang G, Li X, Liao Y, Hagopian WA, Wang CY, Zhou Z. HLA Genetic Discrepancy Between Latent Autoimmune Diabetes in Adults and Type 1 Diabetes: LADA China Study No. 6. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101(4):1693-700.
48. Cosentino A, Gambelunghe G, Tortoioli C, Falorni A. CTLA-4 gene polymorphism contributes to the genetic risk for latent autoimmune diabetes in adults. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 958:337-40.
49. Petrone A, Suraci C, Capizzi M et al. The protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22 (PTPN22) is associated with high GAD antibody titer in latent autoimmune diabetes in adults: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study 3. *Diabetes Care.* 2008; 3:534-8.

50. Dong F, Yang G, Pan HW, Huang WH, Jing LP, Liang WK, Zhang N, Zhang BH, Wang M, Liu Y, Zhang LJ, Zhang SH, Li H, Chen C, Nie LH, Jing CX. The association of PTPN22 rs2476601 polymorphism and CTLA-4 rs231775 polymorphism with LADA risks: a systematic review and meta-analysis. *Acta Diabetol.* 2014; 51(5):691-703.
51. Zhang N, Huang W, Dong F, Liu Y, Zhang B, Jing L, Wang M, Yang G, Jing C. Insulin gene VNTR polymorphisms -2221Mspl and -23HphI are associated with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: a meta-analysis. *Acta Diabetol.* 2015; 52(6):1143-55.
52. Lukacs K, Hosszufalusi N, Dinya E, Bakacs M, Madacsy L, Panczel P. The type 2 diabetes-associated variant in TCF7L2 is associated with latent autoimmune diabetes in adult Europeans and the gene effect is modified by obesity: a meta-analysis and an individual study. *Diabetologia.* 2012; 55(3): 689–93.
53. Zampetti S, Spoletini M, Petrone A, Capizzi M, Arpi ML, Tiberti C, Di Pietro S, Bosi E, Pozzilli P, Giorgino F, et al. Association of TCF7L2 gene variants with low GAD autoantibody titre in LADA subjects (NIRAD Study 5). *Diabet Med.* 2010; 27(6):701–4.
54. Andersen MK, Sterner M, Forsén T, Käräjämäki A, Rolandsson O, Forsblom C, Groop PH, Lahti K, Nilsson PM, Groop L, Tuomi T. Type 2 diabetes susceptibility gene variants predispose to adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetologia.* 2014; 57:1859–1868.
55. Mishra R, Chesi A, Cousminer DL, Hawa MI, Bradfield JP, Hodge KM, Guy VC, Hakonarson H; Bone Mineral Density in Childhood Study, Mauricio D, Schloot NC, Yderstræde KB, Voight BF, Schwartz S, Boehm BO, Leslie RD, Grant SFA. Relative contribution of type 1 and type 2 diabetes loci to the genetic etiology of adult-onset, non-insulin-requiring autoimmune diabetes. *BMC Med.* 2017; 15(1):88.
56. Signore A, Capriotti G, Chianelli M, Bonanno E, Galli F, Catalano C, Quintero AM, De Toma G, Manfrini S, Pozzilli P; Action LADA Group. Detection of insulinitis by pancreatic scintigraphy with 99mTc-labeled IL-2 and MRI in patients with LADA (Action LADA 10). *Diabetes Care.* 2015; 38(4):652-8.
57. Hosszúfalusi N, Vatay A, Rajczy K et al. Similar genetic features and different islet cell autoantibody pattern of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) compared with adult-onset type 1 diabetes with rapid progression. *Diabetes Care.* 2003; 26:452-7.
58. Lampasona V, Petrone A, Tiberti C et al. Zinc transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) 4. *Diabetes Care.* 2010; 33:104–108.
59. Borg H, Gottsäter A, Fernlund P, Sundkvist G. A 12-year prospective study of the relationship between islet antibodies and beta-cell function at and after the diagnosis in patients with adult-onset diabetes. *Diabetes.* 2002; 51(6):1754-62.
60. Desai M, Cull CA, Horton VA, Christie MR, Bonifacio E, Lampasona V, Bingley PJ, Levy JC,

- Mackay IR, Zimmet P, Holman RR, Clark A. GAD autoantibodies and epitope reactivities persist after diagnosis in latent autoimmune diabetes in adults but do not predict disease progression: UKPDS 77. *Diabetologia*. 2007; 50(10):2052-60.
61. Falorni A, Gambelunghe G, Forini F, Kassi G, Cosentino A, Candeloro P, Bolli GB, Brunetti P, Calcinaro F. Autoantibody recognition of COOH-terminal epitopes of GAD65 marks the risk for insulin requirement in adult-onset diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85(1):309-16.
 62. Nalk RG, Brooks-Worrell BM, Palmer JP. Latent autoimmune diabetes in adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:4635-44.
 63. Achenbach P, Hawa MI, Krause S, Lampasona V, Jerram ST, Williams AJK, Bonifacio E, Ziegler AG, Leslie RD; Action LADA consortium. Autoantibodies to N-terminally truncated GAD improve clinical phenotyping of individuals with adult-onset diabetes: Action LADA 12. *Diabetologia*. 2018; 61(7):1644-1649.
 64. Tiberti C, Giordano C, Locatelli M, Bosi E, Bottazzo GF, Buzzetti R, Cucinotta D, Galluzzo A, Falorni A, Dotta F. Identification of tyrosine phosphatase 2(256-760) construct as a new, sensitive marker for the detection of islet autoimmunity in type 2 diabetic patients: the non-insulin requiring autoimmune diabetes (NIRAD) study 2. *Diabetes*. 2008; 57(5):1276-83.
 65. Buzzetti R, Spoletini M, Zampetti S, Campagna G, Marandola L, Panimolle F, Dotta F, Tiberti C; NIRAD Study Group (NIRAD 8). Tyrosine phosphatase-related islet antigen 2(256–760) autoantibodies, the only marker of islet autoimmunity that increases by increasing the degree of BMI in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2015; 38:513-520.
 66. Zampetti S, Campagna G, Tiberti C, Songini M, Arpi ML, De Simone G, Cossu E, Cocco L, Osborn J, Bosi E, Giorgino F, Spoletini M, Buzzetti R; NIRAD Study Group. High GADA titer increases the risk of insulin requirement in LADA patients: a 7-year follow-up (NIRAD study 7). *Eur J Endocrinol*. 2014; 171(6):697-704.
 67. Pettersen E, Skorpen F, Kvaløy K, Midthjell K, Grill V. Genetic heterogeneity in latent autoimmune diabetes is linked to various degrees of autoimmune activity: results from the Nord-Trøndelag Health Study. *Diabetes*. 2010; 59(1):302-10.
 68. Schloot NC, Pham MN, Hawa MI, Pozzilli P, Scherbaum WA, Schott M, Kolb H, Hunter S, Scherthaner G, Thivolet C, Seissler J, Leslie RD; Action LADA Group. Inverse Relationship Between Organ-Specific Autoantibodies and Systemic Immune Mediators in Type 1 Diabetes and Type 2 Diabetes: Action LADA 11. *Diabetes Care*. 2016; 39(11):1932-1939.
 69. Zampetti S, Capizzi M, Spoletini M, Campagna G, Leto G, Cipolloni L, Tiberti C, Bosi E, Falorni A, Buzzetti R; NIRAD Study Group. GADA titer-related risk for organ-specific autoimmunity in LADA subjects subdivided according to gender (NIRAD study 6). *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97(10):3759-65.

70. Fernández-Real JM, Pickup JC. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*, 2008; 19:10–16.
71. Fernández-Real JM, Pickup JC. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2012; 55:273–278.
72. Hull CM, Peakman M, Tree TIM. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? *Diabetologia*. 2017; 60(10):1839-1850.
73. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018; 391(10138):2449-2462.
74. Pham MN, Hawa MI, Pflieger C, Roden M, Schernthaner G, Pozzilli P, Buzzetti R, Scherbaum WA, Seissler J, Kolb H, Hunter S, Leslie RD, Schloot NC; Action LADA Study Group. Pro- and anti-inflammatory cytokines in latent autoimmune diabetes in adults, type 1 and type 2 diabetes patients: Action LADA 4. *Diabetologia*. 2011; 54(7):1630-8.
75. Xiang Y, Zhou P, Li X, Huang G, Liu Z, Xu A, Leslie RD, Zhou Z. Heterogeneity of altered cytokine levels across the clinical spectrum of diabetes in China. *Diabetes Care*. 2011; 34(7):1639-41.
76. Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2004 Apr 28; 291(16):1978-86.
77. Pham MN, Hawa MI, Roden M, Schernthaner G, Pozzilli P, Buzzetti R, Scherbaum WA, Seissler J, Hunter S, Leslie RD, Kolb H, Schloot NC; Action LADA Study Group. Increased serum concentrations of adhesion molecules but not of chemokines in patients with Type 2 diabetes compared with patients with Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adult age: action LADA 5. *Diabet Med*. 2012; 29(4):470-8.
78. Carlsson A, Sundqvist G, Groop L, Tuomi T. Insulin and glucagon secretion in patients with slowly progressing autoimmune diabetes (LADA). *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:76–80.
79. Juhl CB, Bradley U, Holst JJ, Leslie RD, Yderstraede KB, Hunter S; Action LADA Consortium. Similar weight-adjusted insulin secretion and insulin sensitivity in short-duration late autoimmune diabetes of adulthood (LADA) and type 2 diabetes: Action LADA 9 [corrected]. *Diabet Med*. 2014; 31(8):941-5.
80. Niskanen LK, Tuomi T, Karjalainen J, Groop LC, Uusitupa MI. GAD antibodies in NIDDM. Ten-year follow-up from the diagnosis. *Diabetes Care*. 1995; 18(12):1557-65.
81. Yang L, Zhou Z-G, Huang G, Ouyang L-L, Li X, Yan X. Six-year follow-up of pancre[atic β -cell function in adults with latent autoimmune diabetes. *World J Gastroenterol*. 2005; 11:2900–5.
82. Chaillous L, Bouhanick B, Kerlan V, Mathieu E, Lecomte P, Ducluzeau PH, Delamaire M, Sonnet E, Maugendre D, Maréchaud R, Rohmer V, Saï P, Charbonnel B. Clinical and metabolic characteristics of patients with latent autoimmune diabetes in adults (LADA):

- absence of rapid beta-cell loss in patients with tight metabolic control. *Diabetes Metab.* 2010; 36:64–70.
83. Lee SA, Lee WJ, Kim EH, Yu JH, Jung CH, Koh EH, Kim MS, Park JY, Lee KU. Progression to insulin deficiency in Korean patients with Type 2 diabetes mellitus positive for anti-GAD antibody. *Diabet Med.* 2011; 28(3):319-24.
 84. Thunander M, Thorgeirsson H, Törn C, Petersson C, Landin-Olsson M. β -cell function and metabolic control in latent autoimmune diabetes in adults with early insulin versus conventional treatment: a 3-year follow-up. *Eur J Endocrinol.* 2011; 164(2):239-45.
 85. Liu L, Li X, Xiang Y et al. Latent autoimmune diabetes in adults with low-titer GAD antibodies: similar disease progression with type 2 diabetes: a nationwide, multicenter prospective study (LADA China Study 3). *Diabetes Care.* 2015; 38:16-21
 86. Behme MT, Dupre J, Harris SB, Hramiak IM, Mahon JL. Insulin resistance in latent autoimmune diabetes of adulthood. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1005:374-7.
 87. Rosário PW, Reis JS, Amim R, Fagundes TA, Calsolari MR, Silva SC, Purisch S. Comparison of clinical and laboratory characteristics between adult-onset type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Care.* 2005; 28(7):1803-4.
 88. Chiu HK, Tsai EC, Juneja R, Stoeber J, Brooks-Worrell B, Goel A, Palmer JP. Equivalent insulin resistance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 77(2):237-44.
 89. Davis TM, Wright AD, Mehta ZM, Cull CA, Stratton IM, Bottazzo GF, Bosi E, Mackay IR, Holman RR. Islet autoantibodies in clinically diagnosed type 2 diabetes: prevalence and relationship with metabolic control (UKPDS 70). *Diabetologia.* 2005; 48(4):695-702.
 90. Hawa MI, Thivolet C, Mauricio D, Alemanno I, Cipponeri E, Collier D, Hunter S, Buzzetti R, de Leiva A, Pozzilli P, Leslie RD; Action LADAGroup. Metabolic syndrome and autoimmune diabetes: action LADA 3. *Diabetes Care.* 2009; 32(1):160-4.
 91. Hawa MI, Buchan AP, Ola T, Wun CC, DeMicco DA, Bao W, Betteridge DJ, Durrington PN, Fuller JH, Neil HA, Colhoun H, Leslie RD, Hitman GA. LADA and CARDS: A Prospective Study of Clinical Outcome in Established Adult-Onset Autoimmune Diabetes. *Diabetes Care.* 2014; 37:1643-9.
 92. Juneja R, Hirsch IB, Naik RG, Brooks-Worrell BM, Greenbaum CJ, Palmer JP. Islet cell antibodies and glutamic acid decarboxylase antibodies, but not the clinical phenotype, help to identify type 1(1/2) diabetes in patients presenting with type 2 diabetes. *Metabolism.* 2001 Sep; 50(9):1008-13.
 93. Fourlanos S, Perry C, Stein MS et al. A clinical screening tool identifies autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Care.* 2006; 29:970-5.

94. Isomaa B, Almgren P, Henricsson M et al. Chronic complications in patients with slowly progressing autoimmune type 1 diabetes (LADA). *Diabetes Care*. 1999; 22:1347-53.
95. Myhill P, Davis WA, Bruce DG, Mackay IR, Zimmet P, Davis TM. Chronic complications and mortality in community-based patients with latent autoimmune diabetes in adults: the Fremantle Diabetes Study. *Diabet Med*. 2008; 25(10):1245-50.
96. Radtke MA, Lund Nilsen TI, Midthjell K, Grill V. Urinary albumin excretion in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) is more similar to type 2 than type 1 diabetes: results of the Nord-Trøndelag Health Study 1995-1997. *Diabetes Metab*. 2009; 35(4):273-9.
97. Olsson L, Grill V, Midthjell K, Ahlbom A, Andersson T, Carlsson S. Mortality in adult-onset autoimmune diabetes is associated with poor glycemic control: results from the HUNT Study. *Diabetes Care*. 2013; 36(12):3971-8.
98. Lu J, Hou X, Zhang L, Hu C, Zhou J, Pang C, Pan X, Bao Y, Jia W. Associations between clinical characteristics and chronic complications in latent autoimmune diabetes in adults and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015; 31(4):411-20.
99. Martinell M, Dorkhan M, Stålhammar J, Storm P, Groop L, Gustavsson C. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy at diagnosis (DRAD) in patients recently diagnosed with type 2 diabetes (T2D) or latent autoimmune diabetes in the adult (LADA). *J Diabetes Complications*. 2016; 30(8):1456-1461.
100. Agardh CD, Lynch KF, Palmér M et al. GAD65 vaccination: 5 years of follow-up in a randomised dose-escalating study in adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetologia*. 2009; 52: 1363-8.
101. Andersen CD, Bennet L, Nyström L et al. Worse glycaemic control in LADA patients than in those with type 2 diabetes, despite a longer time on insulin therapy. *Diabetologia*. 2013; 56:252-8.
102. Maruyama T, Tanaka S, Shimada A, Funae O, Kasuga A, Kanatsuka A, Takei I, Yamada S, Harii N, Shimura H, Kobayashi T. Insulin intervention in slowly progressive insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93:2115-21.
103. Brophy S, Davies H, Mannan S, Brunt H, Williams R. Interventions for latent autoimmune diabetes (LADA) in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; 9:CD006165.
104. Yang Z, Zhou Z, Li X, Huang G, Lin J. Rosiglitazone preserves islet beta-cell function of adult-onset latent autoimmune diabetes in 3 years follow-up study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009; 83(1):54-60.
105. Zhao Y, Yang L, Xiang Y et al. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin maintains β -cell function in patients with recent-onset latent autoimmune diabetes in adults: one year prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99: E876-80.

106. Johansen OE, Boehm BO, Grill V et al. C-peptide levels in latent autoimmune diabetes in adults treated with linagliptin versus glimepiride: exploratory results from a 2-year double-blind, randomized, controlled study. *Diabetes Care*. 2014; 37:e11-2.
107. Buzzetti R, Pozzilli P, Frederich R, Iqbal N, Hirshberg B. Saxagliptin improves glycaemic control and C-peptide secretion in latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Diabetes Metab Res Rev*. 2016; 32(3):289–96.
108. Pozzilli P, Leslie RD, Peters AL, Buzzetti R, Shankar SS, Milicevic Z, Pavo I, Lebrech J, Martin S, Schloot NC. Dulaglutide treatment results in effective glycaemic control in latent autoimmune diabetes in adults (LADA): A post-hoc analysis of the AWARD-2, -4 and -5 Trials. *Diabetes Obes Metab*. 2018; 20(6):1490-1498.
109. Jones AG, McDonald TJ, Shields BM, Hill AV, Hyde CJ, Knight BA, Hattersley AT; PRIBA Study Group. Markers of β -Cell Failure Predict Poor Glycemic Response to GLP-1 Receptor Agonist Therapy in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2016; 39(2):250-7.
110. Burke KR, Schumacher CA, Harpe SE. SGLT2 Inhibitors: A Systematic Review of Diabetic Ketoacidosis and Related Risk Factors in the Primary Literature. *Pharmacotherapy*. 2017; 37(2):187-194.
111. Østergaard JA, Laugesen E, Leslie RD. Should There be Concern About Autoimmune Diabetes in Adults? Current Evidence and Controversies. *Curr Diab Rep*. 2016; 16(9):82.
112. Buzzetti R, Zampetti S, Maddaloni E. Adult-onset autoimmune diabetes: current knowledge and implications for management. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13(11):674-686.
113. Andersen MK, Härkönen T, Forsblom C, Groop PH, Knip M, Tuomi T. Zinc transporter type 8 autoantibodies (ZnT8A): prevalence and phenotypic associations in latent autoimmune diabetes patients and patients with adult onset type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 2013; 46(4):251-8.
114. Arranz Martín A, Lecumberri Pascual E, Brito Sanfiel MÁ, Andía Melero V, Nattero Chavez L, Sánchez López I, Cánovas Molina G, Arrieta Blanco F, González Perez Del Villar N; Grupo de Diabetes de la Sociedad de Endocrinología, Nutrición y Diabetes de Madrid (SENDIMAD). Clinical and metabolic profile of patients with latent autoimmune diabetes in adults in specialized care in Madrid. *Endocrinol Diabetes Nutr*. 2017; 64(1):34-39.
115. Greenbaum CJ, Mandrup-Poulsen T, McGee PF, Battelino T, Haastert B, Ludvigsson J, Pozzilli P, Lachin JM, Kolb H; Type 1 Diabetes Trial Net Research Group; European C-Peptide Trial Study Group. Mixed-meal tolerance test versus glucagon stimulation test for the assessment of beta-cell function in therapeutic trials in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2008; 31(10):1966-71.
116. Rawshani A, Rawshani A, Gudbjörnsdóttir S. Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017; 377(3):300-301.

117. van der Meer IM, Bots ML, Hofman A, del Sol AI, van der Kuip DA, Witteman JC. Predictive value of noninvasive measures of atherosclerosis for incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 2004; 109(9):1089-94
118. Wyman RA, Mays ME, McBride PE, Stein JH. Ultrasound-detected carotid plaque as a predictor of cardiovascular events. *Vasc Med*. 2006; 11(2):123-30.
119. Rundek T, Arif H, Boden-Albala B, Elkind MS, Paik MC, Sacco RL. Carotid plaque, a subclinical precursor of vascular events: the Northern Manhattan Study. *Neurology*. 2008; 70(14):1200-7.
120. Nambi V, Chambless L, Folsom AR, He M, Hu Y, Mosley T, Volcik K, Boerwinkle E, Ballantyne CM. Carotid intima-media thickness and presence or absence of plaque improves prediction of coronary heart disease. The ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) Study. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 55(15):1600-7.
121. Störk S, van den Beld AW, von Schacky C, Angermann CE, Lamberts SW, Grobbee DE, Bots ML. Carotid artery plaque burden, stiffness, and mortality risk in elderly men: a prospective, population-based cohort study. *Circulation*. 2004; 110(3):344-8.
122. Khaw KT, Wareham N, Luben R, Bingham S, Oakes S, Welch A, Day N. Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of european prospective investigation of cancer and nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ*. 2001; 322(7277):15-8.
123. Eskesen K, Jensen MT, Galatius S, Vestergaard H, Hildebrandt P, Marott JL, Jensen JS. Glycated haemoglobin and the risk of cardiovascular disease, diabetes and all-cause mortality in the Copenhagen City Heart Study. *J Intern Med*. 2013 Jan;273(1):94-101.
124. Lind M, Svensson AM, Kosiborod M, Gudbjörnsdottir S, Pivodic A, Wedel H, Dahlqvist S, Clements M, Rosengren A. Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2014; 371(21):1972-82.
125. Matuleviciene-Anängen V, Rosengren A, Svensson AM, Pivodic A, Gudbjörnsdottir S, Wedel H, Kosiborod M, Haraldsson B, Lind M. Glycaemic control and excess risk of major coronary events in persons with type 1 diabetes. *Heart*. 2017; 103(21):1687-1695.
126. Tancredi M, Rosengren A, Svensson AM, Kosiborod M, Pivodic A, Gudbjörnsdottir S, Wedel H, Clements M, Dahlqvist S, Lind M. Excess Mortality among Persons with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2015; 373(18):1720-32.
127. Juutilainen A, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Similarity of the impact of type 1 and type 2 diabetes on cardiovascular mortality in middle-aged subjects. *Diabetes Care*. 2008; 31(4):714-9.
128. Paul SK, Klein K, Thorsted BL, Wolden ML, Khunti K. Delay in treatment intensification increases the risks of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:100.

129. Donnelly LA, Zhou K, Doney ASF, Jennison C, Franks PW, Pearson ER. Rates of glycaemic deterioration in a real-world population with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2018; 61(3):607-615.
130. Kilhovd BK, Juutilainen A, Lehto S, Rönnemaa T, Torjesen PA, Hanssen KF, Laakso M. Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes: a population-based 18 year follow-up study. *Diabetologia*. 2007; 50(7):1409-17.
131. [Monnier2015] Monnier VM, Sun W, Gao X, Sell DR, Cleary PA, Lachin JM, Genuth S; DCCT/EDIC Research Group. Skin collagen advanced glycation endproducts (AGEs) and the long-term progression of sub-clinical cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2015; 14:118.
132. Legein B, Temmerman L, Biessen EA, Lutgens E. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(20):3847-69.
133. Matsuura E, Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Turiel M, Lopez LR, Nurmohamed MT. Is atherosclerosis an autoimmune disease? *BMC Med*. 2014; 12:47.
134. Sanjadi M, Rezvanie Sichanie Z, Totonchi H, Karami J, Rezaei R, Aslani S. Atherosclerosis and autoimmunity: a growing relationship. *Int J Rheum Dis*. 2018; 21(5):908-921.
135. Gorst C, Kwok CS, Aslam S, Buchan I, Kontopantelis E, Myint PK, Heatlie G, Loke Y, Rutter MK, Mamas MA. Long-term Glycemic Variability and Risk of Adverse Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care*. 2015; 38(12):2354-69.
136. Lachin JM, Bebu I, Bergenstal RM, Pop-Busui R, Service FJ, Zinman B, Nathan DM; DCCT/EDIC Research Group. Association of Glycemic Variability in Type 1 Diabetes With Progression of Microvascular Outcomes in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*. 2017; 40(6):777-783.
137. Giménez M, Gilabert R, Monteagudo J, Alonso A, Casamitjana R, Paré C, Conget I. Repeated episodes of hypoglycemia as a potential aggravating factor for preclinical atherosclerosis in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34(1):198-203.
138. Kiec-Wilk B, Matejko B, Razny U, Stankiewicz M, Skupien J, Klupa T, Malecki MT. Hypoglycemic episodes are associated with inflammatory status in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2016; 251:334-338.
139. Legein B, Temmerman L, Biessen EA, Lutgens E. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(20):3847-69.
140. Levine TB, Levine AB. Inflammation. En: *Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease*. 2^a ed. Levine TB, Levine AB, Eds. Oxford, U.K., Wiley- Blackwell, 2013, p. 192–227
141. Liu C, Feng X, Li Q, Wang Y, Li Q, Hua M. Adiponectin, TNF- α and

- inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine*. 2016; 86:100-109.
142. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009; 302(2):179-88.
 143. Chen X, Wu X, Zhou Q, Howard OM, Netea MG, Oppenheim JJ. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol*. 2013;190(3):1076-84.
 144. Xiang Y, Zhou Z, Deng C, Leslie RD. Latent autoimmune diabetes in adults in Asians: similarities and differences between East and West. *J Diabetes*. 2013; 5(2):118-26.
 145. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2002; 347(20):1557-65.
 146. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2000; 102(9):1000-6.
 147. Haseda F, Imagawa A, Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Hanafusa T. CD4+ CD45RA-FoxP3high activated regulatory T cells are functionally impaired and related to residual insulin-secreting capacity in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2013 Aug;173(2):207-16.
 148. McCarthy MI. Painting a new picture of personalised medicine for diabetes. *Diabetologia*. 2017 May;60(5):793-799.
 149. Ahlqvist E, Storm P, Käräjämäki A, Martinell M, Dorkhan M, Carlsson A, Vikman P, Prasad RB, Aly DM, Almgren P, Wessman Y, Shaat N, Spégel P, Mulder H, Lindholm E, Melander O, Hansson O, Malmqvist U, Lernmark Å, Lahti K, Forsén T, Tuomi T, Rosengren AH, Groop L. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018; 6(5):361-369.