



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>

**PREVALÈNÇA DE MALALTIA CARDIOVASCULAR SUBCLÍNICA I ASSOCIACIÓ
AMB FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS NO CLÀSSICS EN EL PACIENT AMB
DIABETIS MELLITUS TIPUS 1**

Tesi doctoral presentada per
Enric Serra Planas
per optar al grau de DOCTOR i en seguiment del PROGRAMA DE DOCTORAT EN MEDICINA
del DEPARTAMENT DE MEDICINA

Treball realitzat sota la direcció de
Eva Aguilera Hurtado i Manel Puig Domingo
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

FACULTAT DE MEDICINA

Barcelona, 2018

ABREVIATURES

- **FRCV:** factor de risc cardiovascular
- **DM1:** diabetis mellitus tipus 1
- **MAC:** malaltia arterial coronària
- **MCV:** malaltia cardiovascular
- **25OHD:** 25-hidroxivitamina D
- **EHNA:** esteatosi hepàtica no alcohòlica
- **CAC:** calcificació arterial coronària
- **GIMC:** gruix íntima-mitja carotidi
- **DM2:** diabetis mellitus tipus 2
- **AHA:** *American Heart Association*
- **CV:** cardiovascular
- **HbA1c:** hemoglobina glicosilada A1c
- **HDLc:** colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat
- **PAs:** pressió arterial sistòlica
- **PESA:** *Progression of Early Subclinical Atherosclerosis*
- **TC:** tomografia computeritzada
- **CACs:** calcificació arterial coronària score
- **UA:** unitats d'Agatston
- **ECG:** electrocardiograma
- **ITB:** índex turmell-braç
- **CACTI:** *Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes Study*
- **IMC:** índex de massa corporal
- **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
- **RI:** resistència a la insulina
- **VLDLc:** colesterol unit a lipoproteïnes de molt baixa densitat
- **PAI-1:** inhibidor de l'activador del plasminogen 1
- **LDLc:** colesterol unit a lipoproteïnes de baixa densitat
- **PCR:** proteïna C reactiva
- **PAd:** pressió arterial diastòlica
- **IL:** interleucina
- **TNF:** factor de necrosi tumoral
- **Th1:** activació limfocitària T cooperadora tipus 1
- **Th2:** activació limfocitària T cooperadora tipus 2
- **1,25OHD:** 1 α ,25-dihidroxivitamina D
- **PTH:** parathormona
- **DCCT:** *Diabetes Control and Complications Study*

- **EDIC:** *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*
- **PCR-as:** proteïna C reactiva d'alta sensibilitat
- **NCEP-ATP III:** *National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III*
- **SCORE:** *Systematic Coronary Risk Evaluation*
- **REGICOR:** registre gironí del cor
- **IAM:** infart agut de miocardi
- **UKPDS:** *United Kingdom Prospective Diabetes Study*
- **ADA:** *American Diabetes Association*
- **EURODIAB:** *European Diabetes Prospective Complications Study*
- **ARIC:** *Atherosclerosis Risk in Communities*
- **ACC:** artèria caròtida comú
- **ACI:** artèria caròtida interna
- **UH:** unitats Hounsfield
- **mm:** mil·límetres
- **ESC:** *European Society of Cardiology*
- **EASD:** *European Association for the Study of Diabetes*

SUMARI

Abreviatures	2
Sumari	5
Breu resum	8
Agraïments	12
1. Presentació de la tesi	14
2. Introducció	16
2.1. La diabetis mellitus i la malaltia cardiovascular	17
2.1.1. Prevalença de la diabetis mellitus.....	17
2.1.2. Prevalença de malaltia cardiovascular.....	17
2.1.3. Malaltia cardiovascular subclínica.....	19
2.2. L'arterioesclerosi en la diabetis mellitus	21
2.2.1. Arterioesclerosi en la diabetis mellitus.....	21
2.2.2. Ateroesclerosi en la diabetis mellitus tipus 1.....	23
2.3. Factors de risc cardiovascular clàssics, arterioesclerosi i diabetis mellitus	27
2.4. Factors de risc cardiovascular no clàssics, arterioesclerosi i diabetis mellitus	29
2.4.1. Vitamina D.....	31
2.4.2. Marcadors inflamatoris.....	37
2.4.3. Malaltia hepàtica per dipòsit de greix no alcohòlica.....	43
2.5. Aproximació diagnòstica de l'arterioesclerosi en la diabetis mellitus	48
2.5.1. Avaluació del risc cardiovascular en el pacient amb diabetis mellitus	48
2.5.1.1. Taules de risc cardiovascular.....	48
2.5.1.2. Índex turmell-braç.....	50
2.5.1.3. Ecografia carotídia.....	51
2.5.1.4. Calcificació arterial coronària.....	53
2.5.2. Cribratge de l'arterioesclerosi subclínica en pacients amb diabetis asimptomàtics	57
2.5.3. Malaltia cardiovascular subclínica en el pacient amb diabetis mellitus tipus 1	59
2.5.3.1. Prevalença de malaltia cardiovascular subclínica segons calcificació coronària.....	59
2.5.3.2. Prevalença de malaltia cardiovascular subclínica segons ecografia carotídia.....	60
2.5.3.3. Prevalença d'ateroesclerosi precoç per presència de	62

plaques ateromatoses carotídi	
3. Hipòtesi de treball	63
4. Objectius de treball	67
5. Estudis publicats	70
5.1. Primer estudi	71
5.2. Segon estudi	85
5.3. Tercer estudi	102
5.4. Quart estudi	110
6. Resum global dels resultats	129
7. Resum global de la discussió dels resultats	132
8. Conclusions	148
9. Línies de futur	150
10. Referències	152

BREU RESUM

La millora en el control dels diferents factors de risc cardiovascular (FRCV) clàssics que afecten els pacients amb diabetis mellitus tipus 1 (DM1), no ha aconseguit que la malaltia arterial coronària (MAC) deixi de ser la causa primordial de morbimortalitat en aquesta població. La reconeguda rellevància d'aquest tema contrasta amb la controvèrsia sobre la necessitat d'un cribratge cardiovascular entre els pacients amb DM1, la disparitat d'opinions sobre el potencial diagnòstic de les proves d'imatge per a la detecció de la malaltia cardiovascular (MCV) subclínica i l'existent debat sobre el paper de determinats FRCV no clàssics com la vitamina D, marcadors inflamatoris diversos o la coexistència d'esteatosi hepàtica en l'arterioesclerosi precoç que pateixen aquests pacients.

En aquest treball de tesi s'ha realitzat un estudi minuciós d'una cohort de malalts de l'àrea Mediterrània afectes de DM1, asimptomàtics i amb més de 10 anys d'evolució de la malaltia, mitjançant la caracterització clínica, l'anàlisi de paràmetres sèrics de potencial rellevància (adiponectina, l'YKL-40, 25-hidroxivitamina D (25OHD), etc.) i l'estudi ecogràfic hepàtic per a la detecció d'esteatosi hepàtica no alcohòlica (EHNA). Aquesta informació s'ha correlacionat amb dades d'ateroesclerosi precoç obtingudes mitjançant l'estudi de la calcificació arterial coronària (CAC) per tomografia i la mesura del gruix de la capa íntima-mitja arterial mitjançant l'ecografia carotídia.

La realització del estudis sobre una mostra de pacients amb DM1 de la nostra àrea va revelar una molt reduïda prevalença de MCV subclínica i una correlació entre els resultats de l'ecografia carotídia i la quantificació del calci coronari que assenyalaren el potencial d'aquestes proves pel diagnòstic de la MCV subclínica en els pacients amb DM1. En la investigació dels FRCV no clàssics associats a la presència de MCV subclínica es van descartar les concentracions de 25OHD i els marcadors sèrics com l'adiponectina o l'YKL-40. Per contra, en l'estudi univariant del quart treball es va demostrar una associació significativa entre la presència d'ateroesclerosi carotídia i d'esteatosi hepàtica.

Es conclou que, en el nostre territori, existeix una molt baixa prevalença de MCV subclínica entre els pacients amb DM1 que no en justifica el cribratge generalitzat però que, en pacients determinats, disposem de proves diagnòstiques per a la seva detecció. Així doncs, en l'estudi del pacient amb DM1 de l'àrea Mediterrània i, basant-nos en les dades obtingudes, ens podem valdre de

l'ecografia carotídia per a la detecció i de l'ecografia abdominal per a l'estratificació del risc cardiovascular. El coneixement més profund de la MCV subclínica en els pacients amb DM1 de la nostra àrea quant a prevalença, mètodes de diagnosi adequats, gravetat i factors associats ens ajudaria a dissenyar intervencions preventives, terapèutiques i de seguiment potencialment més dirigides i eficaces.

The control improvement of classical cardiovascular risk factors that affect patients with type 1 diabetes mellitus, has not been able to stop coronary artery disease from being the primary cause of morbidity and mortality in this population. The acknowledged relevance of this issue contrasts with the controversy over the need for cardiovascular screening among these patients, the disparity of opinions about the diagnostic potential of imaging tests in subclinical cardiovascular disease detection and the existing debate about the role of certain non-classical cardiovascular risk factors in the early arterioesclerosis of these patients such as vitamin D, various inflammatory markers or the coexistence of liver steatosis.

In this thesis work, a detailed study of a cohort of DM1 patients from the Mediterranean area, without cardiovascular symptoms and with more than 10 years of disease evolution has been done by clinical characterization, the analysis of analytical parameters of potential relevance (adiponectin, YKL-40, 25-hydroxyvitamin D, etc.) and a liver ultrasound study for the detection of non-alcoholic hepatic steatosis. This information has been correlated with early atherosclerosis data obtained through the study of coronary artery calcification by tomography and the measurement of the thickness of the intima-medial carotid artery by carotid ultrasound.

The performance of studies on a sample of patients with type 1 diabetes from our area revealed a very low prevalence of subclinical cardiovascular disease and a correlation between the results of carotid ultrasound and the quantification of coronary calcium that indicated the potential of these tests in subclinical atherosclerosis diagnosis in patients with type 1 diabetes. The investigation of the non-classical cardiovascular risk factors associated to the presence of subclinical cardiovascular disease discarded 25OHD concentrations and serum markers such as

adiponectin or YKL-40. In contrast, in the univariate study of the fourth thesis work, a significant association was found between the presence of carotid atherosclerosis and hepatic steatosis.

It is concluded that, in our territory, there is a very low prevalence of subclinical cardiovascular disease among patients with type 1 diabetes that does not justify generalized screening but that, in certain patients, we have diagnostic tests for its detection. Therefore, in the study of the patient with type 1 diabetes from the Mediterranean area and, based on the data obtained, we can use the carotid ultrasound for the detection and abdominal ultrasound for cardiovascular risk stratification. Deeper knowledge of subclinical cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes in our area regarding prevalence, severity grade, appropriate diagnostic methods and associated factors would help us to design more targeted and effective preventative, therapeutic and monitoring interventions.

El meu més sincer agraïment a la Dra. Eva Aguilera, autora o coautora principal de tots els articles, tutora i mentora d'aquesta tesi doctoral. Després de compatir les dificultats que deriven d'una molt baixa prevalença de la MCV subclínica en la nostra àrea, ens hem convertit en un binomi indissoluble en la investigació dels secrets de l'arterioesclerosi en el pacient amb diabetis. Moltes gràcies per brindar-me la possibilitat de participar en les investigacions de la cardiopatia, per la paciència en la estadística i en les setanta dues voltes i repassos de cada article. Donar les gràcies també la Dra. Sílvia Pellitero qui ha fet tasques de model, consellera, *coaching* i, sobretot, amiga. Tot i els ensurts que darrerament ens han acompanyat has estat a l'alçada de les circumstàncies, recolzant-me i entenent-me.

Al Dr. Manel Puig-Domingo, cotutor, director de la tesi i responsable final de l'estructura de cada article. Malgrat que alguns canvis d'última hora han suposat llargues d'entrevistes telefòniques preguntant la forma de vestir de la gent quan es fan les analítiques, aquestes modificacions finals han aportat un indubtable valor científic. També per la paciència i per no tenir mai mandra i, perquè no dir-ho, sentir una mica de plaer, d'arromangar-se, asseient-se i comentant els articles extensament.

A la Dra. Isabel Salinas, tutora de residència i una mica de la vida en general que, amb tres o quatre comentaris de passadís m'has orientat més que en reunions estructurades i actes d'alt nivell. A la Dra. Marisa Granada i a la Yolanda per fer-me veure el rerefons de la investigació, entre matrassos i alíquotes, així com a tot el Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Germans Trias i Pujol amb el Dr. Jordi Reverter, Dra. Nuria Alonso, Dra. Berta Soldevila (gràcies per aquell paracetamol en el congrés de la SED del 2018), Dra. Clara Joaquin, Dra. Rocío Puig i Dra. Anna Lucas. I a l'equip de dietètica i als residents que m'han fet companyia durant les hores en que passava dades a les bases. No m'oblido d'infermeria, el costat més humà i proper del servei, amb la Maribel Cuadrado, Carmen Pérez i la Isabel Ordóñez que m'han ajudat recollint mostres i m'han fet una mica de "mames", cosa que espero que segueixi passant tot i que ja no en tinc edat.

També un agraïment enorme als meus pares que m'han contagiats l'amor per la biologia i m'han escoltat amb una paciència sobrehumana els rotllos de la vitamina D i l'esteatosi. I a la meua nova família, amb l'Ignasi, la Meimei i en Xic, per la companyia, les cuinetes, el suport i aguantar la meua verborrea tan heroicament.

1. PRESENTACIÓ DE LA TESI

Aquesta tesi doctoral es presenta com un compendi d'articles originals, prèviament aprovada per la Comissió Acadèmica del Programa de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona, on el doctorant és autor o coautor principal de tots els treballs.

Com a eix fonamental de la tesi doctoral, la investigació aprofundeix en la naturalesa de l'arterioesclerosi precoç que presenten, en general, els pacients amb DM1 en dues esferes clarament diferenciades. L'una analitza la prevalença de la MCV en una cohort de pacients amb DM1 de l'àrea Mediterrània de l'entorn de Badalona, mitjançant dos mètodes de diagnosi com són l'ecografia carotídia amb la mesura del gruix de la íntima-mitja carotídia (GIMC) i la mesura de la CAC amb la realització d'una tomografia axial computeritzada mutidetectora.

L'altra àrea d'estudi de la tesi i dels articles que la componen és l'avaluació del potencial vincle entre el resultat de les proves d'exploració cardíaca amb determinats factors associats al risc cardiovascular recentment proposats en la literatura com la vitamina D, l'esteatosi hepàtica i determinats biomarcadors inflamatoris, de cara a establir-ne el seu rol concret en una cohort de persones amb DM1 de la nostra àrea de treball.

Aquesta investigació ha estat parcialment finançada amb l'Ajut a la Recerca Gonçal Lloveras de la Societat Catalana de Diabetis. Aquesta beca és va atorgar el 2010 a la Dra. Eva Aguilera Hurtado com a investigadora principal.

2. INTRODUCCIÓ

2.1 LA DIABETIS MELLITUS I LA MALALTIA CARDIOVASCULAR

2.1.1 PREVALENÇA DE DIABETIS MELLITUS

La DM1 és una malaltia caracteritzada per la deficiència absoluta d'insulina provocada per la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β pancreàtiques. Segons l'estudi [Di@bet.es](#), la prevalença a Espanya de la diabetis mellitus tipus 2 (DM2) és del 13,8%. Al seu torn, la prevalença de la DM1 és del 0,2 - 0,3%, representant aproximadament entre un 10 i un 15% del total de la diabetis. La incidència anual per cada 100.000 habitants de la DM1 oscil·la entre el 9,5 i el 16 entre els menors de 14 anys i entre el 9,9 i el 15 entre els adolescents dels 15 als 29 anys¹. Per motius encara no ben establerts, la prevalença de la DM1 està en augment².

2.1.2 PREVALENÇA DE MALALTIA CARDIOVASCULAR

En el territori de l'Estat espanyol, les MCV són la principal causa de mort. En l'any 2015 es van produir 422.568 defuncions (49.5% de dones), essent el grup de malalties del sistema circulatori, malalties isquèmiques del cor i malalties cerebrovasculares les que van ocupar la primera posició amb un total de 124.197 defuncions (29.4%). Segons el gènere, les malalties isquèmiques del cor foren la principal causa de mortalitat entre els homes i per contra, les malalties cerebrovasculares foren la causa principal de defunció en el sexe femení³.

Si focalitzem en els pacients amb DM2, es considera que la meitat de les defuncions són provocades per les MCV i, alguns estudis realitzats en el nostre territori, apunten a percentatges superiors de fins el 70%⁴. Entre els pacients amb DM1 la proporció de defuncions per MCV assoleix magnituds del 44%⁵.

Aquesta mortalitat per MCV incrementada deriva d'una predisposició a patir esdeveniments cardiovasculars (CV) dels pacients amb diabetis mellitus, tanmateix la magnitud d'aquest risc CV genera controvèrsia. L'American College of Cardiology i l'American Heart Association (AHA) consideren la diabetis com un dels principals factors afavoridors de la coronariopatia i equiparen el risc CV dels pacients amb DM2 i sense antecedents CV al risc d'aquells pacients amb MCV establerta però sense diabetis, anomenant aquest fenomen l'*equivalent coronari*⁶. Aquesta afirmació

ha estat àmpliament criticada i rebatuda en diferents estudis de casos i controls, un d'ells elaborat en el nostre territori^{7,8}.

Sembla existir un major consens en considerar que el risc de patir un esdeveniment CV d'un pacient amb DM2 és dues vegades superior al de la població general i, de 2,5 vegades superior quant als esdeveniments cerebrovasculars. Aquest risc és proporcionalment major en el sexe femení i en els majors de 60 anys^{9,10}.

Existeix menys informació sobre el risc CV i la DM1. Malgrat tot, hi ha estudis que eleven la possibilitat de patir una malaltia coronària en aquest col·lectiu en 10 vegades respecte els subjectes no diabètics de la mateixa edat i sexe^{11,12}. Recentment s'ha observat una lleu milloria en la taxa d'esdeveniments CV entre els pacients amb DM1¹³, però persisteix una tendència a l'arterioesclerosi accelerada i precoç associada a aquesta malaltia.

Aquest increment de risc CV dels pacients amb DM1 presenta una sèrie de factors associats que depenen del gènere. D'aquesta manera, entre els pacients amb DM1 del gènere masculí, aquest risc s'ha vinculat de forma independent amb el percentatge d'hemoglobina A1c (HbA1c), la raó cintura-maluc, la concentració de colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat (HDLc), el tabaquisme, la taxa d'excreció urinària d'albumina i la presència de neuropatia autonòmica. D'altra banda, entre les dones amb DM1, s'hi han vist associades l'edat, la pressió arterial sistòlica (PAs), la concentració dels triglicèrids en dejú, la taxa d'excreció urinària d'albumina i la presència de retinopatia diabètica¹².

2.1.3 MALALTIA CARDIOVASCULAR SUBCLÍNICA

L'arterioesclerosi és la paraula utilitzada per indicar qualsevol pèrdua d'elasticitat arterial essent l'ateroesclerosi el terme que s'utilitza per designar, de forma específica, que aquesta pèrdua es deguda a la presència de plaques d'ateroma.

Paral·lelament, es defineix la MCV subclínica com aquella fase arterioescleròtica asimptomàtica o preclínica que es pot expressar topogràficament com a malaltia arterial perifèrica, lesió carotídia, aòrtica, ilio-femoral o amb com a CAC. En major o menor mesura, les dades de prevalença dependran del mètode utilitzat en la seva detecció i estudi, així com de la població a estudi. Seguidament es presenten les dades de MCV subclínica en població general, DM2 i DM1.

Població general:

L'estudi *Progression of Early Subclinical Atherosclerosis Study (PESA)*¹⁴ es va realitzar en 4.184 treballadors de Madrid asimptomàtics per MCV i amb una edat compresa entre els 40 i els 54 anys. Sobre aquesta cohort es va avaluar la prevalença d'arterioesclerosi subclínica en la regió carotídia, aòrtica, ilio-femoral i coronària emprant-se l'ecografia i tomografia computeritzada (TC). S'establiren com a indicadors de MCV subclínica tant l'existència de plaques arterioescleròtiques en les esmentades localitzacions com la CAC. Aquesta darrera lesió fou mesurada amb la puntuació de la CAC o el calci score (CACs), considerant-se positiu en aquelles proves amb una puntuació igual o superior a 1 Unitat d'Agatston (UA) (**veure apartat 2.5.1.4**). Es van estratificar els pacients segons els resultats obtinguts: a) lliures de MCV subclínica, 0 regions afectades, b) MCV subclínica focal, 1 regió afectada, c) MCV subclínica intermèdia, 2-3 regions afectades, d) MCV generalitzada, 4-6 regions afectades.

Es va concloure que existia una prevalença global de MCV subclínica en població general del 63% (71% en homes i 48% en dones), classificant-se com a intermèdia i generalitzada en un 41% dels casos.

Diabetis mellitus tipus 2:

Si ens centrem en els pacients amb DM2, disposem d'un treball amb una cohort procedent del *Cardiovascular Heart Study*¹⁵, formada per 5.712 pacients majors de 65 anys. A aquests pacients se'ls van realitzar proves vasculars i estudis analítics per a estratificar-los segons si presentaven un trastorn del metabolisme de la glucosa i/o una MCV subclínica o clínica. En aquells individus sense MCV coneguda on es detectava una alteració de l'ecografia carotídia, de l'electrocardiograma (ECG) i/o de l'índex turmell-braç (ITB), se'ls classificava com afectes de MCV subclínica.

Com a resultats, es va detectar una prevalença de MCV subclínica de fins el 60% en el conjunt de la mostra. Aquesta prevalença representava el 56,8% entre els pacients amb glucèmia basal alterada, el 66,5% entre el pacients amb recent diagnòstic de DM2 i assolía el 78,9% entre els pacients amb DM2 coneguda.

Diabetis mellitus tipus 1:

En un estudi realitzat a Denver (Colorado, Estats Units d'Amèrica) sobre una cohort de pacients amb DM1, es va avaluar la prevalença de MCV subclínica mitjançant el CACs. En aquest estudi anomenat el *Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes Study* (CACTI Study)¹⁶, la mostra estava formada per 656 pacients amb DM1 i 764 controls sans, tots ells sense simptomatologia ni antecedents de MCV. En aquesta cohort, tant entre els pacients com entre els controls, en destacava una elevada proporció de sobrepès grau II (índex de massa corporal (IMC) > 27 kg/m²) de fins el 45% i una elevada proporció de fumadors actius i d'ex-fumadors, de fins el 70%.

Els resultats van demostrar un CACs > 0 en el 48% dels homes i en el 27,5% de les dones amb DM1. Comparant amb els controls no diabètics, els pacients amb DM1 van demostrar 2,1 vegades més risc de presentar MCV subclínica, en el gènere masculí i 3,6 vegades més de risc, en el femení.

2.2 L'ARTERIOESCLEROSI EN LA DIABETIS MELLITUS

2.2.1 ARTERIOESCLEROSI EN LA DIABETIS MELLITUS

En els pacients amb diabetis mellitus, tant DM1 com DM2, sembla existir una modificació prematura o envelliment prematur de l'estructura vascular que s'inicia amb la presència de disfunció endotelial seguit per un engruiximent de la íntima coronària i un augment de la rigidesa arterial, produint-se una arterioesclerosi accelerada i precoç. Múltiples autors convergeixen en la hipòtesi de que aquesta arterioesclerosi precoç s'establiria com a resultat sumatori entre factors metabòlics (inflamació, hiperglucèmia i resistència a l'acció de la insulina), factors trombòtics (disfunció endotelial, disfunció plaquetària, glicosilació) i FRCV clàssics, més freqüents en aquesta població (hipertensió arterial, dislipèmia i insuficiència renal)¹⁷.

Alguns dels processos implicats en el desenvolupament de l'arterioesclerosi en el pacient amb diabetis són els següents:

Hiperglucèmia:

La hiperglucèmia, per sí mateixa, pot provocar dany vascular. Les concentracions incrementades de glucosa modulen l'expressió gènica de les cèl·lules presents en el vas sanguini (endotelials, macròfags, monòcits, cèl·lules musculars llises, etc.), produeixen estrès oxidatiu a través de diferents vies metabòliques (generant superòxids per la via mitocondrial, nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH) a través dels macròfags i dels monòcits o radicals hidroxils a partir de mecanismes redox). A més, s'ha vinculat amb una reducció de la producció endotelial d'òxid nítric afectant la relaxació del vas sanguini tot conduint a la rigidesa vascular¹⁸.

Resistència a la insulina:

En els pacients amb DM2 i en aquells pacients amb DM1 i síndrome metabòlica, malauradament cada cop més freqüents¹⁹, trobem la resistència a la insulina (RI) com a factor fonamental associat al desenvolupament de l'arterioesclerosi. Existeix una relació complexa i bidireccional entre la RI, l'arterioesclerosi i alguns FRCV clàssics (dislipèmia aterogènica, la hipertensió arterial i la hiperglucèmia) i condueixen plegats cap al dany endotelial.

A nivell fisiopatològic, la RI actua a través a través de dos mecanismes fonamentals. Per una banda, la manca d'acció de la insulina implica un increment reactiu de les concentracions d'insulina circulant o hiperinsulinisme i, d'altra banda conduint cap a la hiperglucèmia en aquelles persones amb fallida progressiva de la secreció d'insulina. L'hiperinsulinisme derivat de la RI actua a diferents nivells:

1. **A nivell del macròfag:** diferents estudis suggereixen que els pacients amb RI presenten macròfags amb una disminució de l'expressió a la seva superfície de la proteïna tirosina quinasa del receptor de la insulina, potenciant la situació de RI. Aquests macròfags resistents a l'acció de la insulina circulant estan predisposats a la captació de partícules aterogèniques i a la formació de cèl·lules escumoses. Aquest procés forma part de les primeres fases de l'arterioesclerosi i de la formació de la placa aterogènica, com s'explicarà més endavant.
2. **A nivell de l'hepatòcit:** la hiperinsulinèmia actua directament sobre els hepatòcits promovent la lipogènesi i estimulant el catabolisme de partícules d'HDLc a favor de la formació de partícules proaterogèniques de colesterol unides a proteïnes de molt baixa densitat (VLDLc).
3. **A nivell hemorreològic:** unes concentracions incrementades d'insulina s'han vinculat amb l'increment de l'inhibidor de l'activador del plasminogen-1 (PAI-1) condicionant un estat protrombòtic, amb l'impediment de la dilatació arterial mediata per òxid nítric i amb la proliferació de les cèl·lules musculars llises²⁰.

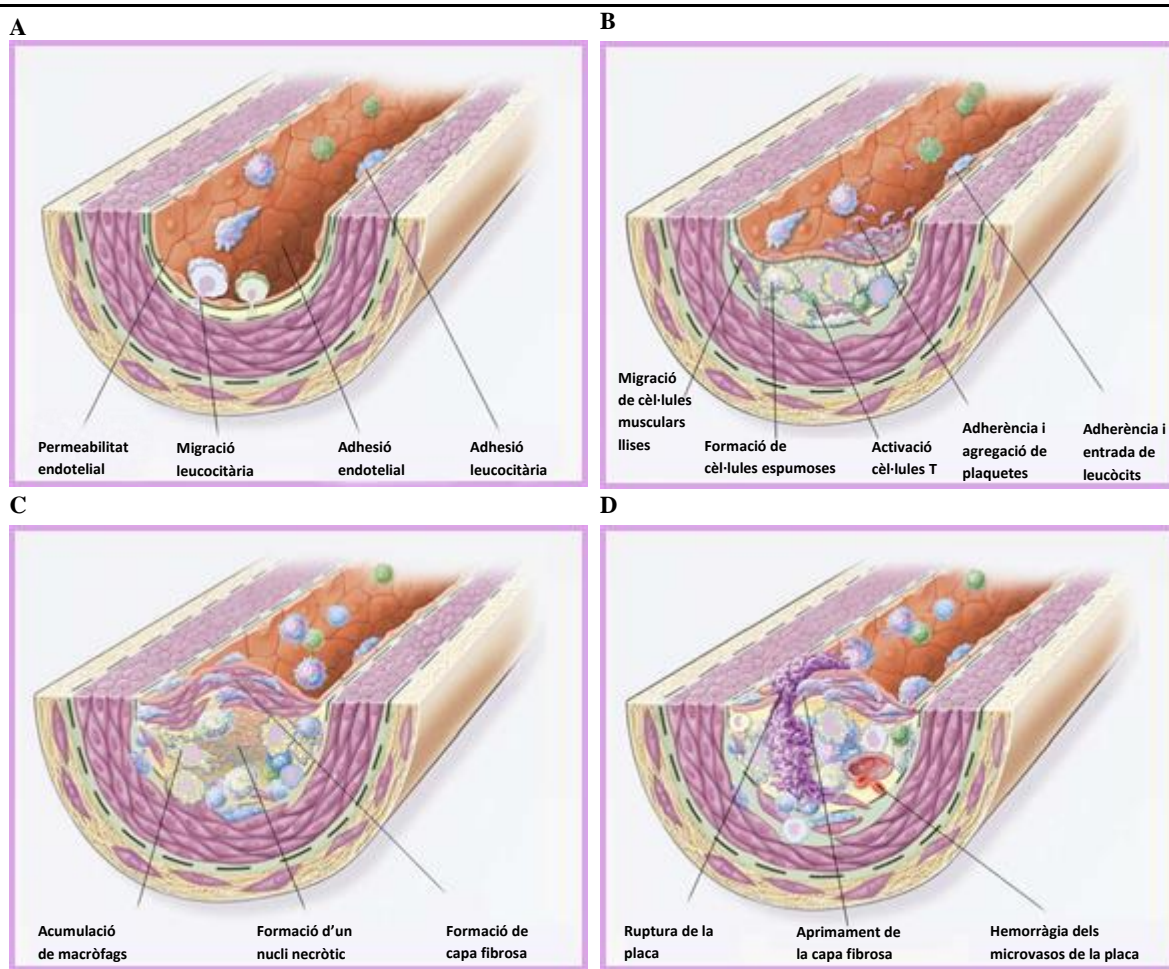
Dislipèmia:

Les partícules de colesterol unides a lipoproteïnes de baixa densitat (LDLc) que han patit processos d'oxidació són citotòxiques per les cèl·lules endotelials, estimulen la quimiotaxi dels monòcits circulants i la proliferació de macròfags i de cèl·lules musculars llises. Aquests leucòcits internalitzen les partícules, acumulen èsters de colesterol i formen cèl·lules escumoses²¹.

2.2.2 ATEROESCLEROSI EN LA DIABETIS MELLITUS TIPUS 1

Tot i que és complicat diferenciar fisiopatològicament la DM1 i la DM2 en el procés de l'ateroesclerosi, focalitzarem en el procés de formació de la placa d'ateroma en el pacient amb DM1. Tal i com es resumeix en la **(Figura 1)**, es diferencien els següents passos en aquest procés i, de cada punt, es puntualitzaran aquelles particularitats vinculades amb la DM1:

FIGURA 1. Fases fisiopatogèniques de la formació de la placa d'ateroma



A: fase de disfunció endotelial, B: fase de placa greixosa, C: fase de placa complicada, D: fase de placa fibrosa

Adaptat de Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999 14;340:115-26²⁸

Fase de disfunció endotelial:

La DM1 es considera una malaltia que condiciona un estat proinflamatori crònic. A favor d'aquesta hipòtesi trobem que múltiples estudis han objectivat concentracions circulants

incrementades de biomarcadors inflamatoris en aquests pacients respecte a la població general. És el cas de la proteïna C reactiva (PCR), la interleucina (IL)-6 i el factor de necrosi tumoral (TNF)- α ²². A més, se n'han correlacionant les concentracions amb la presència de complicacions micro^{23,24} i macrovasculars²⁴, conseqüències d'aquesta arterioesclerosi precoç i accelerada.

Aquesta inflamació crònica pròpia dels pacients amb DM1 i els altres factors metabòlics esmentats provoquen un estrès continu sobre les cèl·lules endotelials. Aquest dany continu provoca la disfunció endotelial que engloba una reactivitat vascular anòrmla i una alteració de la interacció entre l'endoteli i els diferents components de la sang.

Fase de reclutament cel·lular, d'infiltració lipídica i de resposta inflamatòria:

L'estrès i el dany cel·lular persistents condueixen a la **fase de placa greixosa** en que, les cèl·lules endotelials danyades augmenten la permeabilitat a partícules proaterogèniques, expressen múltiples gens proinflamatoris i presenten més molècules d'adhesió que faciliten la quimiotaxi sobre els monòcits circulants. Els macròfags infiltrats en l'espai endotelial capten les partícules oxidades de LDLc, es transformen en cèl·lules escumoses portadores d'èsters de colesterol, alliberen metal·loproteïnases i secreten factors de creixement i citocines inflamatòries²⁵.

A part del monòcits/macròfags, en les lesions arterioescleròtiques sempre existeix una infiltració de limfòcits T. Són predominantment CD4 positius però amb presència de cèl·lules natural killer i CD8. La seva activació provoca una cascada de processos que culminen en una alliberació de citocines que es pot presentar en dues diferents vessants:

- a) L'activació limfocitària tipus 1 cooperadora (*Type 1 helper response* (Th1)), que estimula als macròfags provocant una resposta inflamatòria de característiques similars a la defensa contra l'atac de patògens intracel·lulars.
- b) L'activació limfocitària tipus 2 cooperadora (*Type 2 helper response* (Th2)) que desemboca en una reacció inflamatòria similar a una al·lèrgia.

En les lesions arterioescleròtiques hi predomina la resposta Th1 que indueix la producció d'interferó- γ per part dels macròfags que desencadena que, al seu torn, afavoreix una producció sinèrgica de TNF- α , IL-1. Com a resultat, es poden detectar concentracions incrementades de PCR i IL-6 en sang perifèrica²⁶.

En estudis realitzats en pacients amb DM1 es demostra que els monòcits circulants estan més activats i que a part, presenten una major concentració de citocines proinflamatòries derivades de la resposta Th1 que els controls no diabètics^{22,24,27}. Tant les cèl·lules espumoses com els limfòcits T responen a la presència d'aquests tipus de citocines (concretament TNF- α i IL-1) i de partícules de LDLc modificat, que actuen com a potents quimiotàctics de noves cèl·lules T i més macròfags, reverberant el procés.

Migració de cèl·lules musculars llises o fase de placa complicada:

Existeixen múltiples factors que estimulen la migració de les cèl·lules musculars llises a la zona de la capa íntima i la seva proliferació: les partícules de LDLc oxidat, els factors de creixement com el derivat de les plaquetes, les citocines, etc. En cas de persistència dels factors desencadenants es van succeint processos de reclutament, migració, proliferació i fibrosi que reestructuren la lesió esdevenint una estructura composta per una capa fibrosa externa que engloba un nucli central de greixos i de teixits necrosats.

Alliberació de les metal·loproteïnases i adhesió plaquetària:

Tant els macròfags com les cèl·lules musculars llises que infiltren i conformen la lesió arterioescleròtica i, sota l'estímul constant de les partícules de LDLc oxidat i dels limfòcits T estimulats, produeixen l'alliberament de metal·loproteïnases que degraden la matriu extracel·lular i el col·lagen. Aquesta fase també rep el nom de **placa fibrosa i inestable**. Dins d'aquesta família de proteïnases, les més predominants són les metal·loproteïnases tipus 2 i tipus 9. Aquests enzims participen en el procés de remodelació, hemorràgia dels vasa vasorum i ruptura de les plaques ateromatoses²⁸.

Paral·lelament, les plaquetes s'adhereixen a la lesió i granulen alliberant diferents molècules com ara citocines que participen en el procés inflamatori, factors de creixement que recluten i

afavoreixen la proliferació de cèl·lules musculars llises i monòcits, àcid araquidònic que pot convertir-se en tromboxà A₂ (vasoconstrictor) o en leucotriens (proinflamatori). Al seu torn, les plaquetes un cop activades, expressen la glicoproteïna IIb/IIIa que intervé en el reclutament de més plaquetes i afavorint la formació i l'expansió del trombe²⁸.

La placa d'ateroma dels pacients amb diabetis és més inestable que la pròpia de la població no diabètica per la seva major proporció de lípids, de trombes intramurals, d'infiltració de macròfags i de metal·loproteïnases macrofàgiques tipus 2 i 9²⁹. Aquest és un fet molt rellevant que pot explicar la major gravetat i el major nombre d'esdeveniments CV en les persones amb DM1.

Aquest fet ha provocat que, en els pacients amb DM1, s'hagin proposat les metal·loproteïnases tipus 2³⁰ i la tipus 9³¹ com a marcadors de microangiopatia i macroangiopatia, respectivament. Aquesta dada vincula el mecanisme fisiopatològic amb l'arterioesclerosi precoç i accelerada d'aquests pacients que condueix a la presència de complicacions cròniques.

2.3 FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR CLÀSSICS EN LA DIABETIS MELLITUS

Els FRCV són característiques, condicions o hàbits d'un individu que afavoreixen l'aparició de MCV, no sempre amb una relació causa-efecte, però que la seva detecció ens permet calcular el risc de patir esdeveniments vasculars d'un determinat pacient. Es poden classificar en causals, predisposants i condicionals³². (Taula 1)

TAULA 1. Classificació dels factors de risc cardiovasculars

Factors de risc causals

- Tabac
- Hipertensió arterial
- Augment del ColT o del LDLc
- HDLc baix
- Diabetis mellitus
- Edat avançada

Factors de risc condicionals

- Hipertrigliceridèmia
- Partícules LDL petites i denses
- Homocisteïna sèrica incrementada
- Lipoproteïna (a) sèrica incrementada
- Factors protrombòtics (fibrinogen, PAI-1)
- Marcadors inflamatoris (PCR)

Factors de risc predisposants

- Obesitat (IMC ≥ 30 kg/m²)
- Inactivitat física
- Insulinresistència
- Obesitat abdominal (perímetre cintura ≥ 102 cm en homes, ≥ 88 cm en dones)
- Història familiar de cardiopatia isquèmica precoç
- Característiques ètniques
- Factors psicosocials
- Factors socioeconòmics

ColT: colesterol total, LDLc: colesterol unit a proteïnes de baixa densitat, HDLc: colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat, PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen 1, PCR: proteïna C reactiva, IMC: índex de massa corporal

Adaptat de Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith SJ, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation*. 1999;100:1481-92³²

Concretament, els FRCV causals són els que s'associen, de forma independent, amb el desenvolupament de l'arterioesclerosi. D'altra banda, els FRCV condicionals s'han vinculat amb el risc de cardiopatia isquèmica però no amb el desenvolupament de l'arterioesclerosi, molt probablement perquè posseeixen un poder aterogènic menor i/o a una prevalença poblacional menor. Finalment, els FRCV predisposants podrien incrementar el potencial aterogènic dels propis factors causals.

Com ja s'ha mencionat, l'arterioesclerosi és un procés crònic caracteritzat per l'engruiximent i l'enduriment progressiu de les artèries de mitjà i gran calibre. Aquest procés presenta com a lesió principal la placa d'ateroma que està composta, bàsicament, de lípids, teixit fibrós i cèl·lules inflamatòries³³. El control i tractament dels FRCV s'ha associat, en diversos estudis experimentals, epidemiològics i d'intervenció, a la disminució de la morbimortalitat CV en prevenció primària i en prevenció secundària. Aquest fet es compleix amb la hipercolesterolèmia³⁴, la hipertensió arterial³⁵, el tabaquisme³⁶ i la diabetis mellitus³⁷. Malauradament, no existeix forma d'actuar sobre l'edat, considerant-se un FRCV independent i no modificable vinculat amb l'arterioesclerosi i la MCV a partir dels 45 anys en els homes i dels 55 anys en les dones³⁸.

Per als pacients amb diabetis mellitus, on existeix aquesta arterioesclerosi accelerada i aquest major risc CV, semblaria lògic disposar de proves de cribratge específiques i mesures terapèutiques dirigides. Tanmateix, les principals guies de maneig del pacient amb diabetis mellitus³⁹⁻⁴², proposen el control del FRCV clàssics com a única mesura per a la prevenció primària de la MCV en aquesta població i rebutgen la necessitat del cribratge de la MCV preclínica. En aquestes guies de maneig es limita la realització de proves per a la detecció d'arterioesclerosi únicament en aquells pacients amb signes o símptomes cardíacs.

En aquestes guies, on no sempre es diferencia entre els pacients afectes de DM1 i de DM2, hi queda remarcada la necessitat del control dels FRCV clàssics (**Taula 2**). Malgrat tot, aquestes recomanacions no semblen haver consolidat una veritable milloria entre els pacients amb DM1. Tot i haver-s'hi reportat una disminució de la taxa d'esdeveniments CV totals, aquesta reducció ha estat en paral·lel i proporcional a la experimentada pel col·lectiu no diabètic¹³.

TAULA 2. Objectius de control dels factors de risc cardiovascular en pacients amb diabetis mellitus tipus 1

	Objectius
Hiperglucèmia	< 7,0% d'HbA1c en adults
PA	< 130/80 mmHg
Perfil lipídic	LDLc < 100 mg/dL o noHDLc < 130 mg/dL LDLc < 70 mg/dL si antecedents de SCA
	HDLc > 50 mg/dL en dones HDLc > 40 mg/dL en homes
	Triglicèrids < 150 mg/dl
Antiagregants	Prevenió primària: Si factors de risc de MCV arterioescleròtica Prevenió secundària: Si antecedents de MCV arterioescleròtica No necessària: Menors de 50 anys i amb absència de factors de risc de MCV arterioescleròtica
Tabac	Abandonament
Albuminúria	< 300 mg/g de creatinina

PA: pressió arterial, LDLc: colesterol unit a proteïnes de baixa densitat, noHDLc: colesterol no HDL, SCA: síndrome coronària aguda, HDLc: colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat, MCV: malaltia cardiovascular

Adaptat de, de Ferranti SD, de Boer IH, Fonseca V et al. Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. Diabetes Care. 2014;37:2843-2863⁴⁰

2.4 FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR NO CLÀSSICS EN LA DIABETIS MELLITUS

La prevenció, detecció, modificació o tractament dels FRCV clàssics sembla tenir un impacte significatiu en la prevenció i estabilització de la progressió de l'arterioesclerosi i, en darrera instància, de la MCV. El control de la hipertensió arterial, de la diabetis mellitus i de la hipercolesterolèmia, així com l'abandonament tabàquic i la realització d'exercici físic es proposen com a preventius de l'arterioesclerosi. I d'altra banda, la seva presència i descontrol s'ha vinculat amb l'aparició d'arterioesclerosi. Per exemple, entre les persones amb DM1 s'ha demostrat que aquells pacients amb FRCV clàssics pitjor controlats demostraven un major GIMC^{43,44}.

Tanmateix, l'estudi, l'avaluació i el control dels FRCV clàssics sembla representar menys del 50% de la variabilitat de la càrrega ateroscleròtica de la placa i només poden explicar la minoria de la variabilitat de la placa carotídia^{45,46}.

Sembla lògic pensar que altres factors, els quals anomenarem com a FRCV no clàssics, puguin estar afavorint el procés arterioscleròtic i tinguin un paper fonamental en l'arterioesclerosi del pacient amb DM1. En aquesta línia i, atès que la base fisiopatològica de l'arterioesclerosi és l'estat inflamatori subjacent i crònic d'aquests pacients, no és d'estranyar que els biomarcadors inflamatoris estiguin entre els principals candidats a la designació de FRCV no clàssics⁴⁷.

2.4.1 VITAMINA D

Un bilió de persones pateixen deficiència o insuficiència de vitamina D arreu del món⁴⁸ i els pacients amb DM1 en són especialment vulnerables. Tot i que hi ha estudis en contra⁴⁹, sembla que els subjectes amb diabetis presenten concentracions disminuïdes d'aquesta hormona respecte la població general, fenomen observat tant en DM1^{50,51}, com en DM2⁵².

Fisiologia de la vitamina D:

És de les poques vitamines que poden ser sintetitzades pel nostre organisme, tot i que podríem dir que la vitamina D es més una hormona que una vitamina, en el concepte establert dels dos tipus de compostos. El seu precursor és el colecalciferol i aquest s'obté principalment (90-95%) a través de la conversió fotoquímica del 7-dehidrocolesterol cutani per acció de la radiació ultraviolada B i, minoritàriament, procedeix de la ingesta (5-10%). Per a esdevenir un metabòlit actiu aquest precursor haurà d'experimentar dues hidroxilacions. En una primera fase hepàtica, el colecalciferol es converteix en 25OHD i, posteriorment es produeix una segona hidroxilació, fonamentalment a nivell renal tot i que sembla existir una àmplia distribució tissular d'aquest procés metabòlic, on la 25OHD s'hidroxila novament i esdevé el metabòlit actiu, anomenat 1 α ,25-dihidroxicolecalciferol o 1 α ,25-hidroxivitamin D (1,25OHD) o calcitriol.

Mesura de la vitamina D:

No sense controvèrsia, es consideren les concentracions circulants de 25OHD les més adequades per establir l'estatus d'aquesta vitamina en un determinat subjecte. Aquesta afirmació es basa en que existeix una sòlida vinculació entre l'hiperparatiroidisme, la absorció intestinal de calci i la 25OHD. A concentracions de 25OHD inferiors a 20 ng/mL s'han demostrat increments proporcionals de parathormona (PTH) i, d'altra banda, sembla aparèixer una disminució de l'absorció intestinal de calci a partir de concentracions inferiors al llindar de 32 ng/mL. D'aquesta forma s'ha establert la deficiència de vitamina D en unes concentracions de 25OHD inferiors a 20 ng/mL, la insuficiència entre 21 i 29 ng/mL i, finalment, la suficiència per a les concentracions iguals o superiors a 30 ng/mL⁴⁸.

Hi ha pocs sistemes per mesurar l'exposició al sol i l'associació d'aquesta amb les concentracions de 25OHD. Una eina senzilla és la realització d'un test d'exposició a la llum solar en la setmana de l'extracció sanguínia, mètode validat en la població caucàsica i mediterrània italiana⁵³. El test interroga sobre el temps, quantificat en minuts, que el subjecte es troba a l'aire lliure (≤ 5 minuts, entre 5 i 3 minuts i ≥ 30 minuts) i sobre les zones corporals descobertes durant aquests minuts. Les àrees corporals s'engloben en 4 possibilitats: **a)** cara i mans, **b)** cara, mans i braços, **c)** cara, mans, braços i cames, **d)** vestit de bany. El test adjudica una puntuació a cada grup temporal i a cada grup d'àrees exposades i, en multiplicar ambdós valors s'obté la puntuació d'exposició solar diària, essent el sumatori dels set dies, la setmanal.

Paral·lelament, seguint les recomanacions de diversos autors, s'acostuma a aplicar una correcció a l'alça de les anàlisis de 25OHD realitzades durant el període hivernal. Aquest biaix prové de factors estacionals hivernals com un angle zenital no òptim dels rajos solars, una disminució de zones cutànies exposades al Sol per qüestions climatològiques i una reducció del temps destinat a l'aire lliure degut a la climatologia d'aquest període de l'any⁵⁴.

Vitamina D en la població amb diabetis mellitus tipus 1:

No es coneixen les causes exactes que explicarien una major prevalença d'insuficiència i deficiència de 25OHD entre els subjectes amb diabetis mellitus. Entre els pacients amb nefropatia diabètica establerta o incipient, la pèrdua d'una porció de 25OHD lligada a la proteïna transportadora de la 25OHD podria ser-ne la causa o part d'aquesta⁵⁵. A aquesta incògnita s'hi sumen xifres de prevalença de la deficiència de 25OHD en els pacients amb DM1 molt variades:

L'estudi CACTI⁵⁶, és un estudi realitzat a Denver (Colorado, latitud 39° 44' 21") amb persones amb DM1, amb fototipus caucàsic, amb una edat mitja de 39 anys i amb un temps d'evolució de la malaltia de 23 anys de mitja. En aquest treball es va detectar una prevalença de deficiència de 25OHD, entenent-la com una concentració de 25OHD inferior a 20 ng/mL, del 10,2%. D'altra banda, en el *Diabetes Control and Complications Study (DCCT) / Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study* o DCCT/EDIC⁵⁷, un estudi dut a terme a Seattle i per tant, en una latitud més septentrional que en l'estudi anterior (Seattle, latitud 47° 36' 00"), es va reclutar i avaluar una cohort de pacients amb diabetis mellitus,

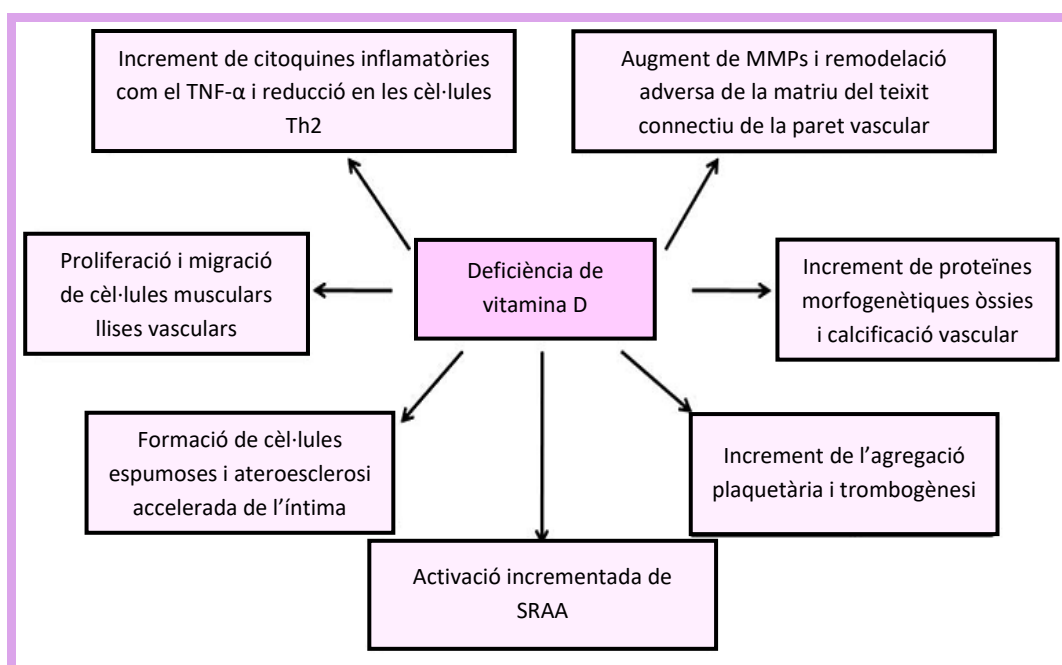
majoritàriament caucàsica, amb una lleu menor edat mitja que en l'estudi CACTI (39 vs 32,6 anys) i amb un menor temps d'evolució de la diabetis (23 vs 7,5 anys). S'hi va detectar una prevalença de deficiència de 25OHD del doble (27,6% vs 10,2% en el CACTI study).

Destaquen dues altres investigacions realitzades a Europa. Primer, el treball de Joergensen i col.⁵⁸, on es va detectar una prevalença de fins el 10% de valors propis d'una deficiència greu (concentracions inferiors a 6,2 ng/mL). En aquest treball la latitud podria jugar-hi un paper, doncs la investigació es va realitzar a Copenhagen (latitud 55° 40' 34"). D'altra banda, Taskiran i col.⁵⁹ van realitzar un estudi a la conca Mediterrània (Turquia, latitud 39° 52' 00") i en una cohort de 93 pacients amb DM1. La deficiència reportada fou sorprenentment del 78%.

Deficiència de vitamina D i risc cardiovascular:

Concentracions circulants subòptimes de vitamina D han estat proposades recentment com a FRCV no clàssic en diferents estudis, tant en població general⁶⁰, com en persones amb DM2⁶¹ o DM1^{56,58}. Una aportació adequada de vitamina D seria important per la salut vascular i la manca s'associa a alteracions pròpies del dany endotelial i de l'aterogènesi (**Figura 2**).

FIGURA 2. Patogènia del dany vascular per deficiència de 25-hidroxivitamina D



TNF- α : factor de necrosi tumoral α , Th2: activació limfocitària T cooperadora tipus 2, MMPs: matriu de metal·loproteïnases, SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona

Adaptat de Brewer LC, Michos ED, Reis JP. Vitamin D in Atherosclerosis, Vascular Disease, and Endothelial Function. *Curr Drug Targets*. 2011 Jan;12(1):54-60⁶³

La deficiència de vitamina D es pot vincular amb el dany vascular pels següents fenòmens:

Aterogènesi:

A través de diverses vies metabòliques i fisiopatològiques, la deficiència de vitamina D s'ha vinculat amb l'aterogènesi. Trobaríem els següents mecanismes:

- a) Des d'un punt de vista genètic, l'1,25OHD influeix en l'expressió d'un gran nombre de gens implicats en la formació de la placa arterioescleròtica com són el factor de creixement endotelial, la matriu de metal·loproteïnes tipus 9, la miosina, l'elastina i el col·lagen del tipus I⁶². A part, les proteïnes morfogenètiques òssies vinculades a la calcificació vascular mitjançant la conversió en osteoblasts de les cèl·lules musculars llises i les metal·loproteïnes, concretament les del tipus 2 i 9, es veuen inhibides en estudis *in vitro* pel calcitriol⁶³.
- b) Els macròfags activats expressen 1- α -hidroxilasa i produeixen, a nivell de la placa arterioscleròtica, 1,25OHD. Aquest fet podria limitar el component inflamatori de l'ateroesclerosi, ja que 1,25OHD s'ha proposat com a un regulador de la resposta inflamatòria afavorint activacions limfocitàries del tipus Th2⁶⁴. Paral·lelament, i en població amb DM2, l'1,25OHD podria inhibir la captació de colesterol per part dels macròfags de la placa i reduir la formació de macròfags escumosos⁶⁵.
- c) Les cèl·lules musculars llises són estimulades pel calcitriol i, en concentracions adequades, s'ha vist implicat en la regulació a la baixa de la proliferació i migració d'aquest grup cel·lular en la regió coronària⁶⁶. Sobre l'activitat plaquetària, fonamental en el procés d'aterogènesi, la 25OHD regularia els processos d'agregació plaquetària i trombogenicitat⁶³.

Una mostra de l'associació entre la 25OHD i l'aterogènesi és l'estudi del GIMC mitjançant l'ecografia carotídia. En pacients amb DM2, les concentracions de 25OHD s'han vinculat amb la mesura del GIMC de forma inversament proporcional⁵² mentre que, en pacients amb DM1, tot i que existeixen diversos treballs que han analitzat la potencial associació entre la deficiència de 25OHD i la MCV silent mesurada per GIMC, aquesta no ha pogut ser demostrada^{57,59}.

Rigidesa i calcificació arterial:

A través dels següents punts es podria vincular la deficiència de 25OHD amb la rigidesa i la calcificació arterial:

- a) En població general, la deficiència de vitamina D s'ha associat amb els FRCV clàssics com ara la hipertensió arterial, l'obesitat, la hipercolesterolèmia i la diabetis mellitus⁶⁷; FRCV altrament associats amb la rigidesa arterial i l'arterioesclerosi³³.
- b) Sobre el vas sanguini, el sistema renina-angiotensina-aldosterona estimula la formació de col·lagen, la remodelació i la hipertròfia vascular, incrementa l'estrès oxidatiu, disminueix la síntesi d'elastina i redueix la relaxació òxid nítric depenent⁶⁸. S'ha evidenciat una regulació a la baixa d'aquest sistema mediat per la vitamina D⁶⁹. Seria congruent pensar, que la disminució d'aquesta vitamina es pugui relacionar amb l'estímul d'aquest sistema hormonal.

Novament, disposem d'un clar exemple del potencial vincle entre les concentracions de vitamina D i la calcificació arterial, que és l'estudi de la CAC mitjançant el sistema Agatston. D'aquesta forma, s'ha pogut establir una relació, també inversament proporcional, entre les concentracions de la vitamina i el CACs, tant en població amb elevat risc CV segons l'equació de Framingham⁷⁰ com en pacients amb DM2⁶¹ i, fins i tot, en pacients amb DM1⁵⁶. Aquesta darrera associació no dista de presentar controvèrsia⁵⁷. Les següents investigacions han aprofundit en aquest tema:

En el treball de Joergensen i col.⁵⁸ es van estudiar 227 pacients amb DM1 sense nefropatia diabètica i durant un període de 26 anys. Cada 5 anys es van realitzar noves determinacions de les concentracions de 25OHD. Com hem vist anteriorment (**principi de l'apartat 2.4.1**), es va detectar una proporció de "deficiència molt marcada" (< 6,2 ng/mL) del 10%. D'altra banda, es va estudiar el potencial vincle entre la "deficiència greu" de 25OHD i la morbimortalitat CV en aquesta cohort de pacients amb DM1, detectant-se una associació significativa entre els pacients amb "deficiència greu" i la mortalitat per qualsevol causa (HR 2.7 [1.1–6.7], p = 0.03).

Amb unes característiques similars, l'estudi CACTI⁵⁶ va avaluar 374 pacients amb DM1, tant quant a l'estatus de vitamina D com sobre la CAC segons el sistema Agatston. Com s'ha

esmentat a l'inici d'aquest mateix apartat, es va detectar una prevalença de deficiència de 25OHD (25OHD < a 20 ng/mL) del 10,2%. Quant a la mesura de la CAC, en un 45,5% de la mostra es va demostrar un CACs > 0 UA. En vincular aquestes dues dades, es va observar una associació estadísticament significativa entre la manca de la vitamina D i la presència de CAC i, únicament entre els pacients amb CACs negatius en l'inici de l'estudi, amb la progressió de CAC.

Aquests dos estudis presenten, al nostre parer, característiques metodològiques i biaixos de selecció que podrien explicar parcialment els resultats.

Patró bimodal:

Els fenòmens fisiopatològics que vinculen la vitamina D amb el dany vascular podrien seguir un patró bimodal – en U – i dosi dependent. D'aquesta manera, dosis elevades de calcitriol s'han vinculat amb el dany vascular, més que amb la protecció. En casos de concentracions circulants elevades d'1,25OHD, com pot esdevenir en aquells pacients sota administració exògena de calcitriol a dosis altes, es podria afavorir el dany i la calcificació arterial en comptes de prevenir-la, observant-se plaques arterioescleròtiques amb inflamació crònica.

Alguns treballs indiquen que els nivells molt elevats d'1,25OHD inhibeixen els mecanismes paracrins de protecció davant la calcificació i estimulen els macròfags i les cèl·lules musculars llises afavorint l'alliberació local de fosfatasa alcalina, l'apoptosi cel·lular, l'increment del to vascular i la inducció de la proliferació i migració de les cèl·lules musculars llises^{71,72}.

2.4.2 MARCADORS INFLAMATORIS

Davant la dificultat de l'avaluació precisa del risc CV mitjançant la utilització dels FRCV clàssics, s'han proposat marcadors sèrics com a possibles predictors. Aquests marcadors se'ls ha dividit en aquells vinculats a l'aterosclerosi i aquells associats a la trombosi⁷³. (**Taula 3**)

TAULA 3. Marcadors sèrics de l'arterioesclerosi

Inflamatoris

PCR
Interleuquines
Lligand CD40
Proteïna amiloide A
Molècules d'adhesió

Protrombòtics

Fibrinogen
Factor von Willebrand
PAI-1
Fibrinopèptid A
Fragment 1 + 2 de la protrombina

PCR: proteïna C reactiva, PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen 1

Adaptat de Viles-González JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. Eur Heart J. 2004;25:1197-207⁷³

2.4.2.1 PROTEÏNA C REACTIVA

És el biomarcador inflamatori més ben estudiat. Es sintetitza a nivell hepàtic quan existeixen concentracions elevades d'IL-6 i diferents estudis la vinculen amb l'oxidació del LDLc, la disminució de la producció d'òxid nítric, la síntesi de PAI-1 o l'activació del complement^{33,73}. En població general s'han suggerit els valors de PCR d'alta sensibilitat (PCR-as) baixos (< 1 mg/dL) com a propis d'un risc CV baix, d'entre 1 i 3 mg/L d'un risc CV moderat i, finalment, les concentracions superiors a 3 mg/L s'han vinculat amb un risc CV elevat⁷⁴.

En un meta-anàlisi de 14 estudis prospectius sobre població general, Danesh i col.⁷⁵, va confirmar una associació directe entre les concentracions de la PCR-as i el risc de desenvolupar MAC. També en població general, s'ha proposat la PCR com un marcador d'aterosclerosi subclínica en pacients asimptomàtics, vinculant-se tant amb el GIMC⁷⁶ com amb el CACs⁷⁷.

En els pacients amb diabetis mellitus, l'associació de PCR-as amb la MCV subclínica no està tant ben caracteritzada. En pacients amb DM2 s'han detectat dades contradictòries, establint-se una relació directa entre la PCR i el GIMC (o la seva progressió)⁷⁸ i per contra, una associació indirecta amb el CACs⁷⁹. En pacients amb DM1 la PCR-as no s'ha arribat a vincular ni amb el GIMC^{80,81} ni amb el CACs⁸², ni directa ni indirectament.

2.4.2.2 FIBRINOGEN

A aquesta glicoproteïna, igual que la PCR, se li adjudiquen activitats implicades en l'arterioesclerosi. El fibrinogen estimula l'agregació plaquetària i presenta propietats vasoconstrictores, de quimiotaxi, d'adhesió cel·lular i d'increment de la viscositat de la sang⁸³. En població general, les concentracions del fibrinogen s'han associat de forma independent a la presència de MCV subclínica mesurada per CACs i GIMC⁸⁴. Aquesta vinculació no s'ha aconseguit demostrar entre les persones amb DM1^{80,81}.

2.4.2.3 ADIPONECTINA

Aquesta citocina alliberada pels adipòcits madurs, no s'ha considerat com a biomarcador de l'ateroesclerosi perquè n'és la seva manca, i no pas l'excés, la que s'associa amb el procés ateromatós (**Taula 3**). Amb una estructura similar al col·lagen, aquesta proteïna s'ha vinculat amb el metabolisme de la glucosa i el dels lípids. Les seves concentracions sèriques estan disminuïdes en aquelles situacions on existeix RI com l'obesitat, la DM2, la síndrome metabòlica, la MAC, l'arterioesclerosi, la dislipèmia aterogènica, etc^{85,86}.

En els pacients amb DM2, sobretot els que presenten una dislipèmia aterogènica, s'han detectat unes concentracions disminuïdes d'adiponectina⁸⁶. Paradoxalment i per mecanismes no del tot coneguts, en població amb DM1 s'han descrit concentracions incrementades d'adiponectina. Es postula que la pròpia condició de DM1, amb una absència absoluta d'insulina endògena, pugui afectar els mecanismes de síntesi, secreció i eliminació de l'adipoquina^{87,88}.

Respecte l'arterioesclerosi, l'adiponectina realitza diferents funcions. Per una banda, disminueix, de forma dosi dependent, la concentració de molècules d'adhesió dels monòcits a nivell de les cèl·lules endotelials aòrtiques humanes. També inhibeix la proliferació de les

cèl·lules musculars llises, la fagocitosi macrocítica, la conversió a cèl·lules espumoses i la producció, per part d'aquestes últimes, de TNF- α . Sembla millorar la sensibilitat a la insulina a través de la fosforilació del receptor de la insulina i, en concentracions disminuïdes, s'associa a perfils lipídics proaterogènics⁸⁹.

Tant en població general⁹⁰ com en pacients amb DM2⁹¹, existeixen estudis que vinculen unes concentracions disminuïdes d'adiponectina amb un major GIMC, atorgant un paper cardioprotector a la citocina. No existeixen estudis que relacionin adiponectina, DM2 i MCV subclínica mesurada per presència de CAC.

En pacients amb amb DM1, tot i algunes discrepàncies⁹², sembla existir consens sobre que les concentracions d'adiponectina estan incrementades en aquests malalts^{87,88,93-97}. Per contra, la controvèrsia recau en si aquestes elevades concentracions ofereixen un efecte protector antiinflamatori i antiaterogènic o per contra, un paper conductor del dany endotelial i, en darrer terme, vascular. Existeix un ampli ventall de resultats:

Funció proaterogènica de l'adiponectina en la diabetis mellitus tipus 1:

Existeixen treballs que atorguen a l'adiponectina una paper **proaterogènic**. Aquestes treballs detecten una associació directa i dosi dependent entre les concentracions d'adiponectina i la presència de complicacions microvasculars^{87,94,96,98}. Alguns autors critiquen l'associació amb la microalbuminúria, doncs consideren que les concentracions elevades, en aquest cas, s'expliquen pel deteriorament del filtrat glomerular i en canvi, hi associen un major risc de mortalitat CV⁹⁹.

En un estudi realitzat a Dinamarca amb una cohort de 391 pacients amb DM1 de llarga evolució (27 anys de mitja), Frystyk i col.⁸⁷ van detectar que les concentracions d'adiponectina en sèrum eren majors entre els pacients amb DM1 respecte els controls no diabètics i, encara eren més elevades en aquells pacients amb DM1 amb complicacions microvasculars, concretament la nefropatia diabètica i la retinopatia diabètica proliferativa. Tanmateix, aquesta troballa no es va mantenir amb els pacients amb DM1 i complicacions macrovasculars. És important mencionar que es considerava una complicació macrovascular el fet de presentar un ECG amb signes

d'isquèmia miocardiàica i els antecedents de MCV o cerebrovascular establerta. No es realitzaren estudis sobre d'aterosclerosi subclínica.

Més a prop, a França, Hadjadj i col.⁹⁴ analitzaren l'adiponectina sèrica en 126 pacients amb DM1, en un estudi prospectiu de sis anys de durada i en relació a l'aparició de retinopatia diabètica i nefropatia diabètica. Novament es detectaren concentracions majors en els pacients amb DM1 i en aquells amb retinopatia diabètica proliferativa. A part, els autors defensen que les concentracions d'adiponectina estan independentment associades amb l'aparició de microalbuminúria. En aquest treball no s'aportaren dades sobre les complicacions macrovasculars.

Funció antiaterogènica de l'adiponectina en la diabetis mellitus tipus 1:

D'altra banda, existeixen estudis que confereixen un paper **protector** de l'adipocitocina. En aquests treballs, on es realitza l'avaluació de l'aterosclerosi subclínica i de les concentracions d'aquesta citosina, es demostra una associació inversament proporcional entre l'adiponectina i la dilatació ventricular⁹² i amb la presència o progressió de MCV subclínica tant mesurada per MAC⁹³, com per CACs⁹⁵ com per GIMC⁹⁷.

Funció neutre de l'adiponectina en la diabetis mellitus tipus 1:

No falten els autors que defensen un paper neutre de l'adiponectina en el procés de l'arteriosclerosi del pacient amb DM1. En un estudi realitzat en 40 pacients amb DM1 i 12 controls no diabètics, es van avaluar les concentracions d'adiponectina, la presència de complicacions microvasculars i el GIMC. En aquest estudi de Sherief i col.⁹⁶ es detectà l'anteriorment descrita vinculació entre l'adiponectina i la presència de microalbuminúria però no s'aconseguí demostrar ni un efecte antiaterogènic ni proaterogènic de la citosina.

2.4.2.4 YKL-40

L'YKL-40, una glucoproteïna d'unió a l'heparina i a la quinina, és coneguda amb diferents denominacions: glicoproteïna del cartílag humà 39, 38-kDa glicoproteïna d'unió a l'heparina, proteïna 1 similar a la quitinasa-3 o YKL-40. Aquest darrer nom respon a un codi on s'enumeren els tres aminoàcids en situació N-terminal i el pes molecular¹⁰⁰.

Aquesta glucoproteïna és alliberada per diferents tipus cel·lulars i s'ha vinculat amb diverses funcions implicades en el procés arterioescleròtic com l'activació immunitària, els processos de remodelació de la matriu extracel·lular i la maduració monocítica i macrocítica. També es considera que l'YKL-40 actua com un factor de migració i d'adhesió cel·lular en teixits inflamats i en plaques arterioescleròtiques^{100,101}.

Diferents estudis realitzats en població general, han posat de manifest una vinculació entre aquest biomarcador inflamatori i la presència de FRCV clàssics, l'augment de la rigidesa arterial i la síndrome de l'apnea de la son^{102,103}. A més, s'ha proposat com a predictor precoç de l'existència de MCV subclínica mesurada per GIMC¹⁰².

En els pacients amb diabetis i, sobretot en aquells amb microalbuminúria, s'han demostrat concentracions incrementades d'aquesta glicoproteïna respecte els controls sense diabetis mellitus^{98,102,104-107}. En subjectes amb DM2, un estudi recent, ha vinculat les concentracions circulants d'YKL-40 amb la presència de MAC valorada per angiografia coronària per TC¹⁰⁵.

També disposem d'informació d'YKL-40 en pacients amb DM1, on l'YKL-40 es vincula de forma directa amb la presència de complicacions microvasculars^{98,106} i amb la MCV subclínica mesurada per GIMC¹⁰⁴. Existeixen diversos estudis que avaluen les concentracions d'YKL-40 en població amb DM1 i respecte la presència de complicacions micro o macrovasculars, seguidament se n'exposen alguns exemples:

L'estudi de Rathcke i col.¹⁰⁶, fou un treball on hi participaren 149 pacients amb DM1, amb una edat mitja de 52 anys, amb una evolució de la malaltia de 36 anys i amb una important proporció de complicacions microvasculars que assolía el 50% de la mostra. En aquest treball es van detectar unes concentracions mitges majors d'YKL-40 entre els pacients respecte els controls i una associació independent d'aquestes concentracions amb la presència de microalbuminúria.

En la mateixa línia trobem l'estudi de Sakamoto i col.⁹⁸. En aquest altre treball es van avaluar 131 pacients amb DM1 del Japó. Aquesta cohort presentava una menor edat mitja que l'anterior estudi (25 vs 36 anys), una menor evolució de la malaltia (13 vs 36 anys) i una molt menor proporció de complicacions cròniques microvasculars (9% de nefropatia i 33% de

retinopatia). De forma similar a l'estudi anterior, es van detectar concentracions incrementades d'YKL-40 entre els pacients amb DM1 i una associació independent tant amb la presència de microalbuminúria com amb la presència de retinopatia diabètica. En l'avaluació de les complicacions macrovasculars, es va estudiar la potencial vinculació entre l'YKL-40 i el GIMC mesurat per ecografia carotídia sense detectar-se una correlació significativa entre les concentracions de la glicoproteïna i el GIMC.

Finalment, cal destacar l'estudi de Jafary i col.¹⁰⁴. En aquesta investigació es van examinar 49 pacients pediàtrics amb DM1 i 43 subjectes sans aparellats per edat i sexe. La cohort d'aquest treball és molt difícilment comparable amb la dels darrers dos estudis mencionats, doncs presentava una edat mitja de 12 anys, un temps d'evolució de la malaltia de 6 anys i l'absència de complicacions cròniques associades o d'altres FRCV. Tanmateix, en l'anàlisi de la potencial vinculació entre les concentracions d'YKL-40 i l'ateroesclerosi precoç pròpia de la DM1, es va detectar una associació significativa i independent entre les concentracions d'YKL-40 i el GIMC.

2.4.3 MALALTIA HEPÀTICA PER DIPÒSIT DE GREIX NO ALCOHÒLICA

La malaltia hepàtica per dipòsit de greix no alcoholica, lipoidosi hepàtica o EHNA és una hepatopatia que engloba des de l'esteatosi fins a la cirrosi, tot passant per l'esteatohepatitis no alcoholica. L'alteració que produeix s'assembla molt a l'hepatopatia induïda per alcohol, llevat que es produeix en pacients que no presenten un consum abusiu d'aquesta substància¹⁰⁸.

Existeix molta disparitat de dades sobre la prevalença de l'esteatosi hepàtica en població general, xifrant-se entre el 10% i el 40% segons la mostra. La major part dels estudis apunten que la presència d'aquesta hepatopatia es troba incrementada entre els pacients amb diabetis, amb obesitat i sobretot, amb obesitat de distribució central i entre els pacients amb dislipèmia¹⁰⁸.

La major part de les investigacions realitzades en persones amb DM1 detecten una elevada prevalença d'esteatosi hepàtica¹⁰⁹⁻¹¹², tot i que no és una troballa unànime¹¹³ i novament, les dades de prevalença descrites en la literatura entre els pacients amb DM1 són molt variables. Els valors descrits oscil·len entre el 10%¹¹³, xifra de prevalença inferior a les reportades en població general en el nostre territori^{114,115}, el 30 i el 50%¹⁰⁹⁻¹¹¹.

Mesura del dipòsit de greix hepàtic:

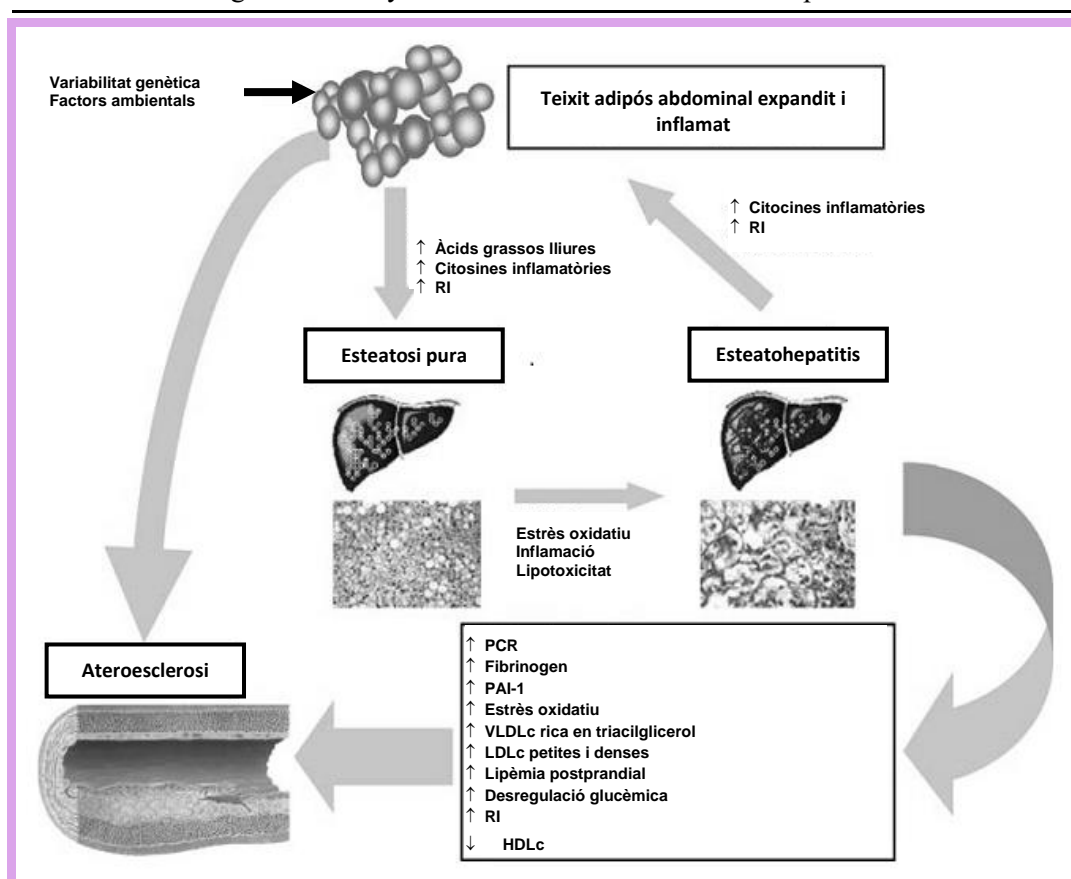
Per a l'estudi de l'estructura hepàtica s'utilitza un ecògraf equipat amb un transductor d'elevada freqüència (4 MHz). El protocol que es proposa per la seva avaluació s'especifica seguidament i es fonamenta amb recomanacions preestablertes de la literatura^{116,117}:

- a) S'han d'obtenir set diferents imatges de cada pacient:
 - Dues adquisicions del lòbul hepàtic esquerre.
 - Dues adquisicions del lòbul hepàtic dret, incloent el diafragma i el còrtex renal dret.
 - Una tall de la bifurcació portal i de les venes hepàtiques.
 - Un tall de l'hílum hepàtic.
 - Una imatge de la vesícula biliar.
- b) S'ha d'establir la presència o absència d'EHNA.
- c) Per a cada pacient s'ha de quantificar el grau d'esteatosi estratificant-la en lleu, moderat o greu. Aquesta definició es determina segons si l'ecogenicitat es troba incrementada respecte el còrtex renal, es detecta una atenuació de l'ona d'ultrasons o existeix una deficient definició del diafragma o dels vasos intrahepàtics.

Esteatosi hepàtica no alcohòlica en població amb diabetis mellitus:

El vincle entre la presència d'esteatosi hepàtica i els trastorns del metabolisme de la glucosa és complex. La diabetis mellitus provoca alteracions en el teixit adipós, incrementant-ne la síntesi de citocines proinflamatòries i promovent la resistència d'aquest teixit a l'acció de la insulina. En situació de RI, la dificultat d'acció de la insulina es tradueix en una estimulació de la lipòlisi i de la glucogènesi, així com d'una alliberació d'àcids grassos lliures al torrent sanguini i a nivell de la circulació portal. Els productes que se'n deriven s'acumulen en l'hepatòcit propiciant l'aparició d'esteatosi hepàtica. Més enllà d'aquest influx excessiu de greixos cap al fetge i de la seva acumulació en els hepatòcits, fins a un 15% dels triglicèrids implicats en aquesta patologia provenen dels àcids grassos i dels sucres de la dieta¹¹⁸⁻¹²⁰.

Aquesta afecció hepàtica es podria considerar tant causa com conseqüència d'un estat d'inflamació sistèmica crònica. Per una banda, la RI de determinades condicions metabòliques afavoreix, com hem vist anteriorment, l'aparició d'EHNA. D'altra banda, alguns estudis han vinculat la presència d'EHNA amb un fenotipus sèric proaterogènic amb concentracions incrementades de biomarcadors protrombòtics com la PCR, el fibrinogen, el PAI-1 i unes concentracions disminuïdes d'HDLc i d'adiponectina^{121,122}. **(Figura 3)**

FIGURA 3. Patogènia del dany vascular en context d'esteatosi hepàtica no alcohòlica

RI: resistència a la insulina, PCR: proteïna C reactiva, PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen 1, VLDLc: colesterol unit a lipoproteïnes de molt baixa densitat, LDLc: colesterol unit a lipoproteïnes de baixa densitat, HDLc: colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat

Adaptat de Targher G, Marra F, Marchesini G. Increased risk of cardiovascular disease in non-alcoholic fatty liver disease: causal effect or epiphenomenon? *Diabetologia*. 2008 Nov;51(11):1947-53¹²²

Aquesta associació entre EHNA, inflamació sistèmica crònica i RI, s'ha proposat com a fonament fisiopatològic en l'associació d'EHNA amb la MCV subclínica i és recolzada per molts autors. En aquesta direcció s'ha vinculat la presència d'EHNA i, sobretot la seva forma amb esteatohepatitis amb elevació de les concentracions sèriques dels enzims hepàtics, amb la presència de MCV subclínica. Tot i que n' existeixen discrepàncies^{123,124}, la major part dels treballs corroboren aquesta connexió, tant en població general^{118,120-122,125} com en pacients amb DM2^{118,126-128}.

Diabetis mellitus tipus 2:

En els diferents estudis entre DM2, EHNA i MCV subclínica, la RI es troba com un element comú de les tres condicions. En un estudi realitzat a Corea del Sud en una cohort de 4.437 pacients amb DM2, es va realitzar l'avaluació de la presència d'EHNA i la mesura del GIMC mitjançant ecografia carotídia. Un 72,7% (3.226 pacients del total de la població) presentava EHNA i al seu torn, aquests pacients amb DM2 i EHNA van ser subdividits en pacients amb RI i sense RI (2.479 vs 747 sense RI). En l'estudi es va observar que el grup de pacients amb DM2, EHNA i RI tenia un GIMC mig significativament major al dels grups de pacients amb DM2 sense EHNA o sense RI, recolzant la necessitat de les dues condicions metabòliques per derivar en un ambient proaterogènic¹²⁶.

En la mateixa línia, en un estudi italià de Targher i col.¹²⁷, es va comparar el GIMC de 100 pacients amb DM2 i EHNA respecte el GIMC de 100 pacients amb DM2 però sense EHNA. El GIMC mig dels pacients amb diabetis i EHNA fou significativament major al dels pacients amb diabetis sense EHNA ($1,24 \pm 0,13$ vs $0,95 \pm 0,11$ mm, $p < 0.001$). En l'estudi de regressió lineal es va objectivar que l'índex del *homeostatic model assessment* (HOMA) que estima la RI s'associava de forma independent al GIMC mentre que la presència d'EHNA no, novament recolzant la necessitat de la coexistència d'ambdós factors o la necessària participació de la RI.

Un altre exemple el trobem en un estudi transversal amb 213 pacients amb DM2 de Corea del Sud. En aquest treball de Kwak i col.¹²⁸ es va establir una correlació estadísticament significativa entre la presència d'EHNA i la MCV subclínica mesurada per CACs en els pacients amb mal control glucèmic, establint-se com a mal control glucèmic una $HbA1c \geq 7\%$.

Diabetis mellitus tipus 1:

Sembla lògic que no existeixi tanta literatura que avaluï el potencial vincle entre diabetis, EHNA i MCV subclínica en pacients amb DM1 donada la reiterada necessitat de RI observada en els estudis sobre població amb DM2. Malauradament, el model de DM1 sense RI és cada cop menys freqüent pel fet que existeix un increment dels trastorns metabòlics associats a la RI en els pacients amb DM1, com l'obesitat i la síndrome metabòlica. La coexistència de la DM1 i aquests

trastorns és un fenomen creixent que s'ha anomenat "Diabetis doble" on la condició de DM1 es suma a un fenotipus propi dels pacients amb DM2¹⁹. De la mateixa forma que hem vist en població amb DM2, també en els pacients amb DM1 cal la coexistència de RI i EHNA per a propiciar l'aparició de MCV subclínica¹²⁹.

En l'anàlisi del vincle entre l'EHNA i la MCV subclínica en els pacients amb DM1, trobem autors que recolzen que l'existència de l'hepatopatia s'associa amb una major presència de FRCV clàssics com la PAs i la pressió arterial diastòlica (PA_d)¹⁰⁹, altres descriuen una major coexistència de complicacions cròniques microvasculars com la retinopatia diabètica o la nefropatia diabètica^{109,111} i fins i tot, hi ha investigacions que associen l'EHNA amb l'aparició de complicacions cròniques macrovasculars com la MAC, la malaltia cerebrovascular i la malaltia vascular perifèrica^{110,112} o la MVC subclínica detectada per GIMC¹²⁹.

En la recent investigació de Zhang i col.¹²⁹ realitzada sobre una mostra de 722 pacients amb DM1 de Shanghai, es va analitzar la mesura del GIMC en funció de la presència d'EHNA. En aquest treball transversal es va detectar un 15,9% de prevalença d'EHNA i, en el grup de pacients amb EHNA es va objectivar un major GIMC mig ($0,81 \pm 0,25$ vs. $0,69 \pm 0,18$ mm; $p < 0.001$) i una major presència de plaques carotídies (28,9% vs. 16,9%; $p < 0.05$). En l'estudi de regressió lineal es van corroborar com a factors independentment relacionats amb GIMC: l'edat, la presència d'EHNA i les concentracions de PCR-as. Si es revisen de forma més curosa els grups a estudi (pacients amb DM1 i EHNA contra pacients amb DM1 sense EHNA), trobem clars indicis que la RI és un factor clau en el vincle entre l'hepatopatia i el GIMC. Els pacients amb EHNA presentaven, de forma estadísticament significativa, un major IMC, un major perímetre de cintura, una major prevalença de síndrome metabòlica i un pitjor control de FRCV com la PA i la dislipèmia. Tots aquests factors s'associen per sí mateixos a la RI.

En la mateixa línia argumental trobem l'estudi de Mantovani i col.¹¹². En aquest treball prospectiu on es reclutaren 286 pacients amb DM1 d'Itàlia es va efectuar un seguiment de fins a 5 anys. Entre els resultats obtinguts, es va detectar una elevada prevalença de fins el 52% d'EHNA i, més enllà d'això, es va confirmar una associació independent entre la presència d'esteatosi hepàtica amb el risc de patir esdeveniments CV.

2.5 APROXIMACIÓ DIAGNÒSTICA DE L'ARTERIOESCLEROSI EN LA DIABETIS MELLITUS

2.5.1 AVALUACIÓ DEL RISC CARDIOVASCULAR EN EL PACIENT AMB DIABETIS MELLITUS

La manca de precisió en establir el major risc CV del pacient amb DM1 o DM2 és proporcional a la manca d'eines validades per a la seva avaluació. En la majoria dels casos, el diagnòstic de la MCV es basa en els seus símptomes i per tant, és difícil la seva detecció en fase subclínica. El diagnòstic precoç, sobretot en el pacient amb DM1, és imprescindible, doncs ho requereix l'elevada possibilitat que el primer episodi sigui mortal, l'elevada taxa de mortalitat per MCV en la població amb DM1 i la irreversibilitat del dany arterial en l'arterioesclerosi avançada.

Les eines per avaluar el risc CV presenten particularitats quant als pacients amb diabetis:

2.5.1.1 TAULES DE RISC CARDIOVASCULAR

Les taules majorment emprades a Catalunya són:

- *National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III)*³⁸
- **Les taules europees del *Systematic Coronary Risk Evaluation (SCORE)***¹³⁰
- **Les taules del Registre Gironí del Cor (REGICOR)**¹³¹

Les taules NCEP-ATPIII, vinculades a l'equació de predicció d'esdeveniments coronaris de Framingham, estimen el risc a 10 anys de MAC (incloent infart agut de miocardi (IAM) fatal i no fatal) i en canvi, les taules SCORE avaluen el risc de mort per causa CV a 10 anys. Ni les taules basades en la cohort de Framingham ni les taules SCORE avaluen específicament el risc CV en el pacient amb diabetis mellitus, donat que consideren la DM1 o la DM2 com un equivalent coronari^{6,38}, equiparant-ne el risc al d'un pacient amb MCV establerta o com un condicionant d'elevat risc CV per se. D'aquesta forma, cap de les dues eines avaluadores especifiquen un risc determinat a 10 anys per als pacients amb diabetis mellitus i simplement el classifiquen directament com a un pacient d'alt risc, entenent-se com a alt risc una probabilitat major del 20% de patir MAC als 10 anys (NCEP-ATPIII) o una probabilitat major del 10% de morir per causa CV als 10 anys (SCORE)¹³⁰. Recentment han aparegut nous estris per a l'avaluació del risc CV en el pacient amb diabetis

mellitus com l'UKPDS Risk Engine, basat en els resultats del seguiment de la cohort de l'estudi *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS)¹³².

S'ha comprovat que les taules NCEP-ATPIII sobreestimen el risc CV en poblacions amb baix risc CV inherent (com la població de Catalunya sense DM2) així com el d'aquelles poblacions amb un relatiu major risc CV (com la població amb DM2 de Catalunya). Aquest fet és així fins al punt que es va creure necessari el calibratge a la baixa per a la nostra població en el REGICOR¹³¹. A més, aquestes taules adaptades per a la població catalana estratifiquen el risc segons si el pacient té diabetis, mentre que les taules SCORE o les NCEP-ATP III no permeten aplicar aquesta correcció.

Respecte l'avaluació del risc CV dels pacients amb DM2, les taules d'avaluació basades en població anglosaxona (NCEP-ATPIII i UKPDS Risk Engine) sobreestimen el risc dels pacients amb DM2 del nostre territori i les taules REGICOR el subestimen. Així doncs i en general, les taules de predicció del risc CV presenten resultats no òptims tant en sensibilitat (25-75%) com en especificitat per als pacients amb diabetis¹³³.

En un document específic sobre la DM1 i la MCV de l'*American Diabetes Association* (ADA) i de l'AHA⁴⁰ s'exposa la manca d'eines per a l'aproximació diagnòstica del risc CV dels pacients amb DM1. Especifica que les eines d'estudi del risc CV de la població general o pròpies de la DM2 basades en els algoritmes de l'UKPDS, no són vàlides per als afectes de la DM1. Com a alternativa es proposen els models derivats de l'estudi de la cohort de Pittsburgh de l'*Epidemiology of Diabetes Complications Study*. Aquests models inclouen variables com el temps d'evolució de la malaltia, l'albuminúria o el recompte de glòbuls blancs¹³⁴. Malgrat que aquest algoritme fou validat en l'estudi *The European Diabetes Prospective Complications Study* (EURODIAB)¹³⁵, ha estat pobrament adoptat.

Altres eines han estat proposades com l'ADA *risk-assessment tool* o l'*Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC) *risk predictor*, presentant una dubtosa utilitat en DM1.

2.5.1.2 ÍNDEX TURMELL-BRAÇ

Aquesta senzilla prova que resulta de dividir la PAs dels turmells entre la PAs braquial, aporta informació útil per l'avaluació de la presència de malaltia arterial perifèrica. Per a una correcta realització, utilitzarem els valors més elevats de PAs de les extremitats inferiors i de les extremitats superiors i, dels dos ITB que n'obtidrem, dret i esquerre, elegirem el menor³³.

En població general, un ITB inferior a 0.9 té una sensibilitat del 95% i una especificitat del 99% a l'hora de detectar una obstrucció arterial superior al 50% respecte l'arteriografia, considerada la prova *gold estàndard*. També en població general, un ITB disminuït s'ha vinculat amb una major prevalença de MCV, malaltia cerebrovascular, arterioesclerosi carotídia mesurada per GIMC, mortalitat CV^{136,137} i se li han atribuït propietats com a predictor de MCV i mort de causa CV, independentment de la presència de criteris de la síndrome metabòlica¹³⁷⁻¹³⁹. Tanmateix no hi ha informació homogènia al respecte, doncs altres estudis han detectat una baixa sensibilitat de l'ITB per a la detecció de MCV subclínica mesurada per GIMC¹⁴⁰.

En pacients amb DM2 disposem de menys literatura. Varis estudis vinculen un valor d'ITB disminuït amb l'edat avançada, una major duració de la diabetis i la malaltia arterial perifèrica¹⁴¹, així com, amb un elevat risc de mort per causes CV^{142,143}. Malgrat tot, no tots els estudis van en la mateixa direcció, doncs sembla que la mesura de l'ITB no guarda una bona correlació amb la detecció de MCV subclínica per CACs en pacients amb DM2¹⁴⁴.

Tant en població amb DM1 com amb DM2, aquest índex perd sensibilitat en aquells pacients amb una durada de la malaltia superior als 10 anys¹⁴⁵ i també en aquells subjectes on coexisteixen complicacions cròniques com la neuropatia diabètica o la vasculopatia perifèrica amb calcificació arterial associada^{143,145}. En un estudi britànic del 1993 que es va efectuar amb 137 pacients amb diabetis mellitus (59% amb DM1) i 50 controls sans no diabètics, es van detectar ITB falsament elevats en els pacients amb diabetis respecte el controls i sobretot en els pacients amb diabetis i neuropatia diabètica. En l'estudi es correlacionen aquests ITB incrementats, que assolien valors de normalitat en alguns pacients, amb la presència de calcificació arterial medial (alteració especialment prevalent en els pacients amb DM1), amb neuropatia diabètica i amb una llarga durada de la malaltia. Finament, es proposa l'índex dit del peu-braç i no l'ITB per aquestes poblacions¹⁴⁶.

2.5.1.3 ECOGRAFIA CAROTÍDIA

L'arterioesclerosi s'ha d'entendre com una malaltia sistèmica que afecta a diferents àrees vasculars de forma simultània, tant en artèries de mitjà com de gran calibre, presentant un especial tropisme sobre les artèries coronàries, caròtides, vertebrals, cerebrals, ilíaqües i femorals. Per tant, la detecció d'aquesta vasculopatia en algun d'aquests territoris pot ésser un indicador de la presència d'arterioesclerosi en d'altres.

L'ecografia de l'artèria caròtida és un mètode no invasiu i altament reproduïble que ens millora l'habilitat per estratificar els pacients segons el risc CV. Mitjançant un ecògraf en mode B, es mesura el GIMC en el seu recorregut extracranial i s'avalua la presència de plaques carotídies. Importants estudis de cohorts realitzats en població general, han recolzat que el GIMC o la presència de plaques carotídies són FRCV independents de MAC i malaltia cerebrovascular¹⁴⁷⁻¹⁵⁰. També en població general, s'ha comprovat que el GIMC dels pacients amb isquèmia miocardiàca silent és major, avalant aquesta tècnica per a l'avaluació de MCV subclínica en el pacient asimptomàtic^{73,151}.

Diabetis mellitus tipus 2:

En població amb DM2 s'ha detectat un GIMC major que en pacients amb intolerància a la glucosa¹⁵² i que en subjectes no diabètics¹⁵³. A més, de la mateixa forma que s'ha establert en població no diabètica, actua com una eina de predicció d'esdeveniments CV amb una sensibilitat i especificitat similar a l'aplicació de les taules NCEP-ATP III¹⁵⁴.

Diabetis mellitus tipus 1:

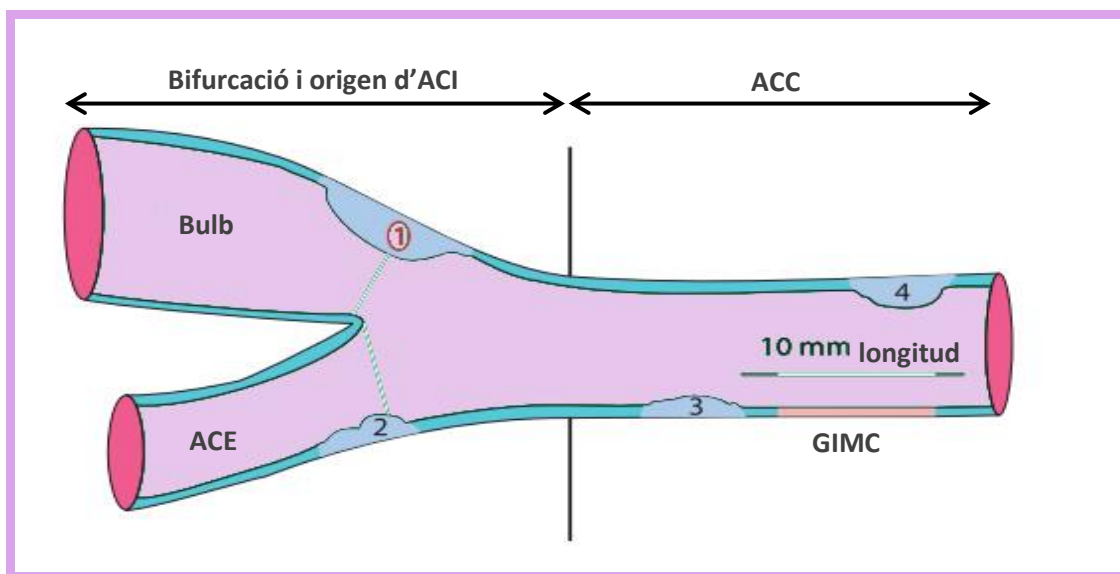
Alguns estudis demostren un major GIMC en els pacients amb DM1, independentment del gènere, respecte als subjectes sense diabetis i des d'estadis inicials de la malaltia^{43,44,155}, tot i que no tots^{156,157}. El 2015 es va publicar un meta-anàlisi de 47 articles que comparaven el GIMC de pacients amb DM1 contra el GIMC de controls sans sense diabetis i, entre els articles se n'hi inclou un realitzat en població catalana. En aquest treball es va concloure que el GIMC dels pacients amb DM1 era significativament major que el GIMC dels subjectes no diabètics¹⁵⁸.

En una anàlisi de regressió lineal múltiple realitzat sobre les dades del GIMC de 310 pacients amb DM1 es van establir com a determinants de l'increment de GIMC, l'edat, el sexe masculí, les concentracions de triglicèrids i la coexistència de nefropatia diabètica¹⁵⁵. Mentrestant, en un altre treball, s'hi va vincular la coexistència dels FRCV clàssics^{43,44}.

Mesura de l'ateroesclerosi carotídia:

Per a la mesura del GIMC s'utilitza un ecògraf d'alta resolució en mode B, que consta d'un transductor elèctric i lineal de 13-5 MHz i, a més, s'estableix un protocol d'exploració que ha d'incloure: a) la revisió de les parets proximals i distals del segment d'1 cm distal de l'artèria carotídia comú (ACC) (Figura 5) per a la mesura del GIMC i la detecció de plaques carotídies, b) la inspecció de la bifurcació carotídia, c) el repàs de l'origen, aproximadament els primers dos centímetres, de l'artèria carotídia interna (ACI).

FIGURA 5. Regions carotídies en l'exploració d'ultrasonografia



1: gruix > 1,5 mm, 2: invasió luminal > 0,5 mm, 3,4: > 50% del GIMC circumdant

ACC: artèria carotídia comú, ACE: artèria carotídia externa, ACI: artèria carotídia interna

Adaptació de Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco 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;23(1):75-80¹⁵⁹

Per a una avaluació homogènia es van delimitar els conceptes següents:

Placa carotídia:

Es considera l'existència d'una placa carotídia en tres possibles escenaris (**Figura 5**):

- a) Lesions focals que provoquen una invasió luminal de, com a mínim, 0,5 mm.
- b) Lesions focals que provoquen una invasió luminal de, com a mínim, el 50% del GIMC circumdant.
- c) Un àrea amb un GIMC $> 1,5$ mm.

Per establir el gruix d'una placa carotídia es mesura, de forma perpendicular a la direcció del vas sanguini, des del punt de major invasió intraluminal de la lesió fins a la interfície media-adventícia.

Gruix íntima-mitja carotídi:

Aquest s'estudia en un punt lliure de plaques carotídies i en el recorregut del segment d'1 cm distal de l'ACC. Aquest segment, a nivell proximal, comença just abans de l'inici de la separació de les parets de l'ACC prèvia a la bifurcació (**Figura 5**). El GIMC es defineix com la longitud, mesurada en perpendicular respecte la direcció del vas sanguini, des de la interfície media-adventícia fins a la interfície íntima-lumen, expressada en mm.

2.5.1.4 CALCIFICACIÓ ARTERIAL CORONÀRIA

La mesura del calci de les artèries coronàries mitjançant una TC de feix ràpid o una TC per multidetectors s'ha demostrat predictora d'esdeveniments CV i de mort per qualsevol causa, en subjectes no diabètics¹⁶⁰⁻¹⁶².

Ja en les primeres fases de l'ateroesclerosi coronària, des de la fase de formació de la placa greixosa, trobem una acumulació progressiva de calci a la paret vascular. El mecanisme concret es desconeix però es postula que podrien estar-hi implicades unes proteïnes denominades proteïnes contenidores de gamma-carboxiglutamat que presenten una elevada afinitat a la hidroxipatita de fosfat càlcic. La regulació de la calcificació no sembla ser un procés passiu sinó per contra, es creu que està subjecte als mecanismes de formació i remodelació ossis¹⁶¹.

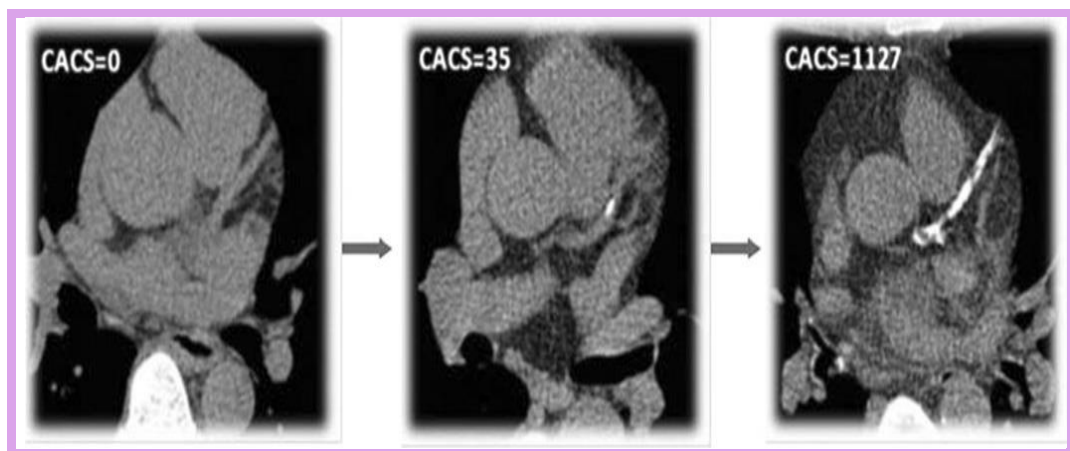
Per a una unificada avaluació, es va preestablir el concepte següent:

Calcificació coronària

- a) Una CAC és tota aquella zona densa, centrada en l'artèria coronària i amb una densitat superior a 130 UH.

Un exemple de progressió de CACs el trobem de l'article de revisió de Youssef i col.¹⁶³. (Figura 6).

FIGURA 6. Increment progressiu de la calcificació arterial coronària i del calcificació arterial coronària *score*



CACs: calcificació arterial coronària *score*

Adaptat de Youssef G, Kalia N, Darabian S, Budoff MJ. Coronary calcium: new insights, recent data, and clinical role. *Curr Cardiol Rep.* 2013 Jan;15(1):325¹⁶³

En el 1992 i després d'estudiar 522 coronàries, tant mitjançant l'avaluació del calci per TC com histològicament, es va comprovar una bona correlació entre la mesura de la CAC per TC, la localització anatòmica de les plaques i el grau de calcificació d'aquestes¹⁶⁴. Basant-se en aquest fet, es va establir un sistema d'avaluació de les imatges tomogràfiques denominat *Agatston score*. Aquesta puntuació té en compte dos factors principals que són, la densitat mesurada per unitats Hounsfield (UH) i l'àrea de les calcificacions en mil·límetres (mm) quadrats. Segons la densitat de la lesió s'hi associa un valor determinat (0, per densitats inferiors a 130 UH, 1 per densitats compreses entre 130 i 199 HU, 2 entre 200 i 299 UH, 3 entre 300 i 399 UH i 4 per densitats iguals o superiors a 400 UH). Aquest valor es multiplica per l'àrea mesurada en mm quadrats de totes les calcificacions. Del sumatori de tots els productes s'esdevé la puntuació d'Agatston o CACs que

s'expressa en UA¹⁶⁵. El CACs s'ha correlacionat de forma directa amb el risc de patir esdeveniments CV i amb la mortalitat per qualsevol causa¹⁶². Centrant-nos en els pacients amb diabetis mellitus, el CACs ha estat proposat com a predictor de la MCV subclínica.

Diabetis mellitus tipus 2

Independentment de la presència o del control dels FRCV tradicionals, els pacients amb DM2 asimptomàtics presenten un major valor de CACs respecte als controls sense diabetis. Aquest fet apunta a algun mecanisme fisiopatològic o a un FRCV no clàssic no ben establert i difícilment justificable per l'existència o el control dels FRCV clàssics¹⁶⁶. Concretament, l'associació entre CACs i els FRCV, tant els clàssics com els de més recent descripció, varia molt segons es tracti d'un pacient amb DM2, amb DM1 o es tracti d'un subjecte sense diabetis, tal com es demostra en la taula següent¹⁶¹. **(Taula 4)**

Com a predictor de MCV, el valor del CACs està relativament ben establert en pacients amb DM2¹⁶⁷.

Diabetis mellitus tipus 1

En pacients amb DM1 s'ha comprovat que el CACs és major que en la població general. Hi ha autors que, més enllà de corroborar aquesta relació entre DM1 i major puntuació del CACs, postulen que la RI podria tenir-hi un pes important^{16,161}.

En l'intent d'explicar el perquè la condició de pacient amb DM1 implica una major puntuació del CACs i, a banda de l'existència d'un major o menor component de RI, semblaria que el control glucèmic podria estar-hi implicat. En un estudi observacional realitzat sobre la cohort del DCCT denominat EDIC i anteriorment mencionat, es van realitzar 1.205 mesures del CACs després de vuit anys de la fi del l'estudi DCCT.

TAULA 4. Associacions entre el CACs i els factors de risc cardiovascular nous i convencionals

	NO DIABETIS	DM2	DM1
Edat	++	++	+
Gènere	++	++	+
Ètnia	++	?	?
Raó cintura-maluc	+	++	+
IMC	+	-	-
PAs	+	+	+
Colesterol total	+	-	-
HDLc (disminuït)	+	-	-
Colesterol total/HDLc	+	-	+
Triglicèrids	+	-	+
Risc Framingham	+	+	?
Glucosa en dejú	+	-	NV
Diabetis	++		
Hàbit tabàquic	+	-	+
PCR	-	-	-
Homocisteïna	-	-	-
HbA1c	?	-	+
Resistència a la insulina	+	-	+
Microalbuminúria	?	-	+
Apo B	+	+/-	?
Fibrinogen	-	-	?

CACs: calcificació arterial coronària score, DM2: diabetis mellitus tipus 2, DM1: diabetis mellitus tipus 1, IMC: índex de massa corporal, PAs: pressió arterial sistòlica, HDLc: colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat, PCR: proteïna C reactiva, HbA1c: hemoglobina glicosilada A1c, Apo B: apolipoproteïna B, NV: no valorable

Adaptat de Elkeles RS. Coronary artery calcium and cardiovascular risk in diabetes. *Atherosclerosis* 2010;210:331-336¹⁶¹

Es precis recordar que l'estudi DCCT fou un assaig clínic, aleatoritzat, multicèntric i dissenyat per contraposar un tractament intensiu (amb un objectiu glucèmic estricte d'HbA1c \leq 6.0%) contra un tractament convencional i de cara a avaluar-ne els efectes quant a la prevenció de les complicacions vasculars i neurològiques pròpies de la DM1^{168,169}. Un subestudi de l'estudi EDIC¹⁷², al seu torn, va evidenciar que el CACs dels pacients prèviament tractats de forma intensiva era menor que la d'aquells tractats prèviament de forma convencional. Tanmateix, aquesta milloria de l'estatus coronari només es va poder comprovar en els pacients de la branca de tractament intensiu. Aquesta associació fou posada en dubte perquè la branca dels

pacients sota tractament intensiu, en el moment d'entrar a l'estudi, presentaven una menor evolució de la malaltia (d'1 a 5 anys) i una absència de retinopatia diabètica.

Tot i les darreres puntualitzacions, aquest estudi va aportar evidència sobre la vinculació entre el control glucèmic i les complicacions macrovasculars, mesurades pel càlcul de CACs per mitjà de la TC¹⁶⁹. Aquesta associació, no s'ha pogut demostrar en pacients amb DM2^{166,170}.

El valor del CACs també s'ha avaluat en pacients amb DM1 com a predictor de MCV i, en la literatura, trobem estudis que indiquen que el CACs és un potent predictor de MAC. Per exemple, en una cohort amb 302 pacients adults amb DM1, seguida durant 10 anys, es va trobar que el CACs resultava ser un FRCV independent per MAC i per IAM. Aquesta afirmació es complia per ambdós sexes, però presentava més potència en el cas dels homes. En l'anàlisi exhaustiva de les dades, es detectà una sensibilitat del 84% per a la predicció de MAC i una del 100% per a IAM en els homes, mentre que en les dones resultà del 71% i del 100%, respectivament. A més a més, es va poder definir el punt de tall de 400 UA com el més eficient per a la predicció de MAC en ambdós sexes¹⁷¹.

2.5.2 CRIBRATGE DE L'ARTERIOESCLEROSI SUBCLÍNICA EN PACIENTS AMB DIABETIS ASIMPTOMÀTICS

En les guies de maneig terapèutic de la diabetis mellitus de l'ADA es desaconsella el cribratge CV dels pacients asimptomàtics, justificant que aquestes no proporcionen una avantatge quant als resultats de predicció de MCV respecte al control del FRCV clàssics. Únicament es considera adequada, segons la majoria de les guies, la realització de proves d'imatge cardíaques en aquells pacients que presenten: a) Síntomes CV atípics com dispnea no explicable o dolor toràcic. b) Alteracions en l'ECG com les ones Q. c) Signes o símptomes de malaltia vascular com el buf carotidi, infarts antics, ictus, la claudicació intermitent o la malaltia vascular perifèrica.

Aquestes guies de maneig situen, per tant, el cribratge de la MCV subclínica dels pacients amb DM1 en el territori de la prevenció secundària, recomanant l'estudi quan hi hagin símptomes. D'altra banda, no diferencien estratègies a seguir en població amb DM1 i en població amb DM2, entenent-les com a una única entitat. Finalment, no fan menció de l'ecografia carotídia amb la mesura del GIMC com a mètode de cribratge de la MCV subclínica³⁹.

En el document específic sobre la DM1 i la MCV de l'ADA i de l'AHA⁴⁰ es desaconsella el cribratge CV en els pacients amb DM1 asimptomàtics i en aquelles poblacions d'alta prevalença. Novament, es proposa la realització de proves diferents a l'ECG en els pacients amb símptomes CV o amb un ECG anormal. Tanmateix, el propi document especifica que aquesta afirmació es basa en guies que no diferencien entre DM1 i DM2 i que, sobretot en aquells pacients amb DM1 i malaltia renal, s'hauria de prestar una especial atenció. Creiem que tot plegat es quelcom discutible i que segurament es produiran canvis en els propers anys, introduint més el concepte de detectar malaltia subclínica i tractar-la, en el que avui entenem com a medicina de precisió, ja que el tractament de FRCV té una predicció ben poc precisa.

En aquest document es proposa la prova d'esforç com la prova de cribratge inicial a realitzar, basant-se en la seva cost-efectivitat i disponibilitat. Tanmateix, existeix una clara limitació quant als pacients amb neuropatia, peu diabètic, amputació, etc. Com a alternatives a la prova d'esforç i, malgrat no es disposa de suficients estudis que avaluin la utilitat d'aquestes proves en la predicció del risc CV en DM1, es proposa la quantificació del CACs i del GIMC.

Les guies de maneig de la *European Society of Cardiology* (ESC) en col·laboració amb la *European Association for the Study of Diabetes* (EASD)^{41,42} també qüestionen que el cribratge CV dels pacients amb diabetis asimptomàtics aporti beneficis més enllà del control dels FRCV clàssics i, igual que les guies anteriors, no diferencien entre DM1 i DM2 i segueixen acotant l'estudi de la isquèmia miocardiàca silent en aquells pacients amb signes de malaltia vascular perifèrica, amb un CACs incrementat, amb presència de proteïnúria o en aquells que volen iniciar un programa intensiu d'exercici físic. Per contra, a diferència de les altres guies, afegeixen que aquelles proves que detecten un dany dels òrgans vasculars diana com un ITB disminuït, un GIMC elevat, rigidesa arterial, una CACs incrementada, la presència de neuropatia autonòmica CV o d'isquèmia miocardiàca silent, poden contribuir a una més acurada predicció del risc CV i que la seva detecció hauria de conduir a un control intensiu dels FRCV com disminuir l'objectiu de LDLc de < 100 mg/dL a < 70 mg/dL o valorar tècniques de revascularització.

2.5.3 MALALTIA CARDIOVASCULAR SUBCLÍNICA EN EL PACIENT AMB DIABETIS MELLITUS TIPUS 1

2.5.3.1 PREVALENCIA DE MALALTIA CARDIOVASCULAR SUBCLÍNICA SEGONS CALCIFICACIÓ CORONÀRIA

La quantificació del CACs s'ha utilitzat ja en alguns estudis per a l'estimació de la prevalença de MCV subclínica en pacients amb DM1 asimptomàtics^{16,172-175} i a part, ja s'ha proposat la incorporació d'aquest *score*, tant en pacients amb DM1 del sexe masculí com del sexe femení, com a factor independent en la predicció de MAC i d'IAM¹⁷¹. Els estudis de la prevalença de MCV subclínica esmentats consideren la puntuació del CACs com una variable qualitativa, essent categòricament positiva amb valors superiors a 0 UA (**veure apartat 2.5.1.4**). Tal i com s'indica en la **Taula 5** hi ha diferents estudis que han avaluat la MCV silent per mitjà d'aquest paràmetre:

TAULA 5. Prevalença de calcificació arterial coronària *score* > 0 UA en pacients asimptomàtics amb diabetis mellitus tipus 1

	Dabelea i col.¹⁶ (EUA)	Colhoun i col.¹⁷³ (RU)	DCCT/EDIC¹⁷² (EUA)	Salem i col.¹⁷⁴ (EGIPTE)	Djaberi i col.¹⁷⁵ (PB)	Aguilera i col.¹⁷⁸ (CAT)
<i>N</i>	656	199	1205	60	65	150
Edat mitja (anys)	37	38	43	16	46	38
Evolució de la DM1 (anys)	23	24	21	12	23	20
HbA1c (%)	7.8	8.6	7.9	9.7	7.6	8.1
Retinopatia diabètica (%)	-	-	~50	30	-	26
Nefropatia diabètica (%)	-	-	~17	63	2	9
Hipertensió arterial (%)	14	21	29	-	49	15
Dislipèmia (%)	-	-	30	-	63	21
Tabaquisme (%)	~70*	~52*	~16 [†]	27 [†]	26 [†]	48*
CACs > 1 (%)	37	50	31	20	67	18
Homes (%)	48	52	-	68	-	33
Dones (%)	28	47	-	34	-	9

CACs: calcificació coronària *score*, DM1: diabetis mellitus tipus 1, DCCT/EDIC: Diabetes Control and Complications Study / Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study, EUA: Estats Units d'Amèrica, RU: Regne Unit, PB: Països baixos, CAT: Catalunya

*Fumadors actius i ex-fumadors, [†]Fumadors actius, ~Aproximació

En un estudi vinculat a l'anteriorment mencionat CACTI Study (**veure apartat 2.1.3**), Dabelea i col.¹⁶ van detectar una proporció de CACs > 0 UA en 243 dels 656 pacients amb DM1 estudiats (37% del grup amb DM1, 145 (48%) en homes vs 98 (27,5%) en dones, $p < 0.01$). En un altre estudi de característiques molt similars, Colhoun i col.¹⁷³ van detectar una positivitat de CACs

en 99 dels 199 pacients amb DM1 estudiats (49,7% del grup amb DM1, 50 (52%) en homes vs 49 (47%) en dones, $p = \text{NS}$). En un altre estudi derivat de la cohort DCCT/EDIC¹⁷², també mencionada anteriorment (**veure apartat 2.4.1**), es va avaluar la presència de MCV subclínica en una cohort de 1.205 pacients amb DM1 mitjançant el CACs. En aquest treball es va reportar una prevalença global de CACs > 0 UA del 31% de la mostra. De forma més detallada, la prova resultà positiva en 374 pacients asimptomàtics amb DM1 i es detectà un CACs > 200 UA en 102 pacients (8,5%).

En un estudi realitzat sobre una cohort de 60 pacients adolescents amb DM1 d'Egipte, amb un temps d'evolució de la malaltia de 12 anys, un mal control glucèmic amb una HbA1c mitja de 9,7% i una elevada proporció de complicacions cròniques microvasculars (30% de retinopatia diabètica, 63% de nefropatia diabètica i 10% de neuropatia diabètica), Salem i col.¹⁷⁴ van detectar un CACs > 0 UA en 12 pacients, reportant per tant, un 20% de prevalença.

Finalment, en una cohort de 65 pacients amb DM1 procedents dels Països Baixos, amb una durada de la malaltia i un control glucèmic crònic de 23 anys i 7,6% d'HbA1c, respectivament, Djaberi i col.¹⁷⁵ van detectar un CACs > 0 UA en 39 pacients, un 60% de la mostra a estudi.

2.5.3.2 PREVALENCIA DE MALALTIA CARDIOVASCULAR SUBCLÍNICA SEGONS ECOGRAFIA CAROTÍDIA

Una altra tècnica per valorar la MCV subclínica en els pacients amb DM1 asimptomàtics és la mesura del GIMC i la detecció de plaques carotídies mitjançant l'ecografia. L'existència d'ateroesclerosi en aquest territori es pot extrapolar a la presència d'ateroesclerosi coronària, ja que ambdós territoris presenten un tropisme similar a aquest deteriorament^{33,73,155}, (**veure apartat 2.5.1.3**).

Tot i existir-ne una metodologia ben establerta, la naturalesa contínua d'aquesta variable i la manca d'un valor de GIMC específic per establir l'existència d'ateroesclerosi carotídia, dificulta enormement parlar de prevalença de MCV subclínica segons aquesta tècnica o comparar dades entre diferents àrees geogràfiques. En la majoria dels estudis on s'avalua el GIMC en pacients amb DM1 se'n compara el valor mig entre pacients i els subjectes sans, però no s'especifica la proporció de pacients amb un GIMC anormalment incrementat o la proporció de pacients amb plaques carotídies^{43,155,157,158}.

A part, existeix molta heterogeneïtat a l'hora de presentar els resultats; alguns autors utilitzen la mitja aritmètica del GIMC amb comparacions entre els pacients i controls, mentre que d'altres reporten la proporció de pacients amb un GIMC major que un determinat percentil o d'un valor de GIMC arbitrari. Tanmateix, trobem una sèrie d'investigacions que estudien aquest tema.

En el treball de Frost i col.¹⁵⁵, un estudi alemany realitzat sobre una cohort de 310 pacients amb DM1 de més de 2 anys d'evolució de la seva malaltia, es va explorar el GIMC i la presència de plaques ateromatoses en el territori carotídi i es van comparar els resultats respecte un grup control no diabètic de 40 subjectes i un segon grup control de 40 subjectes amb recent diagnòstic (menys d'un any) de DM1. El grup a estudi va demostrar un GIMC de $0,57 \pm 0,13$ mm, que resultava significativament superior a ambdós grups controls. En l'anàlisi logístic es van correlacionar, de forma independent amb el GIMC, les variables de l'edat, el gènere, el temps d'evolució de la malaltia, la PAD, el perfil lipídic i la coexistència de complicacions cròniques com la retinopatia i la nefropatia diabètiques. En aquest article, tal i com succeeix en molts altres, no podem establir prevalença de MCV subclínica, únicament mitja aritmètica i comparacions.

En un estudi molt similar i realitzat a Noruega⁴⁴, es va revisar el GIMC de 314 pacients adolescents amb DM1 (edat mitja 13,7 anys) i es van estratificar els valors de GIMC segons el percentil. En aquest treball es va detectar una proporció del 19,5% de la mostra amb un GIMC superior al percentil 90 i del 13,1% superior al percentil 95. Per contribuir a l'heterogeneïtat de la presentació de les dades no s'especificava la mesura que corresponia a aquests dos percentils.

Finalment, en un estudi realitzat en la nostra àrea territorial, Giménez i col.¹⁷⁶, van avaluar 38 pacients amb DM1, asimptomàtics des d'un punt de vista CV i sense complicacions cròniques associades. Un 32% de la mostra presentava un GIMC superior al 0,542 mm o terç superior. Aquest valor no es va establir però, com a punt de tall de presència d'ateroesclerosi.

Tanmateix existeixen excepcions que ajuden a la interpretació d'aquests resultats:

En l'estudi de Frost del 1994¹⁷⁷, un altre estudi sobre població alemany, s'estableix com a GIMC patològic aquell GIMC major de 0,6 mm. Després d'analitzar el GIMC de 165 pacients amb DM1 asimptomàtics, s'hi va detectar un 18,7% de la mostra amb ateroesclerosi carotídia i una prevalença de plaques ateromatoses del 9,7%.

La **taula 6** resumeix la manca d'un consens a l'hora de determinar la presència d'ateromatosi subclínica mitjançant l'ecografia carotídia.

TAULA 6. Prevalença d'ateroesclerosi carotídia segons GIMC i presència de plaques ateromatoses

	Margeirs -dottir i col.⁴⁴ (EU)	Giménez i col.¹⁷⁶ (CAT)	Frost i col.¹⁷⁷ (EU)	Kupfer i col.⁸¹ (BRASIL)	Aguilera i col.¹⁷⁸ (CAT)
<i>N</i>	314	38	165	45	150
GIMC > 0.6 cm (%)	-	-	18,7	-	32
GIMC > percentil 90 (%)	19.5	-	-	-	9.9
GIMC > percentil 95 (%)	13.1	-	-	-	5.7
GIMC > terç superior (%)	-	32	-	-	34
Plaques ateromatoses (%)	-	21	9.7	13	11

GIMC: gruix íntima-mitja carotídi, EU: Europa, CAT: Catalunya

2.5.3.3 PREVALENCIA D'ATEROESCLEROSI PRECOÇ PER PRESENCIA DE PLAQUES ATEROMATOSSES CAROTÍDIES

Quant a la detecció de plaques ateromatoses, existeix més homogeneïtat de dades. En l'estudi amb una cohort catalana de Giménez i col.¹⁷⁶ es reporten plaques carotídies en 8 dels 38 pacients a estudi (21%). Aquesta cohort de pacients presentava una edat mitja de 38 anys, una evolució mitja de la malaltia de 15 anys i una HbA1c mitja de 6,6%.

Paral·lelament, en una cohort de 45 dones amb DM1 del Brasil asimptomàtiques per MCV (edat mitja 36 anys, evolució mitja 18 anys i HbA1c mitja de 8,5%) es reporta una prevalença de plaques carotídies d'un 13%⁸¹.

3. HIPÒTESI DE TREBALL

3.1 HIPÒTESI

Essent la DM1 un paradigma de malaltia associada al desenvolupament d'arterioesclerosi, de deteriorament vascular precoç i del risc de coronariopatia, una anàlisi minuciosa d'una cohort de pacients amb DM1 i d'un grup control sense diabetis, que inclogui variables clíniques, la presència de complicacions cròniques associades, la determinació de potencials biomarcadors proaterogènics proposats en la literatura, així com la mesura del CACs o del GIMC, pot contribuir a una millor detecció i caracterització d'aquell subgrup de pacients amb DM1 que presenten un major risc de desenvolupar esdeveniments CV, i així poder-hi establir estratègies més efectives i de més precisió pel que fa a la prevenció i al tractament precoç de la malaltia arterioescleròtica en la DM1.

3.2 JUSTIFICACIÓ DE LA HIPÒTESI

Amb un risc 10 vegades superior de patir trastorns CV que els subjectes no diabètics¹¹, la MCV i concretament, la coronariopatia, continua essent la principal causa de mort entre els pacients amb DM1. Recentment s'ha observat una lleu disminució en la taxa d'esdeveniments CV en aquest col·lectiu, tanmateix aquesta reducció no ha resultat significativament millor a l'observada en la població general¹³.

Tot i tractar-se de pacients amb un molt alt risc CV, amb una marcada predisposició a l'arterioesclerosi precoç i amb la coronariopatia com la principal causa de mortalitat, les societats científiques persisteixen desaconsellant el cribratge actiu i universal de la MCV entre els pacients asimptomàtics amb DM1. En revisar les principals guies de maneig terapèutic de la diabetis³⁹⁻⁴², no sempre s'esmenta l'ecografia carotídia amb la mesura del GIMC com a potencial prova de diagnosi preclínica i a part, únicament es contempla la realització de proves de cribratge CV en aquells pacients amb un ECG anormal o amb símptomes típics o atípics de MCV, que implica un moment cronològicament molt avançat del desenvolupament de la MCV en aquest pacients. Per tant, aquestes guies clíniques situen el cribratge CV en un territori complex entre la prevenció primària i la secundària.

En la nostra àrea geogràfica i en la nostra pràctica clínica habitual, l'estratificació del risc CV del pacient amb DM1 asimptomàtic es realitza mitjançant l'avaluació i el tractament dels FRCV

convencionals i practicant un ECG periòdic. Manquen estudis que avaluin la MCV silent en pacients amb DM1 de l'àrea Mediterrània, doncs actualment s'extrapola de dades d'altres regions geogràfiques, on ha estat avaluada mitjançant la quantificació del CACs o la mesura del GIMC, en la major part dels casos.

La implementació d'estudis orientats a aquesta finalitat aportarien un millor coneixement d'aquesta importantíssima problemàtica permetent aprofundir sobre la seva magnitud i servien per examinar la capacitat i validesa d'aquestes tècniques d'imatge i dels biomarcadors circulants en la detecció i el cribratge de la MCV preclínica. Tot plegat, ens dotaria d'una major precisió en la classificació dels pacients segons el seu risc i ens permetria fer una medicina més personalitzada i predictiva.

Basant-nos en tota aquesta informació, la nostra investigació va destinada a l'avaluació minuciosa d'una cohort de pacients amb DM1 de l'àrea Mediterrània, asimptomàtics per MCV i amb més de 10 anys d'evolució de la DM1 i, a més, l'estudi homòleg d'un grup control no diabètic. L'**objectiu principal** és la determinació de la prevalença de MCV silent entre els pacients asimptomàtics amb DM1 que viuen en una àrea territorial concreta de Catalunya. Paral·lelament es pretén esbrinar la utilitat en la diagnosi i la correlació entre els resultats de les diferents proves de cribratge CV, incloent l'ecografia carotídia o la puntuació de la CAC mesurada per TC. Finalment, es desitja aclarir la possibilitat d'identificar nous FRCV, no clàssics, associats causalment o no a l'aparició de l'ateroesclerosi coronària precoç associada a la DM1.

El descobriment d'aquests potencials nous FRCV no clàssics, més enllà del paper protector o contribuïdor de l'arterioesclerosi, pot posar les bases d'una millor estratificació dels pacients segons el seu risc CV. D'aquesta forma es podrien personalitzar estratègies preventives i intenses dirigides a la disminució de la taxa d'esdeveniments CV. Només així, es podrà millorar la morbimortalitat CV del pacient amb DM1, més enllà del progressos reportats amb les estratègies contemporànies¹³.

Entre els FRCV no clàssics, s'ha proposat la concentració de 25OHD, tant en població general com en població amb diabetis mellitus. En el nostre territori (Badalona, Latitud 41° 26' 00''), la prevalença de deficiència de 25OHD en pacients amb DM1 i la seva potencial associació amb la

presència de MCV subclínica no ha estat analitzada. L'anàlisi d'aquesta vitamina/hormona esteroïdal en sang podria esdevenir d'utilitat a l'hora d'individualitzar el risc coronari dels pacients amb DM1.

De la mateixa manera, s'han proposat biomarcadors inflamatoris com l'YKL-40 i l'adiponectina. En la nostra àrea territorial i d'influència, caracteritzada per un relativament reduït risc CV, l'estudi de les concentracions d'adiponectina o d'YKL-40 en les persones amb DM1 no ha estat realitzat ni en clau de comparació amb la població general ni en clau de FRCV no clàssic. Novament i, de forma sinèrgica amb la mesura de les concentracions de 25OHD, la determinació d'aquestes molècules pot aportar informació per a la correcta estratificació dels nostres pacients amb DM1 respecte el seu risc CV.

Finalment, la detecció d'EHNA per ecografia abdominal ha estat proposada com un nou FRCV. Alguns equips han investigat la prevalença d'EHNA en pacients amb DM1 de l'àrea Mediterrània i n'han valorat l'impacte respecte la presència de MCV subclínica. El nostre equip recolza la hipòtesi que els pacients amb DM1 de la nostra àrea presenten una potencial elevada prevalença d'EHNA i que la seva detecció és un indicador precoç i independent de l'arterioesclerosi subclínica accelerada pròpia de la DM1. En tot cas, no disposem de dades de prevalença d'EHNA en persones amb DM1 del nostre entorn geogràfic i, aquesta dada és convenient conèixer-la.

En resum, en aquest treball s'analitza el potencial de les proves de diagnosi precoç de la MCV subclínica en els pacients amb DM1 de l'àrea Mediterrània de l'entorn geogràfic de Badalona i detectar-ne els paràmetres analítics i/o radiològics vinculats. La finalitat és aconseguir una més precisa tipificació dels pacients amb DM1 segons el seu risc coronari per definir-ne subgrups de molt alt risc i dirigir-hi estratègies terapèutiques intenses en clau de prevenció primària.

4. OBJECTIUS DE TREBALL

4.1 OBJECTIU PRINCIPAL

Avaluar la prevalença de malaltia cardiovascular subclínica en la població de pacients amb diabetis mellitus tipus 1, amb més de 10 anys d'evolució de la seva malaltia i procedents de l'àrea geogràfica de Badalona

4.2 OBJECTIUS ESPECÍFICS

- 1. Comparar la prevalença de MCV subclínica en els pacients amb DM1 de la nostra àrea mitjançant la mesura del CACs, la mesura del GIMC i amb la detecció de plaques d'ateroma carotídiades i analitzar la potencial correlació entre els resultats de les diferents proves diagnòstiques.** Aquest objectiu s'ha perseguit en l'estudi:

Aguilera E, Serra-Planas E, Granada ML, Alonso N, Pellitero S, Pizarro E, Reverter JL, Salinas I, Soldevila B, Mauricio D, Puig-Domingo M. Low prevalence of subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with type 1 diabetes in a European Mediterranean population. Diabetes Care. 2014;37(3):814-20¹⁷⁸

- 2. Estudiar les concentracions de vitamina D dels pacients amb diabetis mellitus tipus 1 de l'àrea geogràfica de Badalona, amb més de 10 anys d'evolució de la malaltia i avaluar la possible associació amb la presència de malaltia cardiovascular subclínica.** Aquest objectiu ha estat objecte de l'estudi:

Serra-Planas E, Aguilera E, Granada ML, Soldevila B, Salinas I, Reverter JL, Pizarro E, Pellitero S, Alonso N, Mauricio D, Puig-Domingo M. High prevalence of vitamin D deficiency and lack of association with subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with Type 1 Diabetes Mellitus from a Mediterranean area. Acta Diabetol. 2015 Aug;52(4):773-9¹⁷⁹

- 3. Analitzar les concentracions de marcadors inflamatoris com l'YKL-40 i l'adiponectina entre els pacients amb diabetis mellitus tipus 1 de la nostra cohort i valorar-ne la potencial associació amb la presència d'aterosclerosi precoç. Aquest és l'objectiu principal desenvolupat en la investigació:**

Aguilera E, Serra-Planas E, Granada ML, Pellitero S, Reverter JL, Alonso N, Soldevila B, Mauricio D, Puig-Domingo M. 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 Sep 18;14:121¹⁸⁰

- 4. Identificar la presència d'esteatosi hepàtica no alcohòlica en un subgrup de pacients amb diabetis mellitus tipus 1 de la nostra cohort per establir-ne la prevalença i valorar la seva associació amb la presència de malaltia arterial coronària silenciosa. Objectiu desenvolupat en l'estudi:**

Serra-Planas E, Aguilera E, Castro L, Rodríguez R, Salinas I, Lucas A, Joaquín C, Puig R, Mauricio D, Puig-Domingo M. Low prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 1 diabetes is associated with decreased subclinical cardiovascular disease. J Diabetes. 2017 Dec;9(12):1065-1072¹⁸¹

5. ESTUDIS PUBLICATS

5.1 PRIMER ESTUDI

Títol:

Low prevalence of subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with type 1 diabetes in a European Mediterranean population.

Baixa prevalença d'aterosclerosi subclínica en pacients asimptomàtics amb diabetis mellitus tipus 1 en una població Mediterrània Europea.

Autors:

Aguilera E, Serra-Planas E, Granada ML, Alonso N, Pellitero S, Pizarro E, Reverter JL, Salinas I, Soldevila B, Mauricio D, Puig-Domingo M

Revista:

*Diabetes Care. 2014;37(3):814-20*¹⁷⁸

Factor d'impacte 2014:

8.42 (Quartil 1, Decil 1)

VERSIÓ POST-PRINT

LOW PREVALENCE OF SUBLINICAL ATHEROSCLEROSIS IN ASYMPTOMATIC PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS IN A EUROPEAN MEDITERRANEAN POPULATION

Eva Aguilera, Enric Serra, M. Luisa Granada, Núria Alonso, Silvia Pellitero, Eduarda Pizarro, Jordi Reverter, Isabel Salinas, Berta Soldevila, Dídac Mauricio and Manuel Puig-Domingo

Abstract

Screening of cardiovascular disease in asymptomatic type 1 diabetes (T1D) is a controversial issue.

Objective: To evaluate the presence of early carotid and coronary atherosclerosis in asymptomatic T1D patients with no history of ischemic heart disease.

Research Design and Methods: One hundred and fifty T1D patients (58% males; 38.6±8.1 years, 20.4±8.1 years of evolution; HbA_{1c}: 8.1±2.3%; 52% non-smokers; 26% retinopathy; 9% microalbuminuria) and 50 non-diabetic controls age and sex matched were studied. Carotid ultrasonography to determine cIMT and the presence of atheroma plaques, and cardiac CT for calcium analysis and quantification (CACS) were performed.

Results: Most T1D patients and controls displayed a CACS of 0 (82% vs 92%). T1D patients with CACS ≥1 were older and had higher HbA_{1c} (44.5±5.1 vs. 36.7±8.1 years p<0.001 and 8.5±1.1 vs. 7.8±1.0% p<0.003, respectively), longer evolution of diabetes (25.4±9.2 vs. 19.3±7.4 years p<0.005) and mean cIMT (0.53±0.11mm. vs. 0.67±0.18mm. p<0.001) compared to patients with CACS of 0. Smoking (p<0.02), nephropathy (p<0.05), retinopathy (p<0.05) and male gender (p<0.03) were significantly and positively associated to CACS ≥1. Mean cIMT was significantly higher in T1D patients (0.55±0.14 vs. 0.48±0.14mm p<0.01) and 11% of them presented atheroma plaques (8% controls). Multivariate logistic regression analysis showed that c-IMT was related to CACS (beta=6.87, p<0.001).

Conclusions: A small percentage of T1D patients showed data suggestive of subclinical atherosclerosis. Universal screening of coronary disease in this population is not justified. Carotid ultrasonography maybe useful for screening in the subset of patients with cardiovascular risk factors and long disease evolution.

Introduction

Cardiovascular disease and especially coronary heart disease (CHD) is the most common complication and the leading cause of death in type 2 diabetes (T2D) (1). Remarkably, type 1 diabetes (T1D) is associated with even a higher CHD risk of at least 10-fold increase compared to age matched non-diabetic subjects (2,3). Two prospective epidemiological studies, the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications (EDC) and Eurodiab confirmed this higher rate of total coronary events and a higher mortality in T1D patients (4,5). The reasons for this increased risk have not been fully elucidated and can only be partly explained by standard cardiovascular risk factors. The role of glycemic control is controversial and in some studies has not consistently been demonstrated as a risk factor for cardiovascular events in T1D (5,6). Nevertheless, data from the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) and the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study (EDIC) confirmed that intensive therapy significantly reduced the long-term risk of clinical cardiovascular disease (7).

Different studies have shown that changes in vascular structure and function occur early in the course of T1D, supporting the theory of accelerated atherosclerosis in these patients. Coronary intimal thickening, changes in arterial compliance and stiffness, and endothelial dysfunction have been observed in these patients (8,9).

Current guidelines consider T2D as a CHD equivalent, whereas type T1D is considered a high-risk state only when microalbuminuria is present (10). Different studies in T1D have evaluated the microvascular complications and risk factors associated (11) but prevalence of CHD and its related factors have been studied less extensively. Most of the clinical trials regarding prevention of CHD in diabetic persons include exclusively patients with T2D and clinical outcomes obtained in these patients use to be extrapolated to patients with T1D. However, it is unclear whether asymptomatic T1D patients benefit from the current preventive treatment strategies and if active screening is justified. To optimize these preventive strategies, more detailed understanding of early coronary atherosclerosis development in T1D is required.

Coronary artery calcium score (CACs) is a well-established index of atherosclerosis and is feasible to be performed in the clinical practice by using a multi-detector computerized tomography (MDCT) (12). Coronary calcium is expressed with a standardized scoring system devised by Agatston (13). This scoring system has been validated in histological specimens of coronary arteries from a large number of men and women and in all age groups showing a high degree of correlation with the degree of atherosclerosis found on histological examination (14). CACS has been shown to predict both incident CHD and all cause mortality in non-diabetic subjects (15, 16). T2D is associated with higher CACS than general population, independently of other cardiovascular risk factors (17).

There is relatively scarce information of CACS in T1D patients. A positive relationship between glycemic control and CACS has been described in T1D patients of the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study (EDIC) and the intensively treated group displayed lower CACS (18). Another study has also reported increased coronary calcification in women with T1D compared to controls (19). In the EDC cohort CACS was strongly correlated with CHD, particularly in men (20).

Common carotid artery (CCA) intima-media thickness (c-IMT) as measured by high resolution B-mode ultrasonography is a non-invasive marker of subclinical atherosclerosis (21). An increased c-IMT has also been correlated with an increased relative risk for stroke and coronary arterial disease in non-diabetic adults (22). In children, a significant thickening of the endothelial wall has been found in several chronic diseases including diabetes mellitus (23).

Prediction and early diagnosis of CHD allows an appropriate intervention in the initial stages of the disease. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the presence of early atherosclerosis in asymptomatic T1D patients with long disease evolution (more than 10 years) leaving in a Mediterranean country, with no previous history of ischemic heart disease.

Subjects and Methods

A group of 150 asymptomatic T1D patients followed at our outpatient clinic were consecutively recruited between 2010-2012. Inclusion criteria were an age between 20 and 50 years and an evolution disease of more than 10 years. The exclusion criteria were a previous history of clinical macrovascular or CHD. Current smoking and previously smoking condition for less than 5 years were included in the same category. A group of non-diabetic subjects matched for age, sex and smoking condition recruited from the relatives and staff of our hospital was also included as control group. All patients were under intensive insulin treatment and 15% of them using pump devices.

The study was approved by the local ethics committee, in accordance with the Declaration of Helsinki; all participants gave their written informed consent prior to inclusion.

Demographic and clinical data, including age, sex, history of clinical macrovascular disease and microvascular diabetic complications, family history of early CHD in first degree relatives (defined as CHD occurring before age 55 years in men and before age 65 years in women) and medical treatment (antihypertensive agents, statins and acetylsalicylic acid-ASA-) were recorded for all subjects. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height per square meter.

Diabetic nephropathy was evaluated according to urinary albumin excretion. Thus, normal urinary albumin excretion was considered below 30 mg/24 h, microalbuminuria from 30 to 300 mg/24 h and proteinuria above 300 mg/dl. These results were confirmed on at least two out of three consecutive determinations. Diabetic retinopathy was defined by fundus oculi performed by a specialized ophthalmologist.

Biochemical measurements

Blood samples were drawn by venipuncture at between 8.00 and 08.30 h. after an overnight fast. Plasma glucose, total cholesterol, high density (HDL) and low density (LDL) lipoprotein cholesterol and triglycerides were measured by routine clinical chemistry immediately after extraction. HbA_{1c} was measured in blood samples with EDTA by HPLC using a fully-automated Adams Menarini HI-AUTO A1c 8160 analyzer manufactured by Arkray (Kyoto, Japan) with an inter-assay coefficient of variation (CV) of 1.8 and 1.5% at HbA_{1c} levels of 4.8 and 9.0% respectively (reference range: 4–5.8%). Mean HbA_{1c} was calculated as an average of three determinations in the previous year before the inclusion in the study.

Cardiac computed tomography protocol

Multidetector cardiac CT (MSCT) was performed using a 16-slice high resolution CT ECG-gated, with retrospective reconstruction and with special attention to the coronary arteries (SOMATOM Sensation 16 and Syngo Calcium Scoring software for analysis and calcium calcification). CACS was identified as a dense area in the coronary artery exceeding the threshold of 130 Hounsfield units. A total Agatston score was determined for each patient. The results were expressed according to the classification previously described by Shaw et al (24). Scans were read by a single radiologist.

Carotid ultrasonography

Ultrasonographic images were acquired using high resolution B-mode ultrasound (Siemens Acuson Sequoia 512) with an electric linear array 13-5 MHz transducer. Acquisition, processing and storage of B-mode images were computer-assisted with the version of the software provided by the manufacturer. All measurements were performed by the same trained radiologist. The CCA segment was defined as the distal 1 cm of the CCA, immediately proximal to the onset of increased spatial separation of the walls of the CCA. Both near and far walls of these arterial segments were scanned longitudinally and transversely to assess the presence of plaques. The protocol involved scanning of the CCA, carotid bifurcations and origins (first 2 cm.) of internal carotid arteries. The presence of carotid plaques was defined as focal echo structures encroaching into the arterial lumen of at least 0.5 mm or 50% of the surrounding c-IMT value, or when c-IMT was >1.5 mm as measured from the media–adventitia interface to the intima–lumen interface. Quantification of

plaque thickness was made at the site of the maximal encroachment perpendicularly to the vessel wall by measuring the distance between the media–adventitia interface and the lesion surface facing the lumen. CCA–IMT was measured in a longitudinal view at a site free of plaques along a 10 mm-long segment on the far wall of the CCA in agreement with the carotid IMT consensus (2004–2006) (24). Composite right and left c–IMT were calculated as the average of the four readings in each artery segment, and the mean of the left and right c–IMT measurements was used in the analysis.

Statistical methods

Continuous variables were expressed as mean SD or median (interquartile range) and categorical variables as frequency and/or percentage. Differences between groups were tested by the Student's t-test or the non-parametric Mann–Whitney U test, as appropriated. A p value less than 0.05 was considered statistically significant. Categorical variables were compared with a χ^2 test. Separate multivariate regression analyses with backward elimination were performed, correcting for all baseline clinical characteristics including as confounders age, male sex, BMI, smoking, positive family history of CHD, dyslipidemia, hypertension, mean HbA_{1c} to identify independent predictors of each coronary atherosclerosis variable on MSCT. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Science (SPSS, Chicago, IL, USA) for personal computers, version 12.0 (SPSS).

Results

The clinical characteristics of the 150 patients and the 50 controls are shown in Table 1.

Table 1. Basal characteristics of T1D patients and control group

	<u>T1D</u>	<u>Controls</u>
n	150	50
Age (yr)	38.6± 8.1	38.1± 7.2
Sex (M/F)	58/42	56/44
Evolution T1D (yr)	20.4±8.1	---
Family history CHD (%)	20	22
BMI (kg/m²)	25.1±3.6	25.3±4.3
Retinopathy (%)	26	---
Nephropathy (%)	9	---
HbA_{1c} (%)	8.1±2.3	---
Total cholesterol (mg/dl)	182.7±25.1	191.1± 34.1
HDL (mg/dl)	60.3±15.1	61.8±16.6
LDL (mg/dl)	105.3 ±21.9	111.3 ±33.5
Smoke (% yes/no)	48/52	42/58
Statins (%)	21%	---
Antihypertensive (%)	15%	---
ASA (%)	16%	---

CACS

CACS results are shown in Table 2. A high proportion of subjects in both controls and patients displayed a CACS of 0 (92% vs 82%), and the differences between groups were not statistically significant. For all patients, mean and median CACS were 19.5 ± 102 and <1 respectively. When a CACS of moderate severity of >100 was considered, it was found only in a low proportion of T1D (6/150, 4%). When patients were categorized using a lower CACS of ≥ 1 , those showing values higher of this cut-off had significantly higher age ($p<0.001$) and a longer duration of the disease ($p<0.006$) compared with patients with a CACS of 0 (Figure 1A). There were more men than women with $CACS \geq 1$ ($p<0.02$). In relation to metabolic control patients with $CACS \geq 1$ also showed significantly higher HbA1c ($p<0.002$; Figure 1B).

Table 2. CACS results

	<u>T1D</u>	<u>Controls</u>
Score 0: No plaques (very low risk)	123 (82%)	46 (92%) ns
Score 1-10: Minimal plaques (low risk)	12 (8%)	1 (2%)
Score 11-100: Mild calcification (moderate risk)	9 (6%)	2 (4%)
Score 101- 400: Moderate calcification (high risk)	4 (2.6%)	1 (2%)
Score >400: Significant calcification (very high risk)	2 (1.3%)	0

Thirteen out of the 150 patients (9%) patients presented nephropathy and 10 of them also retinopathy. Eight of the 13 patients with nephropathy had a CACS of 0 and 5 of them >50 (with values of 58, 99, 227, 523, 1062). All these 5 patients also presented proliferative retinopathy.

Carotid ultrasonography

T1D patients showed a significantly higher c-IMT compared to control group (0.55 ± 0.14 vs. 0.48 ± 0.14 mm., $p<0.01$). A low proportion of subjects in both groups presented atheroma plaques (16 patients and 4 control subjects, 11 vs. 8%), in all cases conditioning stenosis of less than 50%.

Patients with nephropathy showed a higher c-IMT compared to patients without nephropathy (0.59 ± 0.14 vs. 0.54 ± 0.14 mm., $p<0.08$). There were no differences regarding to c-IMT in relation to retinopathy.

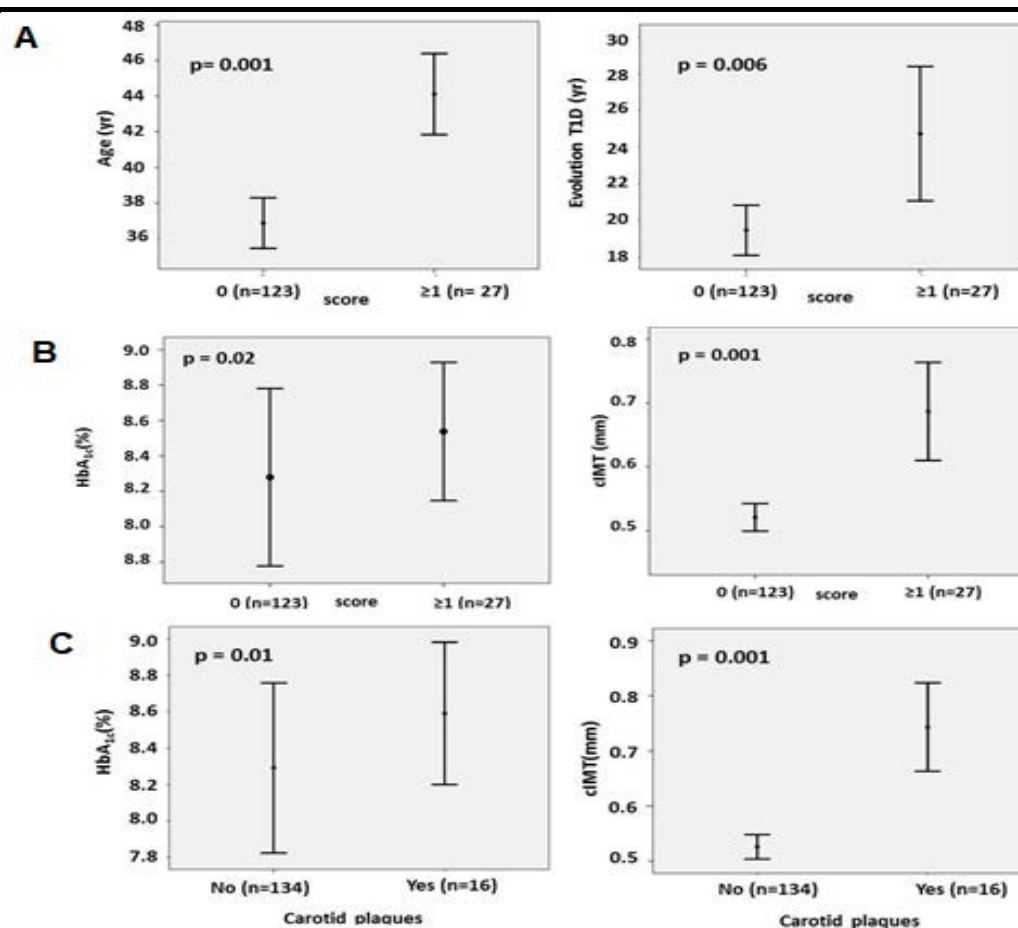
T1D patients with plaques had a significantly higher HbA_{1c} and c-IMT (Figure 1C) compared to those patients without plaques. Four out the sixteen patients with plaques (25%) presented retinopathy and only one patient had both proliferative retinopathy and nephropathy.

Figure 1.

A. Association of CACS with age and diabetes evolution

B. Association of CACS with metabolic control and carotid ecography

C. Association of carotid plaques with metabolic control and c-IMT



Associations between study variables

When univariate correlation analyses were performed in diabetic subjects, we found that previous and active smoking habit ($p < 0.02$), nephropathy ($p < 0.05$), retinopathy ($p < 0.05$) and male gender ($p < 0.03$) were significantly and positively associated to CACS ≥ 1 ($p < 0.01$ and $p < 0.004$). No relationships were found regarding family history of CHD. The presence of carotid plaques was only associated to smoking condition ($p < 0.02$) but not with the rest of study variables. Those T1D patients with a CACS ≥ 1 showed a significantly higher c-IMT compared with patients with a CACS of 0 (Figure 1B). A positive correlation was found between values of CACS and c-IMT (r_s 0.36 $p < 0.001$).

A multivariate logistic regression analysis was performed in T1D group in order to identify those factors influencing independently CACS, including all variables that showed a statistically significant association in the univariate analysis. The step forward methodology was applied including the following variables: age, gender, duration of disease, smoking status, HbA_{1c}, retinopathy, nephropathy, treatment for hypertension, statin use, CHD family history and aspirin treatment. After elimination of confounders, the final model included the following covariates: duration of diabetes, statins treatment and c-IMT ($R^2 = 0.44$). In all the models generated, we found that c-IMT was related to the CACS (beta=6.87, $p < 0.001$), duration of diabetes (beta=0.09, $p < 0.008$) and statin treatment (beta=1.43 $p < 0.02$).

Discussion

It has been long debated whether subclinical atherosclerotic disease should or should not be actively screened in T1D. There is currently no agreement and in fact, most if not all, clinical guidelines do not recommend active screening, or at least a universal active screening in apparently healthy T1D patients (25,26,27). On the other hand, this issue has also been developed in a scenario in which the background of CHD risk is not the same depending of the specific population studied. In this regard, in some countries, such as Spain, the average risk of CHD is significantly lower than in other parts of the world (28-30), and as a consequence active screening of CHD would be recommended or not according to this background.

In our study, in which a sample of T1D patients currently visited in a referral center was evaluated, we found that a small percentage of individuals presented data suggestive of subclinical atherosclerosis. Our cohort, was characterized by a mean duration of disease of 20 years, a relatively low prevalence of microangiopathy, and only about 20% of our patients were under treatment for classic cardiovascular risk factors. Despite a quite long duration of disease, the prevalence of subclinical vascular disease was low. Most of our patients displayed a CACS of 0, slightly higher than in the control group but without significant statistical and clinical relevance. Only 4% of the patients showed a CACS over 100, suggesting moderate or significant calcification and most of them presented also microvascular complications. In addition, high CACS was associated with smoking, male gender and family history of early CHD in first-degree relatives. The presence of plaques was associated to smoking, and c-IMT was related to CACS.

Although there are other studies reporting CACS measurement in asymptomatic T1D population (18,19, 31-34), data concerning a Mediterranean population is very scarce, only one study evaluated young Egyptians (32). Our results clearly differ from this latter published by Salem et al. (32) in this Egyptian population and the one by Djaberi et al performed in the Netherlands (33); both showed higher CACS in their T1D patients than ours. In a much younger population (mean age 16 years) than the one we studied but with a higher A_{1c} of about 9.6%, Salem found a mean

CACS of 44, compared to 19 in our series, and Djaberi found a mean CACS of 217 in a population having a mean age of 46 years and 23 years of T1D duration (33). This latter study does not differ very much from the present study in patient disposition, age and metabolic control but the prevalence of hypertension and dyslipidemia was higher, which may be related to a potential non-Mediterranean diet. Studies performed in the US showed a loss of protective effect assigned to women (18,19) and, very important, that intensive glucose treatment was associated to a better CACS in the EDIC cohort (17). These results are in agreement with those of our patients because the mean CACS in men was similar to that from women (19.7 vs. 19.3). Those studies performed in US population by Colhoun (18) and Dabelea (31) displayed higher mean CACS than our study despite that mean age and duration of T1D were similar (38/37 years and duration of 24/23 years respectively). Concerning to the data from the DCCT/EDIC study (17) the mean CACS was lower in the intensive group in relation to the conventional treatment group (78 vs. 65) and the CACS values were higher than in our group but these patients were older (mean age 43 years). Nevertheless, the mean diabetes duration was similar (21 years). In the Danish study by Mogensen et al. (34) patients were stratified according to the presence of autonomic cardiovascular neuropathy (CAN). Those with CAN+ displayed higher CACS compared to those without CAN (197 vs. 5). None of our patients presented clinical signs of CAN, although no specific procedures were performed to rule out CAN.

In the present study, T1D patients showed a higher c-IMT when compared to control population but there were no differences in the presence of plaques and its benign characteristics. These data are concordant with those described by others in Spanish control populations (36,36). In a small but special group of Spanish T1D patients showing metabolic instability and frequent and severe hypoglycemic episodes, Giménez et al (37) found a higher c-IMT compared to our cohort; few of our patients presented severe episodes of hypoglycemia, however, the number of cases was too low for allowing comparisons. This fact may be interpreted, as the authors suggested, as a deleterious effect of repeated hypoglycemia upon arterial wall; as our patients were not particularly hypoglycemic prone, this may corroborate such hypothesis.

The fact that our cohort is living in a geographical area with a low prevalence of CHD (28,29) may explain our findings concordant with the background general population. Also, it has to be taken into account that our T1D patients have being treated all of them in the era of universal intensive glycemetic treatment -15% were under pump treatment-, as well as the use of cardiovascular protective drugs, immediately when indicated following international guidelines. Only few patients with a very long duration of the disease (>30 years) and onset at very young ages did not receive such an intensive treatment modality at the beginning of the disease. In this regard, our data on CACS are very close to those found in the intensive arm of the EDIC cohort (17). This intensive glycemetic treatment may thus have a positive impact in the prevention of cardiovascular disease.

The low prevalence of subclinical cardiovascular disease in our T1D patients may be also influenced by other factors, namely the genetic background, as there was a low CHD family history in our cohort. Finally, dietary factors such as a Mediterranean diet style, may have also be of importance, mostly when compared with Northern European countries diet (27).

Therefore and in terms of cost-effectiveness, our data suggest that universal screening in our population is not justified, specially with expensive techniques as CACS. However, in other populations with higher prevalence of cardiovascular disease, or in patients with long or very long disease duration and antecedents of poor metabolic control and family history of CHD, it is probably justified to investigate CHD before the appearance of symptoms. In this regard, our data support that alternative techniques less expensive than CACS and widely and readily available in the clinical practice as carotid ultrasonography, may be useful in the screening of such T1D patients. The positive correlation between CACS and c-IMT of the present study support this recommendation.

In summary, our data indicate that a small percentage of T1D patients living in Catalonia with 20 years of mean disease duration showed data suggestive of subclinical atherosclerosis. For that reason, universal screening of coronary disease in this Mediterranean T1D population is not justified. We suggest that carotid ultrasonography maybe useful for CHD screening in the subset of T1D patients with associated classic cardiovascular risk factors as in non diabetic population, and when microvascular complications and long disease duration is present. In this regard, in this subset of subjects, as CHD mortality is higher than expected, the same attention for early detection of microvascular disease should also be deserved for macrovascular disease, provided that the screening procedure would efficient enough.

Acknowledgments: This study has been supported by a grant “Ajut en la Recerca en Diabetis Gonçal Lloveras” from the Catalan Association of Diabetes. We thank the nursing staff of the Endocrinology Unit of Hospital Germans Trias i Pujol in Badalona (Maribel Cuadrado, Isabel Ordoñez and Carme Perez) for their technical assistance.

E.A. researched data, contributed to discussion, wrote the manuscript, and reviewed/edited the manuscript. E.S., M.L.G., N.A., S.P., E.P., J.R. I.S. and B.S. researched data and reviewed the manuscript. D.M. and M.P. contributed to discussion and reviewed/edited the manuscript.

References

1. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 2001;44 Suppl:S14–S21
2. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GVH, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with Type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2003;348:383-393
3. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23, 000 patients with insulin treated diabetes. *Diabetologia* 2003;46:760–765.
4. Dorman JS, Laporte RE, Kuller LH, et al. The Pittsburgh insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study: mortality results. *Diabetes* 1984;33:271.
5. Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Toeller M, Ferriss B, Reboldi P, Michel G, Manes C, Fuller JH, the EURODIAB Prospective Complications Study Group: Risk factors for coronary heart disease in type 1 diabetic patients in Europe: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care* 2004; 27:530–537
6. Orchard TJ, Olson JC, Erbey JR, Williams K, Forrest KY, Smithline Kinder L, Ellis D, Becker DJ: Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26:1374–1379
7. Nathan DM, Cleary PA, Bachklund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group: Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Eng J Med* 2005; 2643-2653
8. Jarvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, Putto-Laurila A, Rontu R, Laine S, Lehtimäki T, Ronnemaa T, Viikari J, Raitakari OT: Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation* 2004;109:1750–1755
9. Singh TP, Groehn H, Kazmers A: Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:661– 665
10. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Manger Cats V, Orth-Gome´r K, Perk J, Pyorala K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, Wood D. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J* 2003;24:1601–1610
11. Libby P, Nathan DM, Abraham K, Brunzell JD, Fradkin JE, Haffner SM, Hsueh W, Rewers M, Roberts BT, Savage PJ, Skarlatos S, Wassef M, Rabadan-Diehl C. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on Cardiovascular Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation* 2005;111:3489–3493
12. Elkeless RS. Coronary artery calcium and cardiovascular risk in diabetes. *Atherosclerosis* 2010;210:331-36
13. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;30:57–64

14. Janowitz WR, Agatston AS, Kaplan G, Viamonte M. Differences in prevalence and extent of coronary artery calcium detected by ultrafast computed tomography in asymptomatic men and women. *Am J Cardiol* 1993;72:247–54
15. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, et al. Coronary artery calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med* 2008;358:1336–45
16. Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, et al. Long term prognosis associated with coronary calcification observations from a registry of 25253 patients. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1860–70
17. Wolfe ML, Iqbal N, Geftter W, Mohler ER, Rader DJ, Reilly MP. Coronary artery calcification at electron beam tomography is increased in asymptomatic type 2 diabetics independent of traditional risk factors. *J Cardiovasc Risk* 2002;9:369–376
18. Cleary PA, Orchard TJ, Genuth S, Wong ND, Detrano R, Backlund JC, Zinman B, Jacobson A, Sun W, Lachin JM, Nathan DM. The effect of intensive glycaemic treatment on coronary artery calcification in Type 1 diabetic participants of the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study. *Diabetes* 2006; 55: 3556–3565
19. Colhoun HM, Rubens MB, Underwood Sr, Fuller JH. The effect of type 1 diabetes mellitus on the gender difference in coronary artery calcification. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2160–2167
20. Olson JC, Edmundowicz D, Becker DJ, Kuller LH, Orchard TJ. Coronary Calcium in adults with type 1 diabetes. A stronger correlate of clinical coronary artery disease in men than in women. *Diabetes* 2000; 49: 1571-1578
21. Cobble M, Bale B. Carotid intima-media thickness: knowledge and application to everyday practice. *Postgrad Med.* 2010;122:10–18
22. Margeirsdottir HD, Stensaeth KH, Larsen JR, Brunborg C, Dahl-Jorgensen K. Early Signs of Atherosclerosis in Diabetic Children on Intensive Insulin Treatment: A Population-Based Study. *Diabetes Care* 2010; 33: 2043-2048
23. Shaw Lj, Raggi P, Schisterman E, Berman DS, Callister TC. Prognostic value of cardiac risk factors and coronary artery calcium screening for all cause mortality. *Radiology* 2003;228: 826-33
24. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Fatar M, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaut E, Woo KS, Zannad F & Zureik M. 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. *Cerebrovascular Diseases* 2004; 23 75–80.
25. Bax JJ, Young LH, Frye RL, Bonow RO, Steinberg HO, Barrett EJ. Screening for coronary artery disease in patients with diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 2729-2736
26. American Diabetes Association. Standards of medical care in Diabetes 2013. *Diabetes Care* 2013; S34
27. Orchard TJ, Costacou T, Kretowski A, Nesto RW. Type 1 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care* 2006;29: 2528–2538

28. Sans S, Kesteloot H, Kromhout D on behalf of the Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. *Eur Heart J* 1997;18:1231–1248
29. Comín E, Solanas P, Cabezas C, Subirana I, Ramos R, Gené-Badia J, Cordón F, Grau M, Cabré-Vila JJ, Marrugat J. Estimating Cardiovascular Risk in Spain Using Different Algorithms. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60: 693-702
30. Cano JF, Baena-Diez JM, Franch J, Vila J, Tello S, Sala S, Elosua R, Marrugat J. Long-Term Cardiovascular Risk in Type 2 Diabetic Compared With Nondiabetic First Acute Myocardial Infarction Patients. A population-based cohort study in Southern Europe. *Diabetes Care* 2010; 33: 2004-2010
31. Dabelea D, Kinney G, Snell-Bergeon JK, Hokanson JE, Eckel RH, Ehrlich J, Garg S, Hamman RF, Rewers M. Effect of Type 1 Diabetes on the gender difference in coronary artery calcification: a roles for insulin resistance? The Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) Study. *Diabetes* 2003; 52: 2833-2839
32. Salem M, Moneir I, Adly AM, Esmat K. Study of coronary artery calcification risk in Egyptian adolescents with type 1 diabetes. *Acta Diabetol* 2011;48:41-53
33. Djaberi R, Schuijf JD, Boersma E, Kroft L, Pereira AM, Romijn JA, Scholte AJ, Wouter Jukema J, Bax JJ. Differences in Atherosclerotic Plaque Burden and Morphology Between Type 1 and 2 Diabetes as Assessed by Multislice Computed Tomography. *Diabetes Care* 2009; 32: 1507-1512
34. Mogensen UM, Jensen T, Kober L, Kelbek H, Mathiesen AS, Dixen U, Rossing P, Hilsted J, Kofoed KF. Cardiovascular Autonomic Neuropathy and Subclinical Cardiovascular Disease in Normoalbuminuric Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes* 2012; 61: 1822-1830
35. Junyent M, Gilabert R, Núñez I, Corbella E, Vela M, Zambón D, Ros E. Carotid ultrasound in the assessment of preclinical atherosclerosis. Distribution of intima-media thickness values and plaque frequency in 0.a Spanish community cohort. *Med Clin (Barc)* 2005;125:770-774
36. Martínez-Hervás S, Bauer-Izquierdo SI, Priego A, Real JT, Carmena R, Ascaso JF. Carotid intima-media thickness and distribution and frequency of carotid plaques in a Spanish population without cardiovascular risk factors. *Clin Invest Arterioscl.* 2012; 24:181-187
37. Gimenez 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; 34:198-203

5.2 SEGON ESTUDI

Títol:

High prevalence of vitamin D deficiency and lack of association with subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with Type 1 Diabetes Mellitus from a Mediterranean area.

Elevada prevalença de deficiència de vitamina D i manca d'associació amb l'arterioesclerosi subclínica en pacients asimptomàtics amb Diabetis Mellitus tipus 1 procedents d'una àrea Mediterrània.

Autors:

Serra-Planas E, Aguilera E, Granada ML, Soldevila B, Salinas I, Reverter JL, Pizarro E, Pellitero S, Alonso N, Mauricio D, Puig-Domingo M

Revista:

*Acta Diabetol. 2015 Aug;52(4):773-9*¹⁷⁹

Factor d'impacte 2015:

3.04 (Quartil 2)

VERSIÓ POST-PRINT

**HIGH PREVALENCE OF VITAMIN D DEFICIENCY AND LACK OF ASSOCIATION
WITH SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS IN ASYMPTOMATIC PATIENTS WITH
TYPE 1 DIABETES MELLITUS FROM A MEDITERRANEAN AREA**

Serra-Planas E^a, Aguilera E^a, Granada ML^b, Soldevila B^a, Salinas I^a, Reverter JL^a, Pizarro E^c,
Pellitero S^a, Alonso N^a, Mauricio D^a, Puig-Domingo M^a

- a. Service of Endocrinology and Nutrition, Department of Medicine, Institute of Research and Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.
- b. Service of Biochemistry, Institute of Research and Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.
- c. Service of Endocrinology, Hospital de Mataró, Mataró, Spain

Corresponding author: Eva Aguilera

>>Telephone number: +34934978860 / + 34934978457

>>E-mail: e.serraplanas@gmail.com

>>Postal address: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet s/n. 08916
Badalona, Servei d'Endocrinologia i Nutrició

Keywords: Type 1 Diabetes, Vitamin D deficiency, cardiovascular disease, subclinical atherosclerosis, coronary artery calcification, carotid intima-media thickness

Acronyms used: CAD, coronary artery disease; T1D, Type 1 Diabetes; hs CRP, high-sensitive C-reactive protein, BMI, body mass index; 25OHD, 25-hydroxyvitamin D; CT, computed tomography; CU, carotid ultrasound; CIMT, carotid intima-media thickness; CVD, Cardiovascular disease; CACS, coronary artery calcification score; CHD, cardiac heart disease; HDL, high density lipoprotein cholesterol; LDL, low density lipoprotein cholesterol; Ca, calcium; Ph, Phosphate; PTH, Parathormone; CV, coefficient of variation; AU, Agatston Units; SD, standard deviation; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HPLC, high-performance liquid chromatographic

Abstract

Background and Aims: Several studies linked vitamin D deficiency with coronary artery disease (CAD). The aim of this study was to evaluate the relationship between the concentrations of 25-hydroxyvitamin D (25OHD) and the presence of early atherosclerosis in asymptomatic Type 1 Diabetes (T1D) patients with no previous history of ischemic heart disease.

Methods and Results: One hundred and forty-five patients with T1D (age 37.8 ± 8 years, 57% male, all Caucasian, disease duration 20.6 ± 8.3 years, HbA1c 7.6 ± 1.4 % (60.2 ± 11.1 mmol/mol), body mass index (BMI) 25.2 ± 3.5 kg/m², 52.4% smokers, 23% retinopathy, 10% nephropathy) and 48 controls matched for age, sex, BMI and smoking habit were studied. 25OHD deficiency was defined for values ≤ 20 ng/mL. A sun exposure questionnaire, carotid ultrasonography to determine carotid intima-media thickness (CIMT) and the presence of atheroma plaques and cardiac computed tomography (CT) for evaluation of calcium artery calcification (CACS) were performed.

T1D subjects showed a high proportion of 25OHD deficiency (43.2% vs. 21.7%, $p = 0.032$). 82% of T1D patients and 92% of controls had a calcium score of 0. CIMT was greater in patients with T1D (0.55 ± 0.14 mm vs 0.48 ± 0.15 , $p = 0.01$) compared to controls. T1D subjects showed no differences in the results of CACS or CIMT according to the vitamin D concentrations.

Conclusion: T1D patients have lower concentrations and twice more prevalence of 25OHD deficiency than controls. There was no association between 25OHD concentrations and subclinical CAD.

Introduction

A billion people worldwide have vitamin D deficiency or insufficiency [1]. In the last decade a series of studies have revealed the non-calcitropic actions of vitamin D [2-4]. A controversial issue is the possible link between cardiovascular disease (CVD) and vitamin D deficiency. Vitamin D deficiency may promote calcification, inflammation and endothelial dysfunction [5]. Different factors such as secondary hyperparathyroidism, chronic inflammatory state and oxidative stress could contribute to vascular damage in 25-hydroxyvitamin D (25OHD) deficient patients [6]. Recently, some reports have shown lower vitamin D concentrations in T1D and T2D subjects compared to control population [7-11]. These vascular physiopathologic implications of 25OHD in diabetic population may act synergistically with classical cardiovascular risk factors as hypertension, dyslipidemia, smoking habit, and poor glycemic control, leading to a higher degree of vascular damage.

Although a remarkable number of studies in general population, with and without diabetes, have demonstrated a relationship between 25OHD and a higher prevalence of cardiovascular risk [11, 12], not all the reports have confirmed this association [13, 14]. 25OHD deficiency has been linked to a greater prevalence of CVD [4, 15, 16], coronary artery calcification (CACs) [17, 18] and mortality [19, 20], thus postulating a cardioprotective effect of the reposition of this steroid.

There is scarce information concerning the possible relationship between 25OHD deficiency and subclinical coronary artery disease (CAD) in T1D patients. Two recent studies have been conducted in American T1D patients and have shown discordant results. Sachs et al. did not find an association between 25OHD deficiency and subclinical atherosclerosis measured by CACS and carotid intima-media thickness (CIMT) [13]. Nevertheless, Young et al [18] have found a significant association between 25OHD deficiency and an accelerated progression of vascular disease.

The aim of this cross-sectional study was to evaluate the possible relationship between the concentrations of vitamin D and the presence of early atherosclerosis assessed by CACS and CIMT in asymptomatic T1D patients with long disease evolution living in a Mediterranean country.

Methods

Patients and controls

An initial cohort of 150 asymptomatic T1D regularly followed at our outpatient clinic and a control group of 50 subjects matched by age, sex and smoke condition were consecutively recruited between 2010-2012 in Badalona (Barcelona, Spain; latitude 41° 25'). In this cohort the presence of subclinical atherosclerosis was evaluated and previously reported elsewhere [21]. Inclusion criteria were being diagnosed of T1D (clinical and immunologic diagnosis), an age between 20 and 50 years and a disease evolution of more than 10 years. The exclusion criteria were a previous history of clinical macrovascular or cardiac heart disease (CHD), Type IV, V or VI skin phototype, or having T1D < 10 years of evolution, and current treatment with vitamin D or calcium. Five patients and two controls from the initial cohort were excluded because they were under vitamin D treatment for different reasons. The final sample studied included 145 T1D patients and 48 controls (all Caucasian).

Current smoking and previously smoking condition for less than 5 years were included in the same category. The control group of non-diabetic subjects was matched for age, sex, body mass index (BMI) and smoking condition and recruited from the staff of our hospital and their relatives. All patients were under intensive insulin treatment and 15% of them were using pump devices.

The study was approved by the local ethics committee, in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants gave their written informed consent prior to inclusion.

Demographic and clinical data including age, sex, history of clinical macrovascular disease and microvascular diabetic complications, family history of early CHD in first degree relatives (defined as CHD occurring before age 55 years in men and before age 65 years in women) and medical

treatment (antihypertensive agents, statins and acetylsalicylic acid) were recorded for all patients. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height per square meter.

Diabetic nephropathy was evaluated according to urinary albumin excretion. Thus, normal urinary albumin excretion was considered below 30 mg/24h, microalbuminuria from 30 to 300 mg/24h and proteinuria above 300 mg/24h. These results were confirmed on at least two out of three consecutive determinations. Diabetic retinopathy was defined by fundus oculi performed by a specialized ophthalmologist.

Trained personnel collected clinical parameters (age, sex, height, weight, BMI, blood pressure and smoking habit and family history of early CHD).

A sun exposure questionnaire was administered to all study participants in which the season of blood sample extraction whether obtained in winter (October-March) or summer (April-September) was considered for adjustment. This questionnaire has formerly validated in a Mediterranean Caucasian Italian population, in which a correlation between the sun exposure score and the concentrations of 25OHD was found [22]. Parameters as minutes spent outdoor ($\leq 5'$, 5-30' or $\geq 30'$) and skin exposed zones (face and hands; face, hands and arms; face, hands, arms and legs or "bathing suit") were categorized and registered in order to obtain an exposition score. The mean weekly exposition score was calculated (minimum = 0 and maximum = 56) for each participant.

Biochemical measurements

Blood samples were drawn by venipuncture at between 8.00 and 08.30 h. after an overnight fast. Plasma glucose, Total cholesterol, High density (HDL) and Low density (LDL) lipoprotein cholesterol, Triglycerides, Calcium (Ca) and Phosphate (Ph) were measured by routine clinical chemistry immediately after extraction. HbA1c was measured in blood samples with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) by high-performance liquid chromatographic (HPLC) using a fully-automated Adams Menarini HI-AUTO A1c 8160 analyzer manufactured by Arkay (Kyoto, Japan) with an inter-assay coefficient of variation of 1.8 and 1.5% at HbA1c levels of 4.8 and 9.0% respectively (reference range: 4-5.8%). This method is a cation exchange HPLC method

certified by the NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) of traceability to the Diabetes Control and Complications Trial Reference (DCCT) Method. Mean HbA1c was calculated as an average of three determinations in the previous year before the inclusion in the study.

Plasma 25OHD concentration was measured by the Liaison 25-OH-Vitamin D total assay (Diasorin Inc, Stillwater, MN, USA), a competitive chemiluminescent immunoassay, with the Liaison Diasorin automated analyzer. Intra-assay and Inter-assay coefficient variation were < 6.3% and 9.1%, respectively assay and sensitivity was 4 ng/mL.

Vitamin D status was considered as a categorical variable, with deficiency cut-off defined as a concentration of 25OHD \leq 20 ng/mL, insufficiency as concentrations between 21 and 29 ng/mL and sufficiency \geq 30 ng/mL [23]. These cutoffs were established in accordance with previous studies which assessed the elevation of parathormone (PTH) concentrations below the threshold of 20 ng/mL and decreased intestinal absorption of Ca with values of 25OHD less than 32 ng/mL [24]. As 25OHD concentrations are influenced by different factors such as the zenith angle, the hour of day, season and latitude, blood samples were classified in two groups depending on the season in which the sample was obtained: winter (October-March) and summer (April-September). In those collected during winter, 25OHD values were increased 20% by convention and according with other authors [25], in order to correct the decreased cutaneous synthesis during this period of the year of decreased sunlight exposure.

Serum CRP concentrations were measured using an ultrasensitive CRP test (N High Sensitivity CRP) on a BN-ProSpec nephelometer (Dade Behring, GMBH, Marburg, Germany) with an inter-assay variation coefficient of 3.7% and 3.5% for CRP concentrations of 2.38 mg/L and 52.2 mg/L, respectively.

Evaluation of subclinical atherosclerosis

A computed tomography (CT) to quantify CACS was performed using a 16-slice high resolution CT ECG-gated, with retrospective reconstruction and with special attention to the coronary arteries

(SOMATOM Sensation 16 and Syngo Calcium Scoring software for analysis and calcium calcification). CACS was identified as a dense area in the coronary artery exceeding the threshold of 130 Hounsfield units. A total Agatston score was determined for each patient. The results were expressed according to the classification previously described by Shaw et al. [26] and results were transformed as a categorical variable considering positive those greater than zero and negative those with negative results equal to zero.

A carotid ultrasound (CU) to measure the CIMT was performed in all participants. Ultrasonography images were acquired using high resolution B-mode ultrasound (Siemens Acuson Sequoia 512) with an electric linear array 13-5 MHz transducer. The CIMT was the result of the median of the tunica intima and tunica media thickness in per protocol defined carotid areas (left internal carotid, right internal carotid, common carotid and bifurcation). Plaque number and characteristics were recorded.

A single trained radiologist performed evaluation and acquisition of CT images and CU.

Statistical methods

Continuous variables were expressed as mean and standard deviations (SD) or median (interquartile range), and categorical variables as frequency and/or percentage. Differences between groups were tested by the Student's t-test or the non-parametric Mann–Whitney U test, as appropriated. A p value less than 0.05 was considered as statistically significant. Categorical variables were compared with a X^2 test. Correlation analyses between continuous variables were performed by using Spearman correlation. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Science (SPSS, Chicago, IL, USA) for personal computers, version 12.0 (SPSS).

Results

The clinical and biochemical characteristics of the whole sample are shown in Table 1.

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of the cohort

	T1D	CONTROLS	p value
n (n/%)	145 (75%)	48 (25%)	--
Age (years)	37.8 ± 8.0	38.5 ± 7.1	NS
Sex (M/W)	83/62 (57/43%)	28/20 (58/42%)	NS
BMI (kg/m²)	25.2 ± 3.5	25.4 ± 4.4	NS
Systolic tension (mmHg)	117.4 ± 13.5	--	--
Diastolic tension (mmHg)	71.0 ± 7.7	--	--
HbA1c (%) / (mmol/mol)	7.6 ± 1.4 / 60.2 ± 11.1	--	--
Diabetes duration (years)	20.7 ± 8.3	--	--
Total Cholesterol (mg/dL)	183.5 ± 24.6	191.6 ± 34.3	NS
HDL (mg/dL)	60.6 ± 15.1	61.8 ± 16.5	NS
LDL (mg/dL)	106.1 ± 21.8	112.2 ± 33.5	NS
Triglyceride (mg/dL)	63.5 (52.0 – 91.5)	64.0 (50.0 – 91.5)	NS
hs CRP (mg/L)	1.03 (0.7 – 2.4)	0.96 (0.6 – 3.1)	NS
Ca²⁺ (mg/dL)	9.2 ± 0.7	9.4 ± 0.3	p < 0.01
PO₃⁻ (mg/dL)	3.6 ± 0.8	3.7 ± 0.6	NS
25(OH)D (ng/mL)	20.4 ± 8.2	22.6 ± 7.4	NS
25(OH)D corrected (ng/mL)	22.7 ± 9.1	26.6 ± 9.6	p < 0.02
Sun Exposition Score	18.9 ± 15.9	23.5 ± 14.9	NS
Calcium score > 1 (n/%)	24 (16.6%)	4 (8.3%)	NS
PTH (pg/mL)	39.2 ± 17.6	37.2 ± 17.9	NS
Smoking habit (n/%)	76 (52.4%)	19 (39.6%)	NS
Retinopathy (n/%)	25 (23.1%)	--	--
Nephropathy	11 (10.2%)	--	--
Statins treatment (n/%)	21%	--	--
Antihypertensive therapy (n/%)	15%	--	--
Salicylate treatment (n/%)	16%	--	--

Vitamin D concentrations

There were no significant differences in the mean 25OHD concentrations in patients compared with controls (20.7 ± 7.7 vs $23.35 \pm 8,3$ ng/mL, $p = 0.06$). When comparisons were made using the corrected concentration of 25OHD, the differences were statistically significant, with lower values in patients in comparison with controls (22.72 ± 9.11 vs 26.63 ± 9.56 ng/mL, $p = 0.018$). Even with the application of winter correction, we found a high prevalence of 25OHD deficiency in T1D patients, which reached 43.2% vs 21.7% in controls ($p = 0.032$) (Figure 1A, 1B)

Figure 1

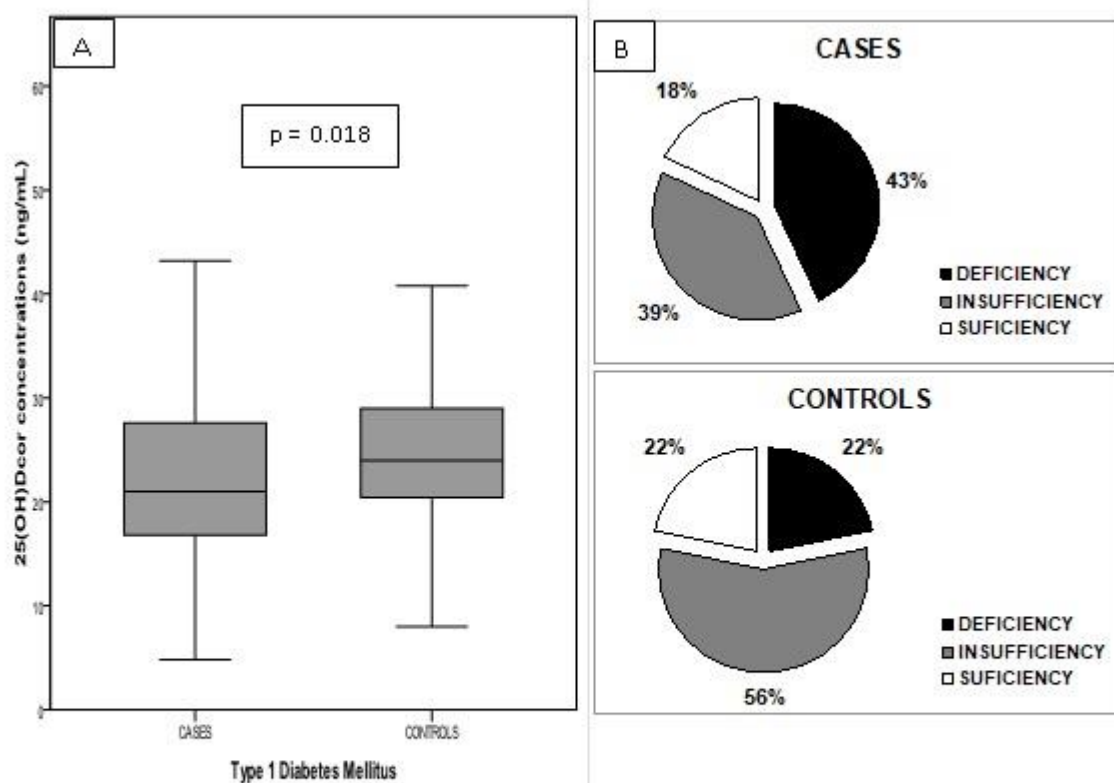


Figure 1A. Difference between mean concentrations of corrected vitamin D in T1D vs controls.

Figure 1B. Distribution of vitamin D categories in T1D and controls (deficiency, insufficiency and sufficiency).

When very severe vitamin D deficiency was considered, defined as a 25OHD < 15 ng/mL, the prevalence in T1D was 20.5% vs 3% in controls ($p = 0.04$).

Moreover, considering the whole sample, lower 25OHD concentrations were found in males (22.1 ± 8.3 vs 26.0 ± 10.2 ng/mL, in females; $p = 0.01$) and in smokers (22.3 ± 9.7 vs 25.2 ± 8.9 ng/mL;

$p = 0.04$). In the diabetic group, subjects with a longer evolution of diabetes (more than 20 years), had lower 25OHD concentrations (21.18 ± 7.9 vs 24.98 ± 9.5 ; $p = 0.04$) in relation to those patients with less than 20 years of evolution.

There were no differences in 25OHD concentrations according to BMI. T1D patients with a BMI over 25 kg/m^2 (48%) displayed similar 25OHD concentrations to those patients with BMI under 25 kg/m^2 . Nevertheless, this subgroup of patients with greater BMI showed significantly higher concentrations of hs CRP than lean T1D patients (3.1 ± 5.0 vs $1.3 \pm 1.9 \text{ mg/L}$, $p = 0.009$). Moreover, the same between 25OHD and hs CRP was observed in obese ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$) T1D patients (10%). In the diabetic group, lower concentrations in smokers were not found.

Sun exposure evaluation

As expected, the mean weekly sun exposure score was statistically significant lower in those participants evaluated in winter than in those in which it was conducted in summer (36.1 ± 12.2 vs 11.3 ± 4.9 ; $p = 0.0001$). Moreover, there was a correlation between the sun exposure score and 25OHD concentrations ($r_s = 0.152$, $p = 0.023$). The mean weekly sun exposure score was lower in participants with deficient 25OHD concentrations (19.5 ± 13.1 vs 25.4 ± 16.7 ; $p = 0.01$). This finding was also observed in T1D patients and controls when evaluated separately (11.9 ± 8.5 vs 23.0 ± 17.8 in T1D patients; $p = 0.01$; and 21.2 ± 13.4 vs 26.5 ± 16.2 ; in controls; $p = 0.047$).

Furthermore, sun exposure score was also related to calcium metabolism parameters including PTH concentrations, so that sun exposure score was lower in participants with $\text{PTH} \geq 40 \text{ pg/mL}$ (20.3 ± 14.8 vs 27.8 ± 15.4 ; $p = 0.05$). No differences were detected between the sun exposure score and gender, smoking habit, diabetic condition or years of diabetic evolution.

Subclinical atherosclerosis

Carotid ultrasonography

T1D patients showed a significantly higher CIMT compared to control group (0.55 ± 0.14 vs $0.48 \pm 0.14 \text{ mm.}$, $p < 0.01$). There were no differences in the number of plaques between patients and controls. A low proportion of subjects in both groups presented atheroma plaques (16 patients and 4 control subjects, 11 vs. 8%), in all cases conditioning stenosis of less than 50%.

Carotid calcification

A high proportion of subjects in both groups, patients and controls, displayed a CACS of 0 (92% vs 82%), and only 24 T1D patients and four controls presented a calcium score greater than 0. The differences between both groups were not significant (16.6% vs 8% in controls, $p = 0.236$).

Correlations

When correlation analyses were performed, we did not find association between 25OHD concentrations and any cardiovascular results, neither CACS nor CIMT. In the group of T1D patients, there were no differences between the mean 25OHD of subjects with a CACS of 0 and those with a CACS greater than 0 (22.4 ± 9.5 vs 23.9 ± 7.3 , $p = 0.97$). When T1D patients were categorized in those with and without 25OHD deficiency, no significant differences were found regarding CIMT between the two groups (0.54 ± 0.14 vs 0.55 ± 0.15 , $p = 0.66$).

Table 2 summarizes the relationship between 25OHD and subclinical atherosclerosis imaging markers.

Table 2. Cardiovascular imaging outcomes in T1D patients according to vitamin D deficiency

	25OHD \leq 20 (ng/mL)	25OHD $>$ 20 (ng/mL)	<i>p</i> value
CALCIUM SCORE \geq 1 UA (n = 24)	8 (33.3 %)	16 (66.6 %)	NS
CAROTID ECOGRAPHY CIMT (mm)	0.54 ± 0.14	0.55 ± 0.15	NS

Discussion

In our population of T1D patients from a Mediterranean country we did not find an association between vitamin D deficiency and subclinical atherosclerosis assessed by CACS and CIMT.

In the present study, our cohort of relatively young Caucasian Mediterranean T1D patients with a long disease duration we found a high prevalence of vitamin D deficiency of about 40%, doubling the one found for the control group. Moreover, considering even a lower cutoff < 15 ng/mL, we also found a higher percentage of T1D patients with these low concentrations in comparison to control group (20% vs 3%), a surprising finding considering that our population live in a latitude much closer to the Equator than northern European countries. Other studies have also found a high prevalence of vitamin D deficiency [10, 20], but in most of the reports the prevalence was lower than in our population [9, 13, 18].

Evaluation of Sun Exposition Score did not show differences between T1D patients and controls in the present study. These data do not explain the lower concentrations of 25OHD found in our T1D patients, although a good correlation was found between season of blood sample collection and 25OHD and PTH concentrations.

Compared with data from American non-Hispanic white patients participating in the Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) Study [18] with similar age, latitude and diabetes duration, our patients displayed four-fold higher prevalence of vitamin D deficiency (≤ 20 ng/mL). In comparison with the population of DCCT/EDIT Study [13] (American, almost all Caucasian, younger, mean age of 32.4 ± 2.6 years) with slightly lower disease duration (7.5 ± 2.1 years), our patients presented 1.5-fold more 25OHD deficiency (≤ 20 ng/mL). In these later studies, 25OHD determination was performed by using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry while in the present study the determination was performed using a chemiluminescent immunoassay; this fact may have influenced the results, and in fact may explain differences with the aforementioned studies.

There was a low prevalence of subclinical atherosclerosis in our study. Only a 14.5% of calcium score values were greater than 1 UA which is a low proportion considering other reports [27, 28].

Recently, low levels of 25OHD have been described in severe obese insulin-resistant subjects, with an inverse correlation with inflammatory markers [29]. In our T1D population there were no differences in 25OHD levels according to BMI, despite that hs CRP levels were higher in overweight or obese. Only 10% of our patients were obese and none of them showed a BMI greater than 40 kg/m^2 .

We observed greater values of CIMT in T1D patients without overt cardiovascular disease compared with controls, as other studies have described in patients with T1D, T2D and glucose intolerance [30, 31]. Although some authors suggested that impairment in glucose metabolism might have stronger association with early atherosclerosis in women than men [31], no sex-related CIMT differences were detected in our cohort.

Despite that some studies have found an association of vitamin D deficiency with a higher cardiovascular risk in T1D [18, 20], it was not the case in our cohort. In concordance with our findings, among the 1193 T1D patients from DCCT/EDIC [13] neither circulating 25OHD nor its metabolites were associated with changes in CIMT or CACS. In contrast with our study in which we performed simultaneous determinations of 25OHD concentrations and cardiovascular imaging tests, in the DCCT study the cardiovascular tests were performed a median of 4 to 10 years after the determination of 25OHD. Despite these methodological differences, this study was unable to show a significant association between vitamin D deficiency and cardiovascular disease.

Young et al [18] in CACTI Study, with a similar to ours, found a significant association between vitamin D deficiency and the risk of developing CACS.

Potential weaknesses of our study include the lack of data about calcium and vitamin D intake. On the other hand, the present study was initially designed to evaluate the subclinical atherosclerosis in T1D in comparison to controls.

In summary, in our population of Mediterranean T1D patients with quite long disease duration and with a low prevalence of subclinical atherosclerosis, despite a remarkable high prevalence of 25OHD deficiency, there was no association between 25OHD deficiency and subclinical cardiovascular disease.

References

1. Holick MF. (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357(3):266-281.
2. Bikle D. (2009) Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 94:26-34.
3. Maalouf NM. (2008) The noncalcitropic actions of vitamin D: recent clinical developments. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17(4):408-15
4. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier Catherine, et al. (2008) Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation* 117:503-511.
5. Norman PE, Powell JT. (2005) Vitamin D, Shedding Light on the Development of Disease in Peripheral Arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(1):39-46

6. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. (2006) Vascular Calcification. Pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 99:1044-1059
7. Pozzilli P, Manfrini S, Crinò A, Picardi A, Leomanni C, Cherubini V, et al. (2005) Low levels of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25 dihydroxyvitamin D3 in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 37(11):680-3.
8. Littorin B, Blom P, Schölin A, Arnqvist HJ, Blohmé G, Bolinder J, et al. (2006) Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia* Volume 49, Issue 12, pp 2847-2852
9. Greer RM, Portelli SL, Hung BS, Cleghorn GJ, McMahon SK, Batch JA. (2012) Serum vitamin D levels are lower in Australian children and adolescents with type 1 diabetes than in children without diabetes. *Pediatr Diabetes* 14(1):31-41
10. Bierschenk L, Alexander J, Wasserfall C, Haller M, Schatz D, Atkinson M. (2009) Vitamin D levels in subjects with and without type 1 diabetes residing in a solar rich environment. *Diabetes Care* 32:1977-1979.
11. Jung Y, Sang L, Jae-Geun L, Gil S, Seong K, Gwanpyo K, Mi-Hee K, Keun et al. (2012) Serum Vitamin D Status and Its Relationship to Metabolic Parameters in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Chonnam Med J* 48(2):108-115
12. Reis JP, Mühlen D, Edgar R, Miller ER, Michos ED and Appel LJ. (2009) Vitamin D Status and Cardiometabolic Risk Factors in the United States Adolescent Population. *Pediatrics* 124:e371
13. Sachs MC, Brunzell JD, Cleary PA, Hoofnagle AN, Lachin JM, Molitch ME, et al. (2013) Circulating Vitamin D Metabolites and Subclinical Atherosclerosis in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 36(8):2423-9
14. Welsh P, Doolin O, McConnachie A, Boulton E, McNeil G, Macdonald H, et al. (2012) Circulating 25OHD, Dietary Vitamin D, PTH, and Calcium Associations with Incident Cardiovascular Disease and Mortality: The MIDSPAN Family Study. *J Clin Endocrinol Metab* 7(12):4578-4587
15. Reis JP, von Mühlen D, Michos ED, et al. (2009) Serum vitamin D, parathyroid hormone levels, and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 207:585–590
16. Joergensen C, Reinhard H, Schmedes A, et al. (2012) Vitamin D levels and asymptomatic

- coronary artery disease in type 2 diabetic patients with elevated urinary albumin excretion rate. *Diabetes Care* 35:168-172
17. Watson KE, Abrolat ML, Malone LL et al. (1997) Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation* 96:1755-1760
 18. Young KE, Snell-Bergeon JK, Naik RG, Hokanson JE, Tarullo D, Gottlieb PA, et al. (2011) Vitamin D deficiency and coronary artery calcification in subjects with type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 34(2):454-8
 19. Joergensen C, Gall MA, Schmedes A, Tarnow L, Parving HH, Rossing P. (2010) Vitamin D levels and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 33:2238-2243
 20. Joergensen C, Hovind P, Schmedes A, Parving HH, Rossing P. (2011) Vitamin D levels, microvascular complications, and mortality in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 34:1081-1085
 21. Aguilera E, Serra E, Granada ML, Alonso N, Pellitero S, Pizarro E, Reverter J, Salinas I, Soldevila B, Mauricio D, Puig-Domingo M. (2014) Low Prevalence of Subclinical Atherosclerosis in Asymptomatic Patients With Type 1 Diabetes Mellitus in a European Mediterranean Population. *Diabetes Care* 37(3):814-20
 22. Hanwell HE, Vieth R, Cole DE, Scillitani A, Modori S, Frusciante V, et al. (2010) Sun exposure questionnaire predicts circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations in Caucasian hospital workers in southern Italy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:334-337
 23. Holick MF, Blinkey NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. (2011) Evaluation, treatment, and prevention of vitamin d deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96(12):3908.
 24. Holick MF. (2009) Vitamin D status: measurement, interpretation and clinical application. *Ann Epidemiol* 19(2):73-78.
 25. Rosen CJ. (2011) Vitamin D Insufficiency. *N Engl J Med* 364:248-254
 26. Shaw LJ, Raggi P, Schisterman E, Berman DS, Callister TQ. (2003) Prognostic value of cardiac risk factors and coronary artery calcium screening for all-cause mortality. *Radiology* 228:826-833
 27. Dabelea D, Kinney G, Snell-Bergeon JK, Hokanson JE, Eckel RH, Ehrlich J, et al. (2003) Effect of type 1 diabetes on the gender difference in coronary artery calcification: a role for insulin resistance? The Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) Study.

Diabetes 52:2833-2839

28. Salem M, Moneir I, Adly AM, Esmat K. (2011) Study of coronary artery calcification risk in Egyptian adolescents with type-1 diabetes. *Acta Diabetol* 48:41-53
29. Bellia A, Garcovich C, D'Adamo M, Lombardo M, Tesauro M, Donadel G et al. (2013) Serum 25-hydroxyvitamin D levels are inversely associated with systemic inflammation in severe obese subjects. *Intern Emerg Med*, 8:33-40
30. Yazici D, Yavuz DG, Toprak A, Deyneli O, Akalin S (2013) Impaired diastolic function and elevated Nt-proBNP levels in type 1 diabetic patients without overt cardiovascular disease. *Acta Diabetol* 50:155-161
31. Sipilä K, Kähönen M, Salomaa V, Päivänsalo M, Karanko H, Varpula M et al. (2012) Carotid artery intima-media thickness and elasticity in relation to glucose tolerance. *Acta Diabetol* 49:215-223

Acknowledgments

This study has been supported by a grant “Ajut en la Recerca en Diabetis Gonçal Lloveras” from the Catalan Association of Diabetes.

D.Mauricio is supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III (No. PI12-00183)

We thank the nursing staff of the Endocrinology Unit of Hospital Germans Trias i Pujol in Badalona (Maribel Cuadrado, Isabel Ordoñez and Carme Perez) for their technical assistance. We thank also Nicki van Berckel from the editorial staff of the Journal of Hepatology for reviewing the English version of this manuscript.

5.3 TERCER ESTUDI

Títol:

Relationship of YKL-40 and adiponectin and subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with type 1 diabetes mellitus from a European Mediterranean population.

Relació de YKL-40 i adiponectina amb l'arterioesclerosi subclínica en pacients asimptomàtics amb diabetis mellitus tipus 1 d'una població Europea Mediterrània.

Autors:

Aguilera E, Serra-Planas E, Granada ML, Pellitero S, Reverter JL, Alonso N, Soldevila B, Mauricio D, Puig-Domingo M

Revista:

*Cardiovasc Diabetol. 2015 Sep 18;14:121*¹⁸⁰

Factor d'impacte 2015:

4.53 (Quartil 1)

ORIGINAL INVESTIGATION

Open Access



Relationship of YKL-40 and adiponectin and subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with type 1 diabetes mellitus from a European Mediterranean population

Eva Aguilera^{1,2*}, Enric Serra-Planas¹, M. Luisa Granada³, Silvia Pellitero^{1,2}, Jordi L. Reverter¹, Núria Alonso^{1,2}, Berta Soldevila^{1,2}, Dídac Mauricio^{1,2} and Manel Puig-Domingo^{1,2}

Abstract

Background: The glycoprotein YKL-40 is a new marker of early inflammation and endothelial dysfunction. Adiponectin is a collagen-like protein with anti-atherogenic and anti-inflammatory effects. Increased concentrations of both markers have been reported in patients with type 1 diabetes (T1D).

Aim: To assess the possible role of YKL-40 and adiponectin as a marker of subclinical cardiovascular disease in asymptomatic patients with type 1 diabetes with no history of ischemic or macrovascular heart disease and its relationship with other classic inflammatory biomarkers.

Methods: Concentrations of YKL-40, adiponectin, IL-6, IL-1 β , TNF- α , hsCRP and homocysteine were determined in 150 T1D patients (58 % men, age: 38.6 \pm 8.1 years, 20.4 \pm 8.1 years of evolution, BMI: 25.1 \pm 3.6 kg/m²; HbA_{1c} 8.1 \pm 2.3 %, 48 % smokers; 26 % retinopathy, microalbuminuria 9 %) and 50 controls age, sex and smoke condition matched. Subclinical atherosclerosis was assessed by a carotid ultrasonography and a computed tomography for evaluation of calcium artery calcification score (CACS).

Results: 82 % of T1D patients and 92 % of controls had a calcium score of 0. T1D patients showed a significantly higher mean common carotid artery intima media thickness (CIMT) compared to controls (0.55 \pm 0.14 vs 0.48 \pm 0.14 mm, $p = 0.01$). Concentrations of YKL-40 and adiponectin were significantly higher in T1D [42.6 (10.4–195.0) vs \pm 28.7 (11.0–51.2) ng/ml, $p = 0.001$ and 15.8 \pm 9.1 vs. 12.4 \pm 5.3 mg/ml, $p = 0.008$], with no differences when compared to other inflammatory parameters. In T1D patients no association was found between YKL-40 and adiponectin and screening test for subclinical arterial disease (neither CACS nor CIMT). A positive correlation was found between levels of YKL-40 and age and duration of disease ($r = 0.28$, $p = 0.003$; $r = 0.35$, $p = 0.001$). There were no differences in the YKL-40 in relation to the presence or absence of retinopathy or nephropathy. Levels of adiponectin were higher in patients with nephropathy (21.84 \pm 8.15 vs. 14.88 \pm 8.27 mg/ml, $p = 0.008$).

Conclusions: Type 1 diabetes patients from a Mediterranean area with a longer disease evolution, although a lower degree of subclinical disease, showed significantly higher concentrations of YKL-40 and adiponectin compared with the controls. Therefore, we conclude that YKL-40 and adiponectin are early inflammatory markers in diabetic subjects even in the presence of a low atherosclerotic background.

Keywords: YKL-40, Adiponectin, Subclinical atherosclerosis, Type 1 diabetes

*Correspondence: aguilerahurtado@yahoo.es

¹ Endocrinology and Nutrition Unit, Department of Medicine, Institute Research and Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Crta. Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

Background

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is associated with an increase in cardiovascular disease and higher mortality compared to the non-diabetic population [1, 2]. Different studies have demonstrated that functional and structural vascular changes as altered endothelial function occur at a very early stage of the course of T1D [3–5].

In a similar way that for type 2 diabetes (T2D), some authors have proposed that silent subacute inflammation is also operative in T1D as a driver of cardiovascular disease development. Thereby, it has been reported that low adiponectin levels predict cardiovascular events and coronary artery calcification (CAC), as well as levels of soluble interleukin 2 receptor correlate also with CAC progression [6–8].

Recently, the possible role in atherosclerosis and diabetes of new inflammatory markers as YKL-40 has been investigated. YKL-40 is a 40 kDa heparin- and chitin-binding glycoprotein, which is expressed and secreted by different cell types of the immune system, differentiated vascular endothelial and smooth muscle cells. This inflammatory glycoprotein seems to play an important role in endothelial dysfunction and during the early stages of atherosclerosis [9]. Several studies have reported elevated YKL-40 levels in different cardiovascular conditions and it has been described a positive association between this marker and mortality [10–17]. It has been reported an increased YKL-40 expression in patients with carotid atherosclerosis [18], as well as a positive correlation between common carotid artery intima media thickness (CIMT) and YKL-40 levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome [16] and between arterial stiffness and YKL-40 levels in essential hypertension subjects [15]. Increased YKL-40 levels have also been found both in patients with T1D and T2D [19–22], and particularly in T1D and T2D patients with microalbuminuria, suggesting that this glycoprotein might be used as an early marker of vascular disease [18, 21]. A recent study has reported higher levels of YKL-40 in asymptomatic T2D patients with suspected coronary artery disease (CAD) suggesting a possible association between this marker and CAD [23].

Adiponectin is a collagen-like protein secreted from the adipose tissue and it has anti-atherogenic and anti-inflammatory effects. Hypoadiponectinemia have been reported associated with obesity, metabolic syndrome, atherosclerosis, CAD and atherogenic dyslipidemia with low-density lipoprotein (LDL) subfraction phenotype, as well as in patients with T2D [24, 25]. Nevertheless, higher adiponectin levels have been described in T1D patients and have been associated with impairment of renal function and longer evolution disease. Despite these higher levels and the anti-atherogenic effects of adiponectin,

there is an increase in the cardiovascular mortality in T1D patients [6, 26–29].

There is scarce information concerning the possible role of adiponectin as an indicator of subclinical atherosclerosis. A recent study has shown no correlation between adiponectin and CIMT in children with T1D [30].

There are no studies evaluating the association between YKL-40 with subclinical CAD in T1D patients. Therefore, the aim of this study was to assess the possible role of YKL-40 and adiponectin as a marker of subclinical cardiovascular disease in asymptomatic patients with T1D from a Mediterranean area and its potential relationship with other classic inflammatory biomarkers.

Methods

An initial cohort of 150 asymptomatic T1D consecutively followed at our outpatient clinic and a control group of 50 subjects matched by age, sex and smoke condition were recruited between 2010 and 2012 in Badalona, Barcelona. In this cohort we evaluated the presence of subclinical atherosclerosis as previously reported [31]. Inclusion criteria were an age between 20 and 50 years and an evolution disease of more than 10 years. The exclusion criteria were a previous history of clinical macrovascular or cardiac heart disease (CHD). Current smoking and previously smoking condition for less than 5 years were included in the same category. A group of non-diabetic subjects matched for age, sex, body mass index (BMI) and smoking condition recruited from the relatives and staff of our hospital was also included as control group. All patients were under intensive insulin treatment and 15 % of them using pump devices.

The local ethics committee, in accordance with the Declaration of Helsinki, approved the study; all participants gave their written informed consent prior to inclusion.

Demographic and clinical data including age, sex, history of clinical macrovascular disease and microvascular diabetic complications, family history of early CHD in first degree relatives (defined as CHD occurring before age 55 years in men and before age 65 years in women) and medical treatment (antihypertensive agents, statins and acetylsalicylic acid) were recorded for all patients. BMI was calculated as weight in kilograms divided by height per square meter.

Diabetic nephropathy was evaluated according to urinary albumin excretion. Thus, normal urinary albumin excretion was considered below 30 mg/24 h, microalbuminuria from 30 to 300 mg/24 h and proteinuria above 300 mg/24 h. These results were confirmed on at least two out of three consecutive determinations. Diabetic retinopathy was defined by fundus oculi performed by a specialized ophthalmologist.

Trained personnel collected clinical parameters (age, sex, height, weight, BMI, blood pressure and smoking habit and family history of early CHD).

Biochemical measurements

Blood samples were drawn by venipuncture at between 8.00 and 08.30 h after an overnight fast. Plasma glucose, total cholesterol, high density (HDL) and low density (LDL) lipoprotein cholesterol, triglycerides, calcium (Ca) and phosphate (Ph) were measured by routine clinical chemistry immediately after extraction. HbA_{1c} was measured in blood samples with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) by high-performance liquid chromatographic (HPLC) using a fully-automated Adams Menarini HI-AUTO A1c 8160 analyzer manufactured by Arkray (Kyoto, Japan) with an inter-assay coefficient of variation of 1.8 and 1.5 % at HbA_{1c} levels of 4.8 and 9.0 % respectively (reference range 4–5.8 %). This method is a cation exchange HPLC method certified by the NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) of traceability to the Diabetes Control and Complications Trial Reference (DCCT) Method. Mean HbA_{1c} was calculated as an average of three determinations in the previous year before the inclusion in the study.

Serum YKL-40 was analyzed using a commercial ELISA assay (Quidel Speciality products, San Diego, CA USA), Sensitivity of the assay was 20 µg/ml. The average within-run and total CVs were 3.6 and 5.4 %, respectively. The reference interval (central 90 % interval) for chondrex in healthy adults was 25–95 µg/l.

Serum adiponectin concentrations were measured by a commercial radioimmunoassay (Linco Research, Inc., St Louis, MO, USA), using ¹²⁵I-labeled technique. The intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) at mean adiponectin levels of 3, 6 and 15 µg/ml were 3.6, 6.2 and 1.8 % intra-assay, and 9.2, 6.9 and 9.2 % inter-assay, respectively. Assay sensitivity was 1 µg/ml. All plasma samples were diluted 1:250 yielding an effective range of 0.2–50 µg/ml.

Plasma homocysteine concentrations were measured using an automated enzyme chemiluminescence immunoassay (Immulite 2000® Siemens Healthcare Diagnostics, Llanberis, UK). Assay sensitivity was 1.2 µmol/l. The intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) at mean homocysteine concentrations of 11 and 24.5 µmol/l were 8.1 and 5.6 % intra-assay, and 8.5 and 8.1 % inter-assay, respectively (reference range 5.0–12 µmol/l).

Serum TNF-α, IL-6 and IL-1β concentrations were measured using an enzyme chemiluminescence immunoassay (Immulite®, Siemens Healthcare Diagnostics, Llanberis, UK). For TNF-α, analytical sensitivity was 1.7 pg/mL and interassay CV <6.8 %. For IL-6 analytical

sensitivity was 2 pg/ml and interassay CV <7.3 %. For IL-1β analytical sensitivity was 1.5 pg/ml and interassay CV <9.1 %.

Serum high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were measured using an ultrasensitive CRP test (N High Sensitivity CRP) on a BN-ProSpec nephelometer (Dade Behring, GMBH, Marburg, Germany) with an inter-assay variation coefficient of 3.7 and 3.5 % for CRP concentrations of 2.38 and 52.2 mg/l, respectively. Assay was 0.175 mg/l, performed using a sample dilution of 1:20.

Evaluation of subclinical atherosclerosis

A computed tomography (CT) to quantify coronary artery calcification score (CACS) was performed using a 16-slice high resolution CT ECG-gated, with retrospective reconstruction and with special attention to the coronary arteries (SOMATOM Sensation 16 and Syngo Calcium Scoring software for analysis and calcium calcification). CACS was identified as a dense area in the coronary artery exceeding the threshold of 130 Hounsfield units. A total Agatston score was determined for each patient. The results were expressed according to the classification previously described by Shaw et al. [32] and results were transformed as a categorical variable considering positive those greater than zero and negative those with negative results equal to zero.

A carotid ultrasound (CU) to measure the CIMT was performed in all participants. Ultrasonographic images were acquired using high resolution B-mode ultrasound (Siemens Acuson Sequoia 512) with an electric linear array 13-5 MHz transducer. The CIMT was the result of the median of the tunica intima and tunica media thickness in per protocol defined carotid areas (left internal carotid, right internal carotid, common carotid and bifurcation). Plaque number and characteristics were recorded.

A single trained radiologist performed evaluation and acquisition of CT images and CU.

Statistical methods

Continuous variables were expressed as mean standard deviations (SD) or median (percentile 2.5 and 97.5) and categorical variables as frequency and/or percentage. The Student's t-test or the non-parametric Mann-Whitney U test, as appropriated, tested differences between groups. A p value less than 0.05 was considered statistically significant. Categorical variables were compared with a χ^2 test. Correlation analyses between continuous variables were performed by using univariate Spearman correlation analysis. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Science (SPSS, Chicago, IL, USA) for personal computers, version 12.0 (SPSS).

Results

Subclinical atherosclerosis evaluation

Carotid ultrasonography

Type 1 diabetes patients showed a significantly higher common carotid artery intima-media thickness (CIMT) compared to control group (0.55 ± 0.14 vs 0.48 ± 0.14 mm, $p < 0.01$). There were no differences in the number of plaques between patients and controls. A low proportion of subjects in both groups presented atheroma plaques (16 patients and 4 control subjects, 11 vs 8 %), in all cases conditioning stenosis of less than 50 %.

Carotid calcification

A high proportion of subjects in both groups, patients and controls, displayed a CACS of 0 (92 vs 82 %), and only 24 T1D patients and four controls presented a calcium score greater than 0. The differences between both groups were not significant (16.6 vs 8 % in controls, $p = 0.236$).

YKL-40 and inflammatory markers

The baseline characteristics of the whole sample and the biomarkers levels are shown in Table 1. Levels of YKL-40 were significantly higher in T1D than in controls [42.6 (10.4–195.0) vs ± 28.7 (11.0–51.2) ng/ml $p = 0.001$] (Fig. 1) and levels of adiponectin were also significantly higher in T1D patients (15.8 ± 9.1 vs 12.4 ± 5.3 mg/ml, $p = 0.008$), with no differences between patients and controls in the other inflammatory parameters.

YKL-40, adiponectin and subclinical atherosclerosis imaging

When univariate correlation analyses were performed, we did not find association between YKL-40 and adiponectin levels and any cardiovascular surrogates, neither CACS nor CIMT, either when these variables were evaluated as continuous or categorical variables (presence of carotid plaques and CACS 0 or ≥ 1). There were no differences between the mean YKL-40 levels of subjects with a CACS of 0 and those with a CACS greater than 0. When T1D were categorized according to the presence of plaques there were no differences.

There were no positive correlations of the other inflammatory markers evaluated (TNF- α , IL-6, IL-1 β , homocysteine, hsCRP) in relation to the imaging markers of subclinical atherosclerosis.

YKL-40, adiponectin, age and evolution of T1D

A positive correlation was found between levels of YKL-40 and age and duration of disease ($r = 0.28$, $p = 0.003$; $r = 0.35$, $p = 0.001$). Levels of adiponectin were also positively correlated with age ($r = 0.25$, $p = 0.01$). However, no correlations were found between YKL-40 and adiponectin.

Table 1 Basal characteristics and biomarkers levels of patients with type 1 diabetes and control group

	Type 1 diabetes	Control	p
N	150	50	
Age (years)	38.6 ± 8.1	38.1 ± 7.2	NS
Sex (male/female %)	58/42	56/44	NS
Evolution type 1 diabetes (years)	20.4 ± 8.1	–	–
Family history CHD (%)	20	22	NS
Body mass index (kg/m ²)	25.1 ± 3.6	25.3 ± 4.3	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	117.3 ± 13.5	–	–
Diastolic blood pressure (mmHg)	70.9 ± 7.7	–	–
Retinopathy (%)	26	–	–
Nephropathy (%)	9	–	–
HbA1c (% mmol/mol)	8.1 ± 2.3 (64.9 \pm 11.4)	–	–
Total cholesterol (mg/dl)	182.7 ± 25.1	191.1 ± 34.1	NS
HDL (mg/dl)	60.3 ± 15.1	61.8 ± 16.6	NS
LDL (mg/dl)	105.3 ± 21.9	111.3 ± 33.5	NS
Smoke (% yes/no)	48/52	42/58	NS
Statins (%)	21	–	–
Antihypertensive (%)	15	–	–
Acetylsalicylic acid (%)	16	–	–
YKL-40 (ng/ml)	42.6 (10.4–195.0)	28.7 (11.0–51.2)	0.001
Adiponectin (mg/ml)	15.4 ± 8.4	11.9 ± 5.1	0.007
TNF- α (pg/ml)	7.5 ± 2.4	7.8 ± 1.8	NS
IL-1 β (pg/ml)	1.0 ± 1.1	1.1 ± 0.8	NS
IL-6 (pg/ml)	2.0 ± 9.5	3.0 ± 4.0	NS
Homocysteine (mmol/l)	9.74 ± 5.1	10.9 ± 3.4	NS
hsCRP (mg/l)	2.21 ± 3.9	2.5 ± 3.9	NS

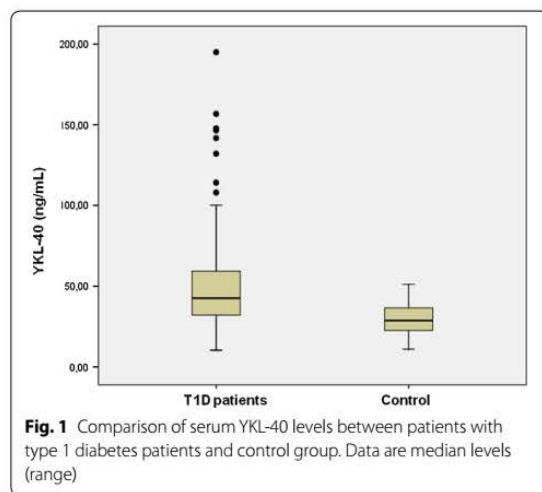
YKL-40, cardiovascular risk factors and metabolic control

Patients under treatment with antihypertensive agents displayed significantly higher levels of YKL-40 [41.4 (10.41–195.1) vs 28.8 (11.0–51.2) ng/ml, $p = 0.04$] compared to those patients without treatment.

Levels of YKL-40 were not found different regarding gender, BMI, smoking status, treatment with statins or acetylsalicylic acid and HbA_{1c} values.

YKL-40, adiponectin and microvascular complications

There were no differences in YKL-40 concentrations in relation to the presence or absence of retinopathy or nephropathy. Levels of adiponectin were higher in patients with nephropathy (21.84 ± 8.15 vs 14.88 ± 8.27 mg/ml, $p = 0.008$), but not regarding the presence of retinopathy; neither TNF- α , nor IL-6 and IL-1 β showed differences regarding the presence of microvascular disease.



A positive correlation was found between the concentrations of YKL-40 and TNF- α ($r = 0.24$, $p = 0.02$), but not with the other inflammatory markers evaluated. IL-1 β and IL-6 and TNF- α correlated among them ($r = 0.39$, $p = 0.001$; $r = 0.36$, $p = 0.001$, respectively).

Discussion

In this cohort of patients living in a Mediterranean area and with a relatively long disease evolution we did not find an association between YKL-40 and adiponectin levels and the presence of subclinical CAD evaluated by CACS and CIMT. However, our T1D patients displayed higher levels of YKL-40 than control subjects. These findings are in concordance with two previous studies performed in T1D [19, 20]. Rathcke et al. [20] reported elevated YKL-40 levels in a cohort of Danish, middle-aged (50 years old) T1D patients, with a long diabetes duration (30 years) and with a high prevalence of microvascular complications (more than 50 %). Sakamoto et al. [19] showed also elevated levels of YKL-40 in a cohort of Japanese T1D patients younger than the cohort of Danish patients (mean age of 25 years), with less mean duration of diabetes (13 years) and with a lower prevalence of microvascular complications (9 % of microalbuminuria, 33 % of retinopathy). Our cohort of T1D showed a mean age and duration of the disease intermediate between these two specific studies, but with a much lower prevalence of microangiopathy than the Danish cohort and similar to the Japanese patients. Despite that these two studies have described elevated concentrations of YKL-40 in T1D patients with microalbuminuria, it was not the case in our patients, indicating that YKL-40 is already increased even at a stage when subclinical micro and macro vascular disease is not detected with current clinical procedures or

if it is modestly present. The low proportion of our T1D patients presenting nephropathy (9 %) but showing high YKL-40 compared to controls clearly indicates that at this stage of T1D evolution, inflammatory status is already activated. Moreover, we did not find higher levels of YKL-40 in nephropathy patients at the stage of positive microalbuminuria, and although we did not find differences according to the presence or absence of retinopathy, probably due to the low number of subjects included in our cohort, all the data taken together suggest that more prospective studies are probably needed in order to clarify if relevant changes in the magnitude of YKL concentration are detected over time and in relation to the appearance of microvascular disease.

Several clinical studies documented elevated YKL-40 levels in patients with cardiovascular disease, including CAD, peripheral artery disease and stroke, either with or the coexistence of diabetes. An association has also been described between higher YKL-40 levels and an increased mortality, especially in elderly persons with stable CAD [11–14]. Nevertheless, there are no studies yet aimed to determine the possible role of this glycoprotein in patients with T1D and cardiovascular disease. The prevalence of subclinical CAD was low in our cohort of asymptomatic T1D patients and we did not find association between YKL-40 levels and any cardiovascular surrogate, neither CACS nor CIMT, either when these variables were evaluated as continuous or categorical variables, thus suggesting that YKL-40 elevation is more a marker of increased inflammation in T1D patients, rather than one indicating subclinical disease. In our cohort, there was a minimal degree of overlap between control and patients, which seems to reflect that with a so low degree of subclinical disease in our diabetic cohort, inflammation is a state substantially linked to T1D before organ lesions are detectable, and which concentrations start to increase probably early after diagnosis. This finding is in accordance with the Japanese cohort, in which there was no significant correlation between YKL-40 levels and CIMT [19]. The only relationship we found was that in patients treated with antihypertensive drugs, YKL-40 was higher, although in those with established nephropathy there were no differences; we cannot at this point speculate whether these differences are due to the fact that those patients had a higher degree of vascular lesion or to the antihypertensive treatment itself. At the low level of subclinical CAD of our population when compared to the controls, there were no differences in the rest of circulating concentrations of classical inflammatory biomarkers studied between the two groups. Although we did not find correlation in this cross-sectional evaluation of YKL-40 with metabolic control—measured as A_{1c} levels—it will be interesting to study if YKL-40 concentrations are

modified by intensification of metabolic parameters or in a broader range of A_{1c} .

Our lack of correlation between adiponectin and CIMT is in concordance with a previous study conducted in children with T1D [30]. A positive correlation between higher concentrations of adiponectin and the presence of microalbuminuria was also found in this group of T1D patients. Also, this positive correlation has been reported by other authors [28, 29].

Conclusions

In T1D patients from a Mediterranean area with a long disease evolution although a low degree of subclinical disease, we found significantly higher concentrations of YKL-40 and adiponectin compared with the controls. Therefore, we conclude that YKL-40 and adiponectin are early inflammatory markers in diabetic subjects with low atherosclerotic background. Further studies with a large number of patients will be necessary in order to evaluate the usefulness of changes in YKL-40 and adiponectin concentrations in progressive atherosclerotic diabetic disease, as well as its potential role as predictor biomarker of vascular disease in T1D.

Abbreviations

T1D: type 1 diabetes mellitus; T2D: type 2 diabetes mellitus; CVD: cardiovascular disease; CIMT: common carotid artery intima media thickness; CAD: coronary artery disease; CHD: cardiac heart disease; CACS: coronary artery calcification; hsCRP: high sensitivity C-reactive protein; CT: computed tomography; BMI: body-mass; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; HbA_{1c}: glycated hemoglobin.

Authors' contributions

EA researched data, contributed to discussion, wrote the manuscript, and reviewed/edited the manuscript. ES, MLG, SP, IS, JLR, NA, BS, NA and DM researched data and reviewed the manuscript. MP-D contributed to discussion and reviewed/edited the manuscript. MP-D is the guarantor of this work and, as such, had full access to all data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Endocrinology and Nutrition Unit, Department of Medicine, Institute Research and Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Crta. Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain. ³ Biochemistry Unit, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain.

Acknowledgements

This study has been supported by a Grant "Ajut en la Recerca en Diabetis Gonçal Lloveras" from the Catalan Association of Diabetes. DM is supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III (No. PI12-00183). We thank the nursing staff of the Endocrinology Unit of Hospital Germans Trias i Pujol in Badalona (Maribel Cuadrado, Isabel Ordóñez and Carme Pérez) for their technical assistance. We thank also Nicki van Berckel from the editorial staff of the Journal of Hepatology for reviewing the English version of this manuscript.

Compliance with ethical guidelines

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 7 July 2015 Accepted: 10 September 2015

Published online: 18 September 2015

References

- Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin treated diabetes. *Diabetologia*. 2003;46:760–5.
- Dorman JS, Laporte RE, Kuller LH, et al. The Pittsburgh insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study: mortality results. *Diabetes*. 1984;33:271.
- Jarvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, Putto-Laurila A, Rontu R, Laine S, Lehtimäki T, Ronnema T, Viikari J, Raitakari OT. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation*. 2004;109:1750–5.
- Singh TP, Groehn H, Kazmers A. Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:661–5.
- Costacou T, Lopes-Virella MF, Zgibor JC, et al. Markers of endothelial dysfunction in the prediction of coronary artery disease in type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *J Diabetes Complicat*. 2005;19:183–93.
- Costacou T, Zgibor JC, Evans RW, et al. The prospective association between adiponectin and coronary artery disease among individuals with type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia*. 2005;48:41–8.
- Maahs DM, Ogden LG, Kinney GL, et al. Low plasma adiponectin levels predict progression of coronary artery calcification. *Circulation*. 2005;111:747–53.
- Wadwa RP, Kinney GL, Ogden L, et al. Soluble interleukin-2 receptor as a marker for progression of coronary artery calcification in type 1 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38:996–1003.
- Rathcke CN, Vestergaard H. YKL-40, a new inflammatory marker with relation to insulin resistance and with a role in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Inflamm Res*. 2006;55:221–7.
- Rathcke C, Vestergaard H. YKL-40 an emerging biomarker in cardiovascular disease and diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2009;23:8–61.
- Batinic K, Hobaus C, Grujicic M, Steffan A, Jelic F, Lorant D, Hortenhuber T, Hoellerl F, Brix JM, Scherthaner G, et al. YKL-40 is elevated in patients with peripheral arterial disease and diabetes or pre-diabetes. *Atherosclerosis*. 2012;222:557–63.
- Kim HM, Lee BW, Song YM, Kim WJ, Chang HJ, Choi DH, Yu HT, Kang ES, Cha BS, Lee HCC. Potential association between coronary artery disease and the inflammatory biomarker YKL-40 in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:84.
- Lin CH, Li HY, Jiang YD, Chang TJ, Chuang LM. Plasma YKL-40 predicts 10-year cardiovascular and all-cause mortality in individuals with type 2 diabetes. *Clin Endocrinol*. 2013;79(2):185–91.
- Batinic K, Höbaus C, Grujicic M, Steffan A, Jelic F, Lorant D, Hortenhuber T, Hoellerl F, Brix JM, Scherthaner G, Koppensteiner R, Scherthaner GH. YKL-40 is elevated in patients with peripheral arterial disease and diabetes or pre-diabetes. *Atherosclerosis*. 2012;222(2):557.
- Ma WH, Wang XL, Du YM, et al. Association between human cartilage glycoprotein 39 (YKL-40) and arterial stiffness in essential hypertension. *BMC Cardiovasc Disord*. 2012;29:12–35.
- Bakirci EM, Ünver E, Degirmenci H, et al. Serum YKL-40/chitinase 3-like protein 1 level is an independent predictor of atherosclerosis development in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Türk Kardiyol Dern Ars*. 2015;43:339–49.
- Kologlu T, Ucar SK, Levent E, et al. Chitotriosidase as a possible marker of clinically evidenced atherosclerosis in dyslipidemic children. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2014;27:701–8.
- Michelsen AE, Rathcke CN, Skjelland M, et al. Increased YKL-40 expression in patients with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010;211:589–95.
- Sakamoto F, Katakami N, Kaneto H, Yasuda T, Takahara M, Miyashita K, Kuroda A, Matsuhisa M, Kosugi K, Shimomura I. Association of serum YKL-40 levels with urinary albumin excretion rate in young Japanese patients with type 1 diabetes mellitus. *Endocr J*. 2013;60:73–9.

20. Rathcke CN, Persson F, Tarnow L, Rossing P, Vestergaard H. YKL-40, a marker of inflammation and endothelial dysfunction, is elevated in patients with type 1 diabetes and increases with levels of albuminuria. *Diabetes Care*. 2009;32:323–32.
21. Rønbjerg AK, Omerovic E, Vestergaard H. YKL-40 levels are independently associated with albuminuria in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10:54.
22. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, et al. Increased circulating and visceral adipose tissue expression levels of YKL-40 in obesity-associated type 2 diabetes are related to inflammation: Impact of conventional weight loss and gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:200–9.
23. Mathiasen AB, Harutyunyan MJ, Jorgensen E, Helqvist S, Ripa R, Gotze JP, Johansen JS, Kastrup J. Plasma YKL-40 in relation to the degree of coronary artery disease in patients with stable ischemic heart disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2011;71:439–47.
24. Fisman EZ, Tenenbaum A. Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease? *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:103.
25. Vinagre I, Sánchez-Quesada JL, Sánchez-Hernández J, et al. Inflammatory biomarkers in type 2 diabetic patients: effect of glycemic control and impact of LDL subfraction phenotype. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:34.
26. Forsblom C, Thomas MC, Moran J, Saraheimo M, Thorn L, Wadén J, Gordin D, Frystyk J, Flyvbjerg A, Groop PH, FinnDiane Study Group. Serum adiponectin concentration is a positive predictor of all-cause and cardiovascular mortality in type 1 diabetes. *J Int Med*. 2011;270:346–55.
27. Saraheimo M, Forsblom C, Fagerudd J, et al. Serum adiponectin is increased in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care*. 2005;28:1410–4.
28. Frystyk J, Tarnow L, Hansen TK, Parving HH, Flyvbjerg A. Increased serum adiponectin levels in type 1 diabetic patients with microvascular complications. *Diabetologia*. 2005;48:1911–8.
29. Forsblom C, Thomas MC, Moran J, et al. Serum adiponectin concentration is a positive predictor of all-cause and cardiovascular mortality in type 1 diabetes. *J Intern Med*. 2011;270:346–55.
30. Sherief EM, Amr NH, Adly AA, et al. Do children with type 1 diabetes have a relation between adiponectin level and vascular complications? *Pediatr Endocrinol Rev*. 2014;11:383–9.
31. Aguilera E, Serra E, Granada ML, Alonso N, Pellitero S, Pizarro E, Reverter J, Salinas I, Soldevila B, Mauricio D, Puig-Domingo M. Low prevalence of subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with type 1 diabetes mellitus in a European Mediterranean population. *Diabetes Care*. 2014;37:814–20.
32. Shaw LJ, Raggi P, Schisterman E, Berman DS, Callister TC. Prognostic value of cardiac risk factors and coronary artery calcium screening for all cause mortality. *Radiology*. 2003;228:826–33.

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



5.4 QUART ESTUDI

Títol:

Low prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 1 diabetes is associated with decreased subclinical CV disease.

La baixa prevalença de malaltia del fetge gras no alcohòlic en pacients amb diabetis tipus 1 s'associa a una reduïda prevalença de la malaltia CV subclínica.

Autors:

Serra-Planas E, Aguilera E, Castro L, Rodríguez R, Salinas I, Lucas A, Joaquín C, Puig R, Mauricio D, Puig-Domingo M

Revista:

*J Diabetes. 2017 Dec;9(12):1065-1072*¹⁸¹

Factor d'impacte 2017:

3.21 (Quartil 2)

VERSIÓ POST-PRINT

**LOW PREVALENCE OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE IN PATIENTS
WITH TYPE 1 DIABETES IS ASSOCIATED WITH DECREASED SUBCLINICAL
CARDIOVASCULAR DISEASE**

Highlights

- Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been associated with cardiovascular disease.
- Mediterranean type 1 diabetes (T1D) patients have a low prevalence of NAFLD, and T1D patients exhibit a low prevalence of subclinical atherosclerosis.
- There is a relationship between NAFLD and subclinical cardiovascular disease even in a Mediterranean area.

Enric SERRA-PLANAS,¹ Eva AGUILERA,² Laura CASTRO,³ Raúl RODRÍGUEZ,³ Isabel SALINAS,¹ Anna LUCAS,² Clara JOAQUÍN,¹ Rocio PUIG,¹ Dídac MAURICIO² and Manel PUIG-DOMINGO²

1. Department of Endocrinology and Nutrition, Health Sciences Research Institute and University Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain
2. Department of Endocrinology and Nutrition, CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Health Sciences Research Institute and University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain
3. Service of Radiology, Institute of Research and Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

Abstract

Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been proposed as an independent cardiovascular risk factor. The present study evaluated the prevalence of NAFLD in a cohort of type 1 diabetic (T1D) patients and its potential relationship with subclinical cardiovascular disease (CVD).

Methods: One hundred T1D patients (mean [\pm SD] age 39.4 ± 7.8 years, disease duration [\pm SD] 21.7 ± 8.6 years) were included in the present cross-sectional study. All subjects underwent abdominal ultrasonography for detection of NAFLD, carotid ultrasonography to measure the carotid intima–media thickness (CIMT) and atheroma plaques, and cardiac tomography for evaluation of the coronary artery calcium score (CACS).

Results: Of the study cohort, 12% had NAFLD and 23% had a CACS >0 . The T1D subjects with NAFLD had a greater CIMT than those without NAFLD (0.65 ± 0.17 vs 0.55 ± 0.14 mm; $P = 0.029$), but there were no significant differences between the two groups with regard to CACS, glycemic control or the presence of carotid plaques. Patients with high liver enzyme concentrations (>20 U/L) had a higher CIMT (0.60 ± 0.16 vs 0.54 ± 0.13 ; $P = 0.04$) and there was a higher proportion of altered CACS (17 [73.9%] vs 6 [26.1%]; $P = 0.001$) and detection of carotid plaques (10 [76.9%] vs 3 [23.1%]; $P = 0.014$) in this group.

Conclusions: A low prevalence of NAFLD was found in the T1D cohort that was associated globally with a low proportion of abnormal CVD imaging markers, although these imaging parameters were worse in subjects in whom NAFLD was detected.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease, subclinical atherosclerosis, transaminases, type 1 diabetes.

Introduction

Different studies have reported an approximate 10 to 40% of prevalence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the general population¹. The prevalence of NAFLD has been reported to be increased in obesity, type 1 diabetes (T1D), and type 2 diabetes (T2D), as well as in patients with hyperlipidemia.¹⁻³ All these conditions encompass white adipose tissue disturbances leading to increased insulin resistance driven by excess production of proinflammatory factors like interleukin-6 and tumor necrosis factor- α , among others. The resulting resistance to insulin action enhances lipolysis, usually inhibited by insulin, stimulating the release of free fatty acids (FFA) and increasing FFA portal flux, the principal component of fatty accumulation in NAFLD. Other factors, like enhanced hepatic glycogenesis and lipogenesis, as well as excessive chylomicrons from the diet, can also contribute to NAFLD development.⁴

There is a complex interrelationship between NAFLD, insulin resistance, metabolic syndrome (MS), and cardiovascular disease (CVD), with CVD being causally related to the former conditions.⁵ Non-alcoholic fatty liver disease itself could be considered either the cause or the effect of systemic chronic inflammation,⁶⁻⁷ which promotes endothelial dysfunction, enhanced penetration of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) particles into the arterial intima, cellular proliferation, and LDL-C uptake by macrophages, the main mechanisms of atherosclerosis.⁸

Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with T2D. Individuals with T2D have a higher risk of developing NAFLD, its necro-inflammatory evolutionary form (i.e. non-alcoholic steatohepatitis), and its disease progressive forms (i.e. hepatic fibrosis and cirrhosis).⁹ Some studies have found an association between the increased prevalence of CVD, chronic kidney disease, and retinopathy in T2D patients with NAFLD compared with subjects without NAFLD.^{10,11} Moreover, NAFLD has been independently associated with subclinical CVD, measured as carotid intima-media thickness (CIMT) and the calcium artery calcification score (CACS), in T2D patients,¹² although others did not find this association.¹³

There is little information about the prevalence of NAFLD in T1D. Some studies have detected a high prevalence of NAFLD in T1D,^{14–16} near to 50%. Nevertheless, other studies have found a lower prevalence, not higher than 10%.^{17,18} The high prevalence of NAFLD in T1D could be explained by the growing coexistence of MS and T1D, so-called “double diabetes”,¹⁹ which is related to intensive insulin treatment and the increase in obesity in T1D subjects, as in the general population.²⁰ The presence of NAFLD in T1D appears to be independently associated with macrovascular¹⁵ and microvascular chronic complications.^{16,21,22} In addition, some authors have found an association between liver enzyme concentrations and the presence of microvascular and macrovascular complications.^{23,24}

As far as we know, few data are available regarding the possible association of NAFLD with subclinical CVD in T1D. The aim of the present cross-sectional study was to evaluate the prevalence of NAFLD in a Mediterranean T1D patient cohort with long disease duration and no clinical manifestations of ischemic or macrovascular heart disease, and the potential relationship between the presence of NAFLD and both subclinical CVD and microangiopathy.

Methods

Patients and controls

The present study was performed on 100 asymptomatic T1D subjects followed-up at the outpatient clinic of Germans Trias University Hospital (Badalona, Spain) between 2010 and 2012. The presence of subclinical atherosclerosis was evaluated in this cohort, as described previously,²⁵ and all participants also underwent liver ultrasound evaluation.

Inclusion criteria were age between 20 and 50 years and disease duration >10 years. Exclusion criteria were a previous history of clinical macrovascular or cardiac heart disease, primary hepatic diseases, or excessive alcohol consumption, defined as >30 g/day in males and >20 g/day in females. Alcohol intake was determined by anamnesis during the collection of demographic information. Current smokers and those who had smoked previously any time in the past 5 years were included in the same category.

All patients had been treated with an intensive insulin regimen from diagnosis, and 15% were using pump devices.

Age, sex, diabetic complications (macrovascular and microvascular), family history of early CVD (first relatives, before 55 years of age in men and 65 years of age in women), medications (antihypertensives, statins, and antiplatelet), weight, height, body mass index (BMI), demographic, and clinical data were recorded for each participant. Clinical parameters (age, sex, height, weight, BMI, blood pressure, smoking habit, and family history) were evaluated and registered by trained personnel. Grade 2 overweight was defined as a BMI greater than 27 kg/m².²⁶

Diabetic nephropathy was classified as microalbuminuria in the range 30–300 mg albumin/24 h and proteinuria as >300 mg albumin /24h. Urinary albumin excretion <30 mg/24 h was considered normal. All results were confirmed on at least two of three consecutive determinations.

A diabetes-specialized ophthalmologic team performed periodic funduscopy studies to investigate the presence of diabetic retinopathy.

This study was approved by the local Ethics Committee of Germans Trias University Hospital and was performed in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2008. Informed consent was obtained from all participants at the time of their inclusion in the study.

Biochemical measurements

Blood samples were drawn by venipuncture at between 0800 and 0830 hours after an overnight fast. Plasma glucose, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), LDL-C, triglycerides (TG), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), and γ -glutamyl transpeptidase (GGT) were measured by routine clinical chemistry immediately after collection of blood samples.

The concentration of HbA1c was determined in blood samples with EDTA using HPLC on a fully automated Adams Menarini HI-AUTO A1c 8160 analyzer manufactured (Arkray, Kyoto,

Japan). The interassay coefficients of variation were 1.8% and 1.5% for HbA1c levels of 4.8% and 9.0%, respectively (reference range: 4%–5.8%). This method is a cation-exchange HPLC method certified by the NGSP of tracking to the Diabetes Control and Complications Trial reference method²⁷. Mean HbA1c was calculated as an average of three determinations in the previous year before a subject's inclusion in the present study.

Evaluation of hepatic fatty accumulation

Two experienced radiologists blinded to participants' clinical characteristics performed all ultrasound examinations. Ultrasonography was performed using Siemens Acuson S2000 (Mountain View, CA 94043, USA) ultrasound equipment and a multifrequency convex transducer (4 MHz). Hepatic steatosis was diagnosed after acquisition of seven standard liver slices: two slices of the left hepatic lobe and two slices of the right hepatic lobe, including the diaphragm and the cortex of the right kidney, one slice of the portal bifurcation and hepatic veins, one slice of the hepatic ileus, and one slice of the gallbladder. The intra- and interobserver variabilities for the ultrasound diagnosis of hepatic steatosis were within 5%.

The presence and grade of NAFLD, classified as mild, moderate or severe²⁸, was determined in every patient. The sonographic criteria included hepatic parenchymal echogenicity greater than the renal cortex, attenuation of the ultrasound wave, and a poor definition of the diaphragm and intrahepatic vessels.³¹

Evaluation of subclinical atherosclerosis

All patients underwent computed tomography to quantify CACS, using 16-slice high-resolution computed tomography, electrocardiogram-gated and with retrospective reconstruction (SOMATOM Sensation 16 (Hesse, Germany, EU); with Syngo Calcium Scoring software (Forchheim, Germany, EU) for analysis and calcium calcification). In the present study, CACS was defined as a dense area in the coronary artery over the threshold of 130 Hounsfield units. A total Agatston score was calculated for each patient. The results were provided according to the

classification reported previously by Shaw et al.³² and were dichotomized, with those greater than zero categorized as positive and those equal to zero categorized as negative.

In the same way, a carotid ultrasound (CU) was performed to determine CIMT in all participants. Ultrasonography images were obtained using high-resolution B-mode ultrasound equipment (Acuson Sequoia 512; Siemens) with an electric linear array 5-13 MHz transducer. The CIMT was calculated as the median thickness of determinations of the left and right internal carotid arteries, common carotid artery, and bifurcation. In addition, the number and characteristics of any plaques were determined.

Computed tomography images and CU were acquired and evaluated by a single trained radiologist.

Statistical analysis

Continuous variables are expressed the mean \pm SD or as median values with the interquartile range (IQR); categorical variables are expressed as frequency and/or percentage. The significance of differences between groups was determined using Student's *t*-test or the non-parametric Mann-Whitney *U*-test, as appropriate. Two-tailed $P < 0.05$ was considered significant. Categorical variables were compared using a χ^2 test. Correlation analyses between continuous variables were performed using Spearman correlation. In addition, univariate and multivariate conditional logistic regression analyses were performed. Finally, multivariate regression analyses with backward elimination were performed including age, sex, BMI, HbA1c, GOT, GPT, GGT, and CIMT to identify independent variables associated with NAFLD. All statistical analyses were performed using SPSS version 17 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

The clinical and biochemical characteristics of the entire study sample are given in Table 1.

Table 1 Clinical and biochemical characteristics according to the presence (+) or absence (-) of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

	NAFLD+	NAFLD-	P-value
No. subjects (%)	12 (12)	88 (88)	–
Age (years)	43.3 ± 9.0	38.9 ± 7.6	NS
No. (%) men/women	8/4 (67/33)	46/42 (52/48)	NS
BMI (kg/m²)	26.6 ± 4.5	24.7 ± 3.0	NS
SBP (mmHg)	120.8 ± 22.4	116.5 ± 12.4	NS
DBP (mmHg)	74.7 ± 9.1	70.8 ± 7.3	NS
HbA1c			
%	8.4 ± 1.2	8.0 ± 1.0	NS
mmol/mol	66.6 ± 9.5	63.4 ± 7.9	NS
Diabetes duration (years)	21.6 ± 8.2	21.7 ± 1.7	NS
TC (mg/dL)	181.8 ± 17.8	179.5 ± 24.2	NS
HDL (mg/dL)	55.2 ± 13.6	60.8 ± 14.9	NS
LDL (mg/dL)	103.2 ± 20.8	102.3 ± 21.3	NS
TG (mg/dL)	77.0 [62.0–129.0]	61.5 [46.0–84.3]	0.02
GOT (U/L)	18.0 [15.0–23.0]	18.0 [16.0–23.0]	NS
GPT (U/L)	20.0 [13.0–25.8]	18.0 [14.0–25.0]	NS
GGT (U/L)	17.5 [11.3–39.8]	14.0 [11.0–22.0]	NS
GOT >20 U/L	5 (41.7)	35 (39.8)	NS
GPT >20 U/L	6 (50.0)	36 (40.9)	NS
GGT >20 U/L	6 (50.0)	25 (28.4)	NS
Calcium score ≥1 AU	5 (41.7)	18 (20.5)	NS
Smoking habit	6 (50.0)	31 (35.2)	NS
Retinopathy	3 (25.0)	28 (31.8)	NS
Nephropathy	0 (0.0)	15 (17.0)	NS
Medications			
Statins (%)	58	27	0.04
Antihypertensives (%)	17	25	NS
Salicylate (%)	17	17	NS

Unless indicated otherwise, data are given as *n* (%), mean ± SD, or as median values [interquartile range], as appropriate.

BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; TC, total cholesterol; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; TG, triglycerides; GOT,

glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; GGT, γ -glutamyl transpeptidase; AU, Agatston units.

Hepatic evaluation

Following ultrasonography, 12 of 100 T1D patients were found to have evidence of NAFLD (prevalence 12%). Comparing T1D patients with and without NAFLD, those with NAFLD had higher, albeit still within the normal range, TG concentrations (median 77.0 [IQR 62.0–129.0] vs 61.5 [46.0–84.3] mg/dL; $P = 0.02$) and an increased proportion of these patients were on statin treatment (58.3% vs 27.3%; $P = 0.012$). There were no differences between the two groups in terms of age, gender, disease duration, BMI, and smoking status (Table 1). In addition, there were no differences detected in microalbuminuria, HbA1c, cholesterol, or transaminases concentrations, expressed as continuous or categorical variables (Table 1).

When overweight was considered, there was an increased prevalence of Grade 2 overweight in the group with hepatic steatosis compared with the non-NAFLD group (50% vs 13.8%, respectively; $P = 0.002$).

Subclinical atherosclerosis

Carotid ultrasonography

Across the entire sample, mean CIMT was 0.54 ± 0.15 mm, and 17 subjects had carotid plaques (17%).

Coronary calcification

23% of the entire sample had a calcium score >0 . In subjects with a calcium score >0 , the prevalence of CACS >0 AU was greater for subjects with an BMI >30 kg/m² than non-obese subjects (17.4% vs 3.9%, respectively; $P = 0.049$), although the overall number of individuals with CACS >0 AU was low, indicating a low degree of CVD in this cohort.

Association between NAFLD and subclinical CVD

Although the overall prevalence of NAFLD was low in the present cohort of T1D patients, those with NAFLD had a significantly higher CIMT than non-NAFLD T1D patients (0.65 ± 0.17 vs 0.55 ± 0.14 mm, respectively; $P = 0.029$). Regarding to the severity degree of NAFLD, only one of the patients had a moderate degree of NAFLD and the other 11 were all classified as mild NAFLD. The only patient with moderate degree NAFLD had a CACS score of 0 and had a mean CIMT of 0.60 mm.

No differences were detected between the NAFLD and non-NAFLD groups regarding the existence of plaques (three (11%) vs 10 (25%) patients, respectively; $P = 0.19$). Although the proportion of subjects with altered CACS was twofold greater in the NAFLD than non-NAFLD group, this difference was did not reach statistical significance (41.7% vs 20.5%, respectively; $P = 0.101$). No differences regarding age or smoking habit were detected between the two groups (Table 2).

Table 2 Cardiovascular data according to the presence (+) or absence (–) of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

	NAFLD+	NAFLD–	<i>P</i> -value
CIMT (mm)	0.66 ± 0.17	0.55 ± 0.14	0.03
Calcium score ≥ 1 AU ($n = 27$)	5 (41.7)	18 (20.5)	0.001
Plaques ($n = 17$)	3 (25.0)	10 (11.4)	NS

Data are given as n (%) or as the mean \pm SD, as appropriate.

CIMT, carotid intima–media thickness; AU, Agatston units.

Association between NAFLD and diabetic microangiopathy

There was no significant difference in the prevalence of microvascular complications between the NAFLD and non-NAFLD groups. As indicated in Table 1, the proportion of subjects with retinopathy and nephropathy in the two groups were similar, with no statistically significant differences.

Association between transaminase concentrations and subclinical CVD

Investigations of transaminases confirmed an association between enzyme concentrations and subclinical CVD parameters, such as CACS or CIMT. Those T1D patients with a concentration of GOT >20 U/L had an increased CIMT compared with subjects with GOT ≤20 U/L (0.60 ± 0.16 vs 0.54 ± 0.13 , respectively; $P = 0.03$). Similar results were obtained when looking at GPT and GGT concentrations (Table 3).

Table 3 Cardiovascular data according to transaminases concentrations

	CIMT (mm)	Calcium score ≥1 AU (<i>n</i> = 23)	Plaques (<i>n</i> = 13)
GOT (U/L)			
≤20	0.54 ± 0.13	9 (39.1%)	5 (38.5%)
>20	0.60 ± 0.16	14 (60.9%)	8 (61.5%)
P-value	0.03	0.009	NS
GPT (U/L)			
≤20	0.54 ± 0.13	6 (26.1%)	3 (23.1%)
>20	0.60 ± 0.16	17 (73.9%)	10 (76.9%)
P-value	0.04	0.001	0.014
GGT (U/L)			
≤20	0.54 ± 0.13	10 (43.5%)	5 (38.5%)
>20	0.61 ± 0.16	13 (56.5%)	8 (61.5%)
P-value	0.02	NS	0.014

Data are given as *n* (%) or as the mean ± SD, as appropriate.

GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; GGT, γ -glutamyl transpeptidase; AU, Agatston units.

In order to establish the possible contribution of NAFLD to CIMT, linear regression analysis with backward elimination was performed to identify those factors independently associated with CIMT. The initial model included sex, smoking, statin treatment, antihypertensive medication, age, BMI, and the presence of NAFLD.

After elimination of confounders, the final model included age, BMI, and NAFLD ($R^2 = 0.28$; Table 4). In addition, linear regression analysis was performed only in male patients, and in this analysis the final model included the same variables, namely age, BMI, and NAFLD ($R^2 = 0.34$).

Table 4 Results of linear regression analysis

Variable	β	<i>P</i> -value	95% CI
Age	0.420	0.000	0.004, 0.011
Non-alcoholic fatty liver disease	0.108	0.247	-0.033, 0.126
Body mass index	0.191	0.042	0.000, 0.016

CI, confidence interval.

Discussion

The main finding of the present study is the low prevalence of NAFLD in long-standing T1D in association with a low prevalence of subclinical CVD; however, even with these low rates, the results suggest that NAFLD is associated with subclinical CVD.

The prevalence of NAFLD in the present study, performed on a cohort of middle-aged Mediterranean T1D subjects, was intermediate compared with prevalence reported in previous studies.^{14–16,18} In the present cohort, NAFLD was also associated with Grade 2 overweight, higher TG concentrations, and a higher proportion of statin treatment. Statistical analysis suggested that the presence of NAFLD was associated with higher CIMT, which indicates that systematic screening for NAFLD in T1D may be useful for the identification of subjects at risk not only for further hepatic disease, but also subclinical CVD.

In relation to NAFLD in the general Spanish population, few studies are available. In 2000, Parés et al.³³ reported a 13.8% of prevalence of NAFLD among 1713 male health workers, as determined using abdominal ultrasonography. In that study, obesity, alcohol consumption, age, and elevated values of glycemia were factors associated with NAFLD. Later on, in 2010, using hepatic

echography the same group evaluated the presence of NAFLD in a cross-sectional study with 198 participants, detecting a prevalence of 25.8%.³⁴

Focusing in on the T1D population and compared with French data from 128 T1D patients obtained using magnetic resonance imaging (MRI),¹⁸ there was a threefold higher proportion of steatosis in the present cohort. In contrast, Targher et al.,¹⁶ studying a cohort with a similar gender proportion, BMI, age, disease duration, and comparable glycemic control in Italy, found a prevalence of NAFLD of 50%. Only two factors may explain such large differences: (i) technical aspects at the time of identification of fatty liver content, because ultrasonography is an operator-dependent technique, although this seems unlikely; and (ii) factors related to the environment, such as dietary issues and endocrine disruptors, although the general diets in Spain, Italy, and France, despite some differences, do not differ excessively.

A major finding of the present study is that CIMT was significantly greater in the NAFLD compared with non-NAFLD group. To the best of our knowledge, no other studies have evaluated subclinical CVD by measuring CIMT in T1D subjects according to the presence of hepatic steatosis. Some studies have shown a similar association between NAFLD and early atherosclerosis at the carotid level in T2D patients,¹² but this has not yet been reported in T1D. The low prevalence of subclinical coronary disease in the present cohort, with only 23% of the CACS values higher than 1 UA, could explain the lack of association with NAFLD.

In non-diabetic subjects, NAFLD has been strongly associated with CVD;⁷ thus, it is not unexpected that high cardiovascular mortality observed in most T1D series²⁵ would also be related to the presence of NAFLD. In fact, classic cardiovascular risk factors do not explain the excess mortality found in T1D, and therefore other causal elements are likely and NAFLD possibly being one of them. In the present study, the CIMT in T1D was higher than the CIMT reported previously for control non-diabetic subjects,²⁵ indicating that deterioration of the arterial wall is accelerated in T1D patients. Moreover, T1D subjects with NAFLD have even higher CIMT, indicating that more aggressive deterioration of the vessels is occurring when both conditions (T1D and NAFLD) are

present in the same patient. The higher proportion of altered CACS in the NAFLD group compared with non-diabetic subjects²⁵ support this hypothesis.

In the present cohort of T1D patients, abdominal ultrasonography detected a 12% prevalence of NAFLD. There were no significant differences between the NAFLD and non-NAFLD groups in terms of age, gender, BMI, or smoking status. Nor were there any differences between the two groups with regard to disease duration, metabolic control, or chronic complications. In the NAFLD group, higher TG concentrations were detected and there was an increased prevalence of Grade 2 overweight and a higher proportion of statin prescriptions. Nevertheless, the regression analysis of the potential confounders showed that NAFLD was not independently associated with subclinical CVD. According to the findings of a recent Italian prospective study,²⁹ in which 286 T1D subjects were followed over a period of 5 years and 52% had NAFLD, this condition was an independent predictor of the development of incident CVD. This is a very important study that prospectively confirms the importance of and the pathogenic link between NAFLD and cardiovascular damage. In that Italian study,²⁹ mean subject age and duration of diabetes were similar to those in the present study (43 ± 14 and 17 years, respectively), but the prevalence of NAFLD in the present study was one-fifth that in the Italian study. Even with this low prevalence, univariate analysis revealed a positive association between NAFLD and subclinical CVD and thus the lack of an independent association in the regression analysis may be due to the low prevalence of NAFLD and subclinical CVD in the present study. The aforementioned protective factors that are active in our population (intensive glycemic treatment, use of cardiovascular protective drugs, geographical area with a low prevalence of CVD, Mediterranean diet and lifestyle, genetic background...) may also act to attenuate the pathogenic mechanisms of NAFLD acting at the cardiovascular level.

Transaminase concentrations were also associated with early atherosclerosis in the present cohort. As reported by others,^{23,24} serum concentrations of transaminases may be associated with microvascular and macrovascular disease in diabetes. In T1D, GGT concentrations were higher in patients with retinopathy, but even higher in those with proliferative retinopathy.²⁴ Diabetic retinopathy has been proposed as predictor of cardiovascular events;³⁰ in that case, the results of the

present study linking transaminase concentrations with altered CACS and greater CIMT as markers of subclinical CVD, could have biological plausibility. The link between CACS and both GOT and GPT, as well as between GGT and CIMT, remained consistent, even after removal of those patients under statin therapy from the analysis. With regard to the association between NAFLD and diabetic microangiopathy in the present cohort, we did not detect any results supporting such a link; the proportion of retinopathy was similar in the NAFLD and non-NAFLD groups (31.8% vs 25%, respectively; $P = 1.0$). Conversely, all patients with nephropathy were in the non-NAFLD group (17%) and none was in the group with steatosis ($P = 0.2$). This result is likely explained by the low prevalence of NAFLD in the present cohort. Finally, no association was detected between microangiopathy and GOT, GPT, and GGT concentrations.

The present study has some limitations. First, the present study was a cross-sectional study and, thus, it is not possible to establish causality. Assessment of alcohol intake was limited to anamnesis, without a specific questionnaire evaluating this matter. However, it is unlikely that this would have affected the results taking into account the low prevalence of hepatic steatosis detected. Although biopsy is the gold standard for diagnosing NAFLD, we assessed the presence of steatosis by ultrasonography. This method has limitations when compared with other imaging techniques, such as MRI, but is the most used non-invasive method for studying liver diseases through imaging techniques and readily useful in clinical practice. Moreover, the variability of ultrasonography in the present study was similar to reports in the literature,¹⁵ of approximately 5%, which corresponds to what is usually found among highly expert radiologists.

In summary, the present study supports the relationship between NAFLD and subclinical CVD, even in a geographical area such as Spain, which has a low prevalence of CVD among both the general population and T1D subjects. This is of relevance for a better categorization and identification of T1D subjects at risk of early atherosclerosis in order to initiate the best protective cardiovascular treatment and prevent excess cardiovascular mortality in this population.

Acknowledgements

This study was supported by the grant “Ajut en la Recerca en Diabetis Gonçal Lloveras” from the Catalan Association of Diabetes. DM was supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III (PI12–00183). The authors thank the nursing staff of the Endocrinology Unit of the Hospital Germans Trias i Pujol in Badalona (M. Cuadrado, I. Ordoñez, and C. Perez) for their technical assistance. The authors also thank N. van Berckel, from the editorial staff of the *Journal of Hepatology*, for reviewing the English version of the manuscript and S. Bertran for assistance with statistical analysis. Biomedical Research Centers in Network (CIBER) of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM) is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (Plan Nacional de I+D+I and Fondo Europeo de Desarrollo Regional [FEDER]).

Disclosure

No potential conflicts of interest relevant to this article are reported.

References

1. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 2002; 346: 1221-1231.
2. Prashanth M, Ganesh HK, Vimal MV et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Assoc Physicians India*.. 2009; 57: 205-10
3. Regnell S, Lernmark Å. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud* 2011 8:454–467.
4. Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: A novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:27–38.
5. Rahimi RS, Landaverde L. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: Clinical implications and treatment. *Nutr Clin Pract* 2013; 28:40-51
6. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1343–1351.
7. Targher G, Day C, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010; 363(14):1341-50
8. Tarantino G, Caputi A. JNKs, insulin resistance and inflammation: A possible link between NAFLD and coronary artery disease. *World J Gastroenterol*, 2011; 17: 3785–3794.
9. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009; Jan-Mar; 13(1): 9–19.

10. Targher G, Bertolini L, Padovani R et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30:1212–1218.
11. Targher G, Bertolini L, Rodella S et al. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and proliferative/laser-treated retinopathy in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2008, 51:444–450.
12. Cakir E, Ozbek M, Colak N, Cakal E, Delibasi T. Is NAFLD an independent risk factor for increased IMT in T2DM? *Minerva Endocrinol* 2012;37:187–93.
13. Petit J, Guiu B, Terriat B, Loffroy R, Robi I, Petit V et al. Nonalcoholic fatty liver is not associated with carotid intima–media thickness in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94:4103–4106.
14. Vendhan R, Amutha A, Anjana R et al. Clinical profile of nonalcoholic fatty liver disease among young patients with type 1 diabetes mellitus seen at a diabetes speciality center in India. *Endocr Pract.* 2014;20:1249–57.
15. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Pichiri I et al. Prevalence of non-alcoholic fatty disease and its association with cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *Journal of Hepatology* 2010; 53: 713–718.
16. Targher G, Mantovani A, Pichiri I, Mingolla L, Cavalieri V, Mantovani W et al. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of chronic kidney disease in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2014;37:1729–1736.
17. Al-Hussaini AA, Sulaiman NM, Alzahrani MD, Alenizi AS, Khan M. Prevalence of hepatopathy in type 1 diabetic children. *BMC Pediatrics* 2012, 12:160.
18. Petit J, Pedro L, Guiu B, Duvillard L, Bouillet B, Jooste V et al. Type 1 diabetes is not associated with an increased prevalence of hepatic steatosis. *Diabet Med.* 2015; Dec;32(12):1648-51
19. Chillarón J, Flores-Le-Roux JA, Goday A, Benaiges D, Carrera MJ, Puig J et al. Metabolic syndrome and type-1 diabetes mellitus: Prevalence and associated factors. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63:423–9 [Article in Spanish].
20. Kilpatrick E, Rigby A, Atkin S. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes. “Double diabetes” in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 2007; 30:707–12.
21. Targher G, Bertolini L, Chonchol M, Rodella S, Zoppini G, Lippi G et al. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and retinopathy in type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 2010, 53:1341–1348.
22. Targher G, Pichiri I, Zoppini G, Trombetta M, Bonora E. Increased prevalence of chronic kidney disease in patients with type 1 diabetes and non-alcoholic fatty liver. *Diabet. Med.* 2012; 29: 220–226.
23. Monami M, Balzi D, Lamanna C, Melani C, Cocca C, Lotti E et al. Prognostic value of serum liver enzymes levels in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007; 23:625–630.
24. Arkkila PE, Koskinen PJ, Kantola IM, Rönnemaa T, Seppänen E, Viikari JS. Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type 1 diabetes.

- Diabetes Research and Clinical Practice 2001; 52: 113–118.
25. Aguilera E, Serra-Planas E, Granada ML, Alonso N, Pellitero S, Pizarro E et al. Low prevalence of subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with type 1 diabetes mellitus in a European Mediterranean population. *Diabetes Care* 2014; 37:814–820.
 26. SEEDO'2000 consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of criteria for therapeutic intervention. Sociedad Española para el estudio de la Obesidad. *Med Clin (Barc)* 2000;115:587-97
 27. Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB, National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) Steering Committee Status of hemoglobin A1c measurement and goals for improvement: from chaos to order for improving diabetes care. *Clin Chem* 2011;57:205–214
 28. Rumack CM. Diagnostic Ultrasound. In: Rumack CM, editor. 2nd ed. St Louis: Mosby-Yearbook; 1998. pp. 110–112
 29. Mantovani A, Mingolla L, Rigolon R, Pichiri I, Cavalieri V, Zoppini G et al. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular disease in adult patients with type 1 diabetes. *Int J Cardiol.* 2016;225:387–391.
 30. Kramer CK, Rodrigues TC, Canani LH, Gross JL, Azaverdo MJ. Diabetes retinopathy predicts all-cause mortality and cardiovascular events in both type 1 and 2 diabetes: Meta-analysis of observational studies. *Diabetes care*, 2011; 34:1238–44.
 31. Hamer OW, Aguirre DA, Casola G, Lavine JE, Woenckhaus M, Sirlin CB. Fatty liver: Imaging patterns and pitfalls. *Radiographics* 2006;26:1637–1653.
 32. Shaw LJ, Raggi P, Schisterman E, Berman DS, Callister TQ. Prognostic value of cardiac risk factors and coronary artery calcium screening for all-cause mortality. *Radiology* 2003;228:826–833.
 33. Parés A, Tresserras R, Núñez I, Cerralbo M, Plana P, Massip J et al. Prevalence and factors associated to the presence of fatty liver in apparently healthy adult men. *Med Clin (Barc)*. 2000;114:561–5.
 34. Caballería L, Pera G, Auladell MA, Torán P, Muñoz D, Alumà A et al. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010;22:24–32.

6. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

En el primer dels estudis d'aquest treball de tesi¹⁷⁸ es va avaluar l'estatus vascular dels pacients amb DM1 de la nostra àrea amb la realització d'una TC amb quantificació del CACs i d'una ecografia carotídia amb la mesura del GIMC. Respecte les característiques basals dels 150 pacients amb DM1 a estudi existia una lleu majoria d'homes (58%), una edat mitja de $38,6 \pm 8,1$ anys, un elevat temps d'evolució de la diabetis amb $20,4 \pm 8,1$ anys, un control glucèmic amb una HbA1c mitja de $8,1 \pm 2,3\%$ i un 52% de no fumadors. El 26% i el 9% dels pacients presentaven retinopatia i nefropatia respectivament.

La gran majoria de la mostra demostrà un valor de CACs negatiu o de 0 UA (82% vs 92%, en els no diabètics), essent la diferència observada no significativa. Els pacients amb DM1 presentaren un major GIMC ($0,55 \pm 0,14$ vs $0,48 \pm 0,14$ mm, $p < 0,01$) i una similar proporció de presència de plaques d'ateroma que el grup control (11 vs 8%, $p =$ no significatiu (ns)).

Dotze pacients de la mostra (9%) presentaven nefropatia diabètica i, en aquest subgrup, es detectaren cinc valors de CACs > 50 UA i un valor mig de GIMC major que els pacients amb DM1 sense nefropatia diabètica ($0,59 \pm 0,14$ vs $0,54 \pm 0,14$ mm, $p < 0,08$). Aquesta associació no es comprovà amb la retinopatia diabètica. Els factors independentment associats al CACs i detectats en l'estudi multivariant foren la durada de la diabetis, el tractament amb estatines i el GIMC ($R^2 = 0,44$) i en tots els models, es detectà una correlació entre GIMC i CACs ($\beta = 6,87$, $p < 0,001$).

En el **segon** estudi publicat¹⁷⁹ es van avaluar les concentracions de 25OHD, tant dels pacients com dels controls sans, per correlacionar-ne els resultats amb les proves de diagnosi de MCV subclínica. Els pacients amb DM1 presentaren una menor concentració mitja de 25OHD corregida per l'època de l'any d'extracció de la mostra ($22,72 \pm 9,11$ vs $26,63 \pm 9,56$ ng/mL, $p = 0,018$) i una major prevalença de deficiència respecte els controls no diabètics (43,2% vs 21,7%, $p = 0,03$). Els homes, els fumadors i aquells pacients amb una major durada de la diabetis presentaven concentracions menors de la vitamina. Es realitzà un test d'exposició solar i, la seva puntuació es va correlacionar significativament amb les concentracions de 25OHD ($r_s = 0,152$, $p = 0,023$).

Tot i detectar-se un major GIMC mig entre els pacients amb DM1 ($0,55 \pm 0,14$ vs $0,48 \pm 0,14$ mm, en els controls, $p < 0,01$) i 24 pacients amb un CACs > 0 UA, no es demostraren correlacions significatives entre les concentracions de 25OHD ni amb el CACs ni amb el GIMC. El

tercer dels estudis¹⁸⁰ es basava en l'anàlisi de determinats marcadors inflamatoris sèrics dels pacients inclosos en la mostra. Els pacients amb DM1 demostraren unes concentracions incrementades tant d'adiponectina ($15,8 \pm 9,1$ vs $12,4 \pm 5,3$ mg/mL, $p = 0,008$) com d'YKL-40 ($42,6$ (10,4–195,0) vs $\pm 28,7$ (11,0–51,2) ng/mL, $p = 0,001$). Els altres paràmetres mesurats (IL 6, IL 1 β , TNF α , PCR-as i homocisteïna) no presentaren diferències entre els grups.

Aquells pacients amb microalbuminúria (9%, 12 pacients), presentaven concentracions majors d'adiponectina que aquells pacients sense nefropatia ($21,84 \pm 8,15$ vs $14,88 \pm 8,27$ mg/mL, $p = 0,008$) sense observar-se aquesta relació amb la retinopatia diabètica. En canvi, pel què fa a les concentracions d'YKL-40 o altres biomarcadors (TNF- α , IL-6, IL-1 β), no s'establí cap associació amb la presència o absència de retinopatia o nefropatia.

Respecte les variables de l'estudi de l'arterioesclerosi precoç, ni les concentracions d'YKL-40 ni les d'adiponectina correlacionaren amb la mesura de CACs ni de GIMC.

El **quart**¹⁸¹ i darrer estudi d'aquest treball de tesi es va centrar en la caracterització analítica i ecogràfica de l'estat hepàtic de 100 pacients amb DM1 provinents de la mostra original. En aquest grup de similar edat mitja i temps d'evolució de la malaltia ($39,4 \pm 7,8$ anys i $21,7 \pm 8,6$ anys) es detectà una baixa prevalença d'esteatosi hepàtica, assolint el 12%. Els pacients amb esteatosi hepàtica demostraren unes concentracions incrementades de triglicèrids ($77,0$ (62,0 – 129,0) vs $61,5$ (46,0 – 84,3) mg/dL, $p = 0,02$) i una major proporció de tractament amb estatines (58,3% vs 27,3%, $p = 0,012$), sense detectar-se diferències en l'edat, el sexe, el temps de duració de la diabetis, el tabaquisme o l'IMC.

El GIMC mig de la mostra resultà de $0,54 \pm 0,15$ mm, un 17% dels participants presentaven plaques carotídies i un 23%, un CACs > 0 UA. Respecte les potencials correlacions entre l'hepatopatia i les proves de la MCV subclínica, es detectà un GIMC significativament major entre els pacients amb DM1 i EHNA respecte aquells sense EHNA ($0,65 \pm 0,17$ vs $0,55 \pm 0,14$ mm, $p = 0,029$), sense que existissin diferències quant a CACs, nefropatia o retinopatia diabètica o presència de plaques carotídies. En l'anàlisi de regressió lineal es va perdre l'associació independent per la variable EHNA respecte el GIMC.

7. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

8.1 Els pacients amb diabetis mellitus del tipus 1, de l'àrea Mediterrània i amb més de 10 anys d'evolució de la seva malaltia presenten una molt reduïda proporció de malaltia cardiovascular subclínica

Per als pacients amb DM1 s'han proposat diferents eines per avaluar-ne la prevalença de MCV subclínica. Entre les diferents proves diagnòstiques trobem la mesura del CACs mitjançant una TC per multidetectors o la mesura del GIMC i la detecció de plaques ateromatoses mitjançant una ecografia carotídia (**veure apartat 2.5.1.3**).

En el nostre primer estudi¹⁷⁸ s'analitzà la proporció de MCV subclínica, en forma d'arterioesclerosi precoç coronària o carotídia, en un grup de 150 pacients amb DM1, amb més de 10 anys d'evolució de la diabetis i sense antecedents de malaltia isquèmica CV. A part, se'n compararen els resultats amb un grup control de 50 subjectes no diabètics aparellats per edat, sexe i hàbit tabàquic.

Prevalença d'arterioesclerosi subclínica segons calcificació coronària

El CACs es va considerar una variable qualitativa, de la mateixa manera que d'altres treballs esmentats^{16,171-175}. S'establí com a positiu qualsevol valor de CACs superior a 0 UA i, en darrera instància, es va considerar aquesta positivitat com a suggeridora de presència de MCV subclínica coronària.

Segons aquests criteris, la prevalença de MCV subclínica mesurada mitjançant el CACs en la nostra cohort de pacients amb DM1 va ser del 18% (homes 33%, dones 9%). Aquesta prevalença és significativament inferior a la reportada per altres estudis^{16,172,173,175} però, molt similar a la prevalença d'un altre estudi de la Mediterrània, realitzat a Egipte¹⁷⁴.

Revisant la literatura trobem diferents treballs que avaluen l'arterioesclerosi coronària mitjançant el CACs. En un estudi derivat del CACTI Study¹⁶, es va observar una CACs > 0 UA en un 37% de la mostra de pacients amb DM1. En la mateixa línia, Colhoun i col.¹⁷³ ha descrit un percentatge de fins el 49,7% amb un CACs > 0 UA en la seva cohort del Regne Unit. També, en estudi derivat de la cohort del DCCT/EDIC¹⁷², es reportaven prevalences de CACs > 0 UA més elevades, assolint un 31% dels pacients amb DM1 americans

asimptomàtics i, finalment, en una investigació sobre pacients amb DM1 procedents dels Països Baixos, es va detectar un CACs > 0 UA en un 60% de la mostra¹⁷⁵.

Més a prop, en un estudi de la conca Mediterrània, amb una cohort de 60 pacients adolescents egipcis, amb un menor temps d'evolució de la malaltia que en la nostra cohort (12 vs 20 anys, en la nostra cohort) però amb pitjor control glucèmic (HbA1c 9,7 vs 8,1%, en la nostra cohort) i una major proporció de complicacions cròniques associades a la diabetis, es va detectar un CACs > 0 UA en 12 dels 60 pacients (20%)¹⁷⁴. Aquest valor és molt similar a la prevalença detectada en el nostre estudi.

Prevalença de malaltia cardiovascular subclínica segons ecografia carotídia

Existeix molta heterogeneïtat en la forma de presentar les dades obtingudes per ecografia carotídia en els estudis publicats, fet que dificulta enormement contrastar-ne les dades.

En comparació amb dos estudis europeus, la nostra mostra presenta una menor prevalença de GIMC significativament incrementats. Primerament, quant a la proporció de pacients amb GIMC major al percentil 90 i al percentil 95, en el nostre treball es detecten la meitat que en l'estudi noruec⁴⁴ (un GIMC > al percentil 95: 13,1% vs 5,7% i un GIMC > percentil 90: 19,5 vs 9,9% en la nostra cohort). Aquestes dades contrasten amb el fet que la nostra cohort demostrava una major edat mitja (13,7 vs 38 anys, en la nostra cohort) i una major evolució de la malaltia (5,5 anys vs 20 anys, en la nostra cohort).

D'altra banda, en l'estudi de Frost i col.¹⁷⁷ realitzat sobre una cohort alemanya de característiques similars a la nostra, es detecta una proporció de pacients amb un GIMC superior a 0,6 cm menor que en el nostre estudi (18,7% vs 32%, en la nostra cohort).

Prevalença de malaltia cardiovascular subclínica segons presència de plaques ateromatoses carotídiades

Quant a la detecció de plaques ateromatoses existeix més homogeneïtat de dades. En el nostre estudi de 150 pacients amb DM1 (edat mitja de 39 anys, amb un temps d'evolució mig de 20 anys i una HbA1c mitja de 8,1%) es van detectar plaques ateromatoses en 16 pacients, un 11% del grup cas¹⁷⁸. Aquesta dada està en consonància amb la reportada en un estudi del Brasil⁸¹. Per contra, al comparar la prevalença de MCV subclínica segons la presència de

plaques amb una altra cohort del nostre territori (edat mitja i temps d'evolució de la diabetis similars) es detecten el doble de plaques en la cohort de Giménez i col.¹⁷⁶ respecte el nostre treball. Aquesta diferència de resultats podria reflectir disparitats entre observadors o manca d'un protocol ben establert per a la seva detecció.

Baixa prevalença de malaltia cardiovascular subclínica entre els pacients amb diabetis mellitus tipus 1 de l'àrea Mediterrània

Independentment del mètode elegit per a la detecció de l'arterioesclerosi asimptomàtica del grup de pacients del nostre estudi (CAC > 0 UA en el 18%, GIMC > al percentil 90 del 9,9% o una detecció de plaques en un 11%) trobem una baixa presència de MCV subclínica en els pacients amb DM1 de la nostra àrea geogràfica. Si utilitzem el punt de tall de CACs > 200 UA, proposat com a predictor d'esdeveniments CV per alguns autors¹⁷², ens situem amb prevalences de MCV subclínica de caràcter significatiu del 2% i, en el cas del GIMC del 5.7% (GIMC superior al valor del percentil 97).

Com a possibles explicacions a aquest fenomen trobaríem la procedència d'una àrea geogràfica amb una característica reduïda taxa de MCV¹⁸², el potencial component cardioprotector vinculat a la dieta Mediterrània¹⁸³, el tractament glucèmic mitjançant règims d'insulina intensius dels nostres pacients (un 15% sota tractament amb bomba d'infusió contínua d'insulina), el control dels FRCV clàssics amb antihipertensius, hipolipemians i antiagregants (21% sota tractament amb estatines, 15% antihipertensius i 16% amb antiagregants) i, tot i que no demostrable, un probable rerefons genètic protector.

Quant a la correlació entre ambdues principals proves diagnòstiques, la quantificació del CACs i la mesura del GIMC, es va detectar una correlació positiva entre els valors de la CACs ($r_s = 0,36$, $P < 0,001$). Aquest fet recolza l'ús d'aquestes proves per a la diagnosi de la MCV subclínica, tanmateix per a poder validar aquestes proves caldria un estudi amb més mostra i mitjançant la comparació amb un *gold standard*.

Tanmateix, la esmentada baixa prevalença de MCV subclínica significativa provoca que no es compleixen els criteris de Wilson i Junger¹⁸⁴ per a establir un cribratge universal, ni en qualitat d'entitat suficientment prevalent ni en l'esfera de la cost-efectivitat.

8.2 Existeix una elevada prevalença de deficiència i d'insuficiència de vitamina D entre els pacients amb diabetis mellitus tipus 1 de l'àrea Mediterrània sense detectar-se una associació amb la presència de malaltia cardiovascular subclínica

En la literatura s'analitza extensament la prevalença d'insuficiència o de deficiència de colecalciferol entre els pacients amb DM1^{49,56-59}. En el segon article d'aquesta tesi¹⁷⁹ s'avaluaren les concentracions de 25OHD de 145 pacients amb DM1 i 48 controls no diabètics aparellats per edat, sexe, IMC i tabaquisme.

Prevalença de deficiència de 25-hidroxivitamina D en casos i controls

Vam detectar una prevalença molt elevada de deficiència de 25OHD entre els pacients amb DM1, amb un 43,2% de deficiència i un 20,5% de “deficiència marcada” amb valors inferiors a 15 ng/mL. En clau de comparació, els pacients amb DM1 presentaven una concentració mitja menor de 25OHD corregida ($22,72 \pm 9,11$ vs $26,63 \pm 9,56$ ng/mL en els controls, $p = 0,018$) i una major proporció de deficiència i de deficiència marcada respecte els controls no diabètics (43,2% vs 21,7%, $p = 0,03$ i 20,5% vs 3%, $p = 0,04$).

Altres investigacions també detecten concentracions disminuïdes de 25OHD en els pacients amb DM1^{50,51}, tot i que no tots⁴⁹. En aquest darrer article, és important remarcar que les comparacions foren entre les concentracions crues de 25OHD, sense aplicar-hi factors de correcció estacionals. Quan, en el nostre propi estudi, es van comparar les concentracions crues de 25OHD entre casos i controls tampoc es detectaren diferències significatives.

Malgrat no fou dissenyat per identificar-ne la causa, en el nostre treball es poden excloure factors vinculats a aquesta deficiència marcada de 25OHD entre els pacients amb DM1. És improbable que hi estiguessin implicats la coexistència de nefropatia diabètica, el fototipus de pell o l'ús de suplementos de calci o de vitamina D entre els controls. Primerament, la proporció de pacients amb nefropatia diabètica únicament assolí el 10,2% i, quant a les altres dues possibles explicacions, es consideraren criteris d'exclusió i, per aquest motiu, cinc pacients i dos controls van ésser enretirats de la mostra a estudi.

Prevalences de deficiència de 25-hidroxivitamina D entre poblacions amb diabetis mellitus tipus 1

La prevalença de deficiència de vitamina D en la nostra cohort de persones amb DM1 resultà similar a la d'alguns estudis de la literatura^{49,52,59}, tanmateix aquesta fou més elevada que la reportada per la majoria de treballs sobre vitamina D i DM1^{56,57,185}.

En l'estudi CACTI⁵⁶, on els pacients amb DM1 presentaven similituds amb els nostres pacients (majoritàriament caucàsics i edat mitja, latitud (39° 44' 21") i un temps de duració de la malaltia equiparables) es va demostrar una prevalença de deficiència quatre cops inferior a la nostra (10,2% vs 43,2%, en el nostre treball). En l'estudi DCCT/EDIC⁵⁷, on els pacients amb DM1 eren majoritàriament caucàsics però amb algunes diferències respecte la nostra cohort (latitud més septentrional (47°, 36', 00"), menor edat mitja (38 vs 32,6 anys) i menor temps d'evolució de la diabetis (20,7 vs 7,5 anys)), s'hi va detectar una prevalença de deficiència de 25OHD 1,5 vegades inferior a la nostra (27,6% vs 43,2%).

Els nostres resultats estarien en sintonia amb estudis de Joergensen i col.⁵⁸ o Taskiran⁵⁹. En el primer treball, realitzat a Copenhagen (latitud 55°, 40', 34"), es detectava una prevalença de fins a un 10% de valors inferiors a 6,2 ng/mL, el que seria una "deficiència molt i molt marcada". Aquesta dada es podria equiparar a la nostra proporció d'un 20,5% de deficiència marcada (< 15 ng/mL). En el segon treball, Taskiran i col. estudiaren una cohort de 93 pacients amb DM1 de la conca Mediterrània (Turquia, latitud 39°, 52', 00") on van detectar una deficiència de 25OHD en un 78% de la mostra.

Aquesta variabilitat de les dades podria respondre a diferències metodològiques. En els estudis DCCT/EDIC⁵⁷ (Seattle) i Joergensen i col.⁵⁸ (Copenhagen), es va recórrer a la cromatografia de líquids d'alt rendiment amb espectròmetre de masses, una prova amb major sensibilitat i especificitat que la d'immunoassaig amb tecnologia de quimioluminescència que vam usar nosaltres i el grup de Turquia. A més, en l'estudi del grup turc, el fototipus dels pacients integrants de l'estudi podria influenciar a l'alça les dades de prevalença⁵⁹.

En el nostre treball, a diferència de tots els estudis esmentats i en un intent d'avaluar les dades de prevalença obtingudes, vàrem incloure un test d'exposició solar validat en població

italiana. Aquest qüestionari va aportar un valor d'exposició solar setmanal per a cada pacient i per a cada control i, la puntuació que se'n va obtenir, es va correlacionar significativament amb les concentracions de 25OHD, PTH i calci ($r_s = 0,152$, $p = 0,023$)¹⁷⁹.

25-hidroxitamina D com a factor de risc cardiovascular no clàssic entre els pacients amb diabetis mellitus tipus 1

Un resultat important del nostre treball fou la manca d'associació entre les concentracions disminuïdes d'aquesta vitamina en els pacients amb DM1, el CACs i el GIMC. Aquesta dada es va mantenir fins i tot entre els pacients amb DM1 i deficiència de 25OHD i, més enllà d'això, entre aquells amb deficiència marcada. Així, es va descartar la vitamina D com un FRCV no clàssic en la nostra cohort de pacients amb DM1 de l'àrea Mediterrània.

Els nostres resultats estan en controvèrsia amb estudis que detecten una associació clara i significativa entre la manca de vitamina D i la MCV subclínica^{56,58}, però resten en sintonia amb d'altres^{57,59}.

En el treball realitzat per Joergensen i col.⁵⁸ es detecta una associació significativa entre els pacients amb deficiència greu de 25OHD ($< 6,2$ ng/mL) i la mortalitat de qualsevol causa (HR 2,7 [1,1–6,7], $p = 0,03$). Paral·lelament, en l'estudi CACTI⁵⁶, es va observar una associació significativa entre la manca de la vitamina, la presència de CAC i la progressió de CAC.

Aquests estudis presenten limitacions metodològiques, doncs ni l'estudi observacional prospectiu⁵⁸ ni el transversal⁵⁶ poden establir causalitat. Més enllà d'això, no s'ajusten les concentracions per biaixos estacionals ni se n'exclouen els subjectes sota suplementació amb vitamina D o calci. Paral·lelament, no esmenten el fototipus cutani dels pacients a estudi i, basant-nos en el fet que existeix una interferència en la biosíntesi cutània de 25OHD provocada per una major concentració de melanina cutània i, amb la finalitat d'homogeneïtzar la mostra, aquells subjectes amb fototipus cutani superior o igual a IV segons l'escala Fitzpatrick¹⁸⁶, foren exclosos.

Finalment i amb major rellevància, podria existir-hi un biaix de selecció, doncs aquells pacients amb DM1 i coexistència de comorbiditats i MCV subclínica poden presentar factors que condicionen tant l'estatus de vitamina D com el vascular.

Aquest fenomen, de forma menys evident, pot influir en la vinculació entre vitamina D i MCV detectada en aquests estudis^{56,58}. Els pacients amb DM1 amb una major tendència a un deteriorament accelerat del seu l'arbre vascular perquè presenten hàbits sedentaris, una alimentació poc saludable, un pitjor control dels FRCV clàssics, complicacions cròniques associades que condicionen postració (amputacions, retinopatia, etc.) i un menor nombre de revisions mèdiques, estarien exposats a una reducció de les seves concentracions de 25OHD sanguínies a causa d'una menor ingesta d'ergo o colecalciferol, una menor exposició solar i una menor prescripció facultativa de suplementes de calci o de la vitamina.

Així doncs, aquests pacients amb DM1 i comorbiditats podrien presentar unes concentracions disminuïdes de 25OHD com a conseqüència del seu estat general de salut. En aquest subgrup de pacients no es compliria una clara causalitat fisiopatològica entre la deficiència de la vitamina i l'aparició d'aquestes complicacions.

8.3 Existeix una elevada concentració de marcadors inflamatoris proaterogènics com YKL-40 i d'antiaterogènics com l'adiponectina entre els pacients amb diabetis mellitus tipus 1 de la nostra àrea amb una manca d'associació amb els marcadors d'ateroesclerosi precoç

Tal i com s'ha exposat en l'**apartat 2.4.2.** existeixen biomarcadors sèrics associats a l'arterioesclerosi, essent-ne dos clars exemples l'adiponectina i l'YKL-40. En els pacients amb DM1 s'han demostrat unes concentracions majors d'adiponectina^{87,88,94,95,97} i d'YKL-40^{98,100,104} respecte la població general, tot i que aquesta dada no és homogènia entre tots els treballs⁹².

La relació entre aquestes elevades concentracions d'adiponectina i la MCV, en la població amb DM1, resta controvertida. Algunes investigacions hi vinculen una funció protectora contra la MCV subclínica^{92,93,95,97} mentre que altres treballs l'associen, de forma directa, amb la presència de complicacions microvasculars^{87,94} o amb la mortalitat per totes les causes⁹⁹. Amb l'YKL-40 hi ha més consens, vinculant-se les seves concentracions amb la presència de complicacions microvasculars^{98,106} o macrovasculars mesurades per GIMC¹⁰⁴.

Concentracions d'adiponectina i d'YKL-40 en casos i controls

En el tercer estudi¹⁸⁰ es mesuraren les concentracions d'adiponectina i d'YKL-40 en 150 pacients amb DM1 i 50 controls sans ajustats per edat, sexe i hàbit tabàquic, sense antecedents previs de MCV ni complicacions cròniques macrovasculars.

Així com s'observa en la major part dels estudis realitzats en aquesta població^{87,88,94,95,97,98,100,104}, les concentracions d'adiponectina i d'YKL-40 foren més elevades entre els pacients que entre els controls no diabètics (**adiponectina:** $15,8 \pm 9,1$ vs $12,4 \pm 5,3$ mg/mL, en els controls sans, $p = 0,008$; **YKL-40:** $42,6$ (10,4–195,0) vs $\pm 28,7$ (11,0–51,2) ng/mL, en els controls sans, $p = 0,001$). Els altres paràmetres inflamatoris mesurats (IL-6, IL-1 β , TNF- α , PCR-as i homocisteïna) no van presentar diferències entre els grups.

Valor d'adiponectina i YKL-40 com a biomarcadors d'ateroesclerosi precoç en pacients amb diabetis mellitus tipus 1

Es van detectar unes concentracions incrementades d'adiponectina entre els pacients amb DM1 respecte als controls sans no diabètics, seguint la línia de la majoria dels treballs publicats^{87,88,93-97}. Les concentracions d'adiponectina resultaren majors entre aquells pacients amb DM1 i microalbuminúria ($21,84 \pm 8,15$ vs $14,88 \pm 8,27$ mg/mL, $p = 0,008$), tal com es descriu en algunes investigacions^{87,94,96}. Tanmateix, a diferència d'aquells autors que en vinculen les concentracions amb la retinopatia diabètica^{87,94}, en la nostra cohort aquesta associació no es mantenia.

En termes de complicacions macrovasculars, els nostres resultats recolzen el paper neutre de l'adiponectina en el procés d'arterioesclerosi accelerada dels pacients amb DM1, en la mateixa línia que altres autors⁹⁶. En contra dels estudis que hi vinculen un paper cardioprotector^{93,95,97} i en contra dels qui en defensen un paper proateroescleròtic⁹⁹, les concentracions d'adiponectina no es van associar ni amb el GIMC ni amb el CACs, sense poder establir-hi ni un paper proaterogènic ni antiaterogènic.

També es detectaren concentracions incrementades d'YKL-40 entre els pacients amb DM1, com en d'altres estudis de la literatura^{98,104,106}. En l'anàlisi de la potencial associació entre YKL-40 i les complicacions micro i macrovasculars, el nostre treball¹⁸⁰, amb una edat mitja, un temps d'evolució de la malaltia i una presència de complicacions cròniques associades intermèdies respecte els estudis anteriorment descrits de Rathcke i Sakamoto^{98,106}, no es va detectar una associació significativa. Les concentracions d'YKL-40 no demostraren cap associació significativa amb la presència de complicacions cròniques microvasculars com la nefropatia en fase de microalbuminúria o la retinopatia diabètica, resultats similars als d'altres autors¹⁰⁴. Cal remarcar que aquest darrer treball es va realitzar sobre una cohort pediàtrica.

Quant a les complicacions cròniques macrovasculars, les concentracions d'YKL-40 no es van associar ni amb el GIMC ni amb la positivitats de CACs en la nostra cohort, resultats similars a Sakamoko i col.⁹⁸, on la glicoproteïna no es va associar amb el GIMC dels participants. Per

contra, els nostres resultats entren en controvèrsia amb Jafary i col.¹⁰⁴, on en la cohort pediàtrica de pacients amb DM1 i en absència de complicacions cròniques associades, es detectà una correlació significativa i independent entre l'YKL-40 i el GIMC.

Adiponectina i YKL-40 com a factors de risc cardiovascular no clàssics entre els pacients amb diabetis mellitus tipus 1

Si en centrem en la nostra cohort de pacients amb DM1 de l'àrea Mediterrània i amb la seva característica molt baixa proporció de MCV subclínica, així com de complicacions cròniques microvasculars, se'ns descarta l'adiponectina y l'YKL-40 com un FRCV no clàssic vinculat amb la presència de MCV subclínica.

En el cas de l'adiponectina, es podria valorar el seu paper en la detecció de la nefropatia diabètica en fase de microalbuminúria.

8.4 Existeix una molt escassa proporció de pacients amb esteatosi hepàtica no alcohòlica en la nostra cohort de pacients amb diabetis mellitus tipus 1, tanmateix sembla existir una associació clara entre l'hepatopatia i la malaltia cardiovascular subclínica

En la literatura, malgrat no de forma universal¹¹³, es descriu una robusta associació entre la presència d'EHNA i la condició de DM1¹⁰⁹⁻¹¹¹, tal i com s'ha exposat en l'**apartat 2.4.3**. Més enllà d'això, la presència d'EHNA en el pacient amb DM1 ha estat vinculada amb un pitjor control dels FRCV clàssics¹⁰⁹ i la presència de complicacions cròniques microvasculars^{109,111} i macrovasculars^{110,129}.

En el darrer article d'aquest treball doctoral¹⁸¹ es va avaluar la presència d'esteatosi hepàtica en una mostra de 100 pacients amb DM1 procedents de les Consultes Externes d'Endocrinologia i Nutrició del nostre centre. Aquests pacients no tenien ni antecedents d'hepatopatia ni de cardiopatia isquèmica i es van avaluar quant a paràmetres antropomètrics, bioquímics i radiològics, seguint el protocol descrit en l'**apartat 2.4.3**.

Prevalença d'esteatosi hepàtica no alcohòlica entre els pacients amb diabetis mellitus tipus 1 de l'àrea Mediterrània

Com a troballa principal de la investigació es va detectar una prevalença del 12% d'EHNA entre els pacients de la mostra. Aquesta reduïda prevalença contrasta amb les dades reportades per Parés i col. en població general del nostre territori, en el 2000¹¹⁵ i en el 2010⁸ (13,8 i 25,8%, respectivament).

En comparar els nostres resultats amb les dades publicades de prevalença d'EHNA en població amb DM1 trobem que la magnitud de la nostra prevalença és intermèdia^{109-113,129}. Respecte a la cohort francesa avaluada per Petit i col.¹¹³, la nostra prevalença és 2,5 vegades superior a la de l'equip francès. Per contra, en una cohort italiana de pacients amb DM1, de característiques similars a la nostra (edat mitja, proporció d'homes, temps d'evolució de la malaltia, grau de control glucèmic, etc.), Targher i col.¹¹¹ reporten una prevalença de fins el 50% d'EHNA.

Aquesta enorme disparitat de valors pot originar-se en divergències metodològiques i tècniques. En el treball francès de Petit i col.¹¹³, la diagnosi d'esteatosi hepàtica es va

realitzar mitjançant ressonància nuclear magnètica. En canvi, el nostre treball i el de Targher i col.¹¹¹, basaren la diagnosi de l'hepatopatia en l'ecografia abdominal. Menys rellevància semblen tenir les diferències ambientals, doncs els tres països formen part de la conca Mediterrània i, tot i determinades puntualitats, els hàbits higiènics-dietètics no varien significativament.

Associació entre la presència d'esteatosi hepàtica i l'existència de malaltia cardiovascular subclínica en els pacients amb diabetis mellitus tipus 1

En la nostra cohort de pacients¹⁸¹ es va confirmar que, aquells pacients amb DM1 i presència d'esteatosi hepàtica detectada per ecografia tenien unes majors concentracions de triglicèrids i una major prevalença de tractament hipolipemiant, essent aquestes variacions estadísticament significatives. En l'estudi de la resta de paràmetres clínics, físics i analítics, no es varen detectar diferències.

Quant als paràmetres radiològics, els pacients amb DM1 i EHNA, també demostraren tenir un major GIMC mesurat per ecografia carotídia respecte els pacients amb DM1 sense EHNA ($0,65 \pm 0,17$ vs $0,55 \pm 0,14$ mm, respectivament, $p = 0,03$). Tanmateix, aquesta troballa no es va poder detectar amb el CACs i, malgrat l'existència del doble de pacients amb CACs positiu en aquest grup amb esteatosi, aquesta diferència no fou significativa estadísticament ($41,7\%$ vs $20,5\%$ en el grup sense EHNA, $p = 0,101$). L'estudi de les plaques carotídies no va demostrar diferències significatives entre ambdós grups ni tampoc quant a l'existència de complicacions microvasculars.

L'associació detectada en l'estudi univariant entre la presència d'EHNA i la mesura del GIMC es va perdre en realitzar l'anàlisi multivariant. Aquest fet, molt probablement, podria respondre a l'escassa prevalença d'EHNA de la nostra mostra.

Les dades obtingudes en el nostre estudi van en la mateixa línia que les extretes d'una cohort xinesa de 722 pacients amb DM1¹²⁹. En aquesta cohort, amb una major edat mitja, un menor temps d'evolució de la diabetis, un menor IMC i un pitjor control glucèmic crònic (46 vs 39 anys, 8 vs 22 anys d'evolució, 22 vs 26 kg/m² i 9 vs 8%, respecte la nostra cohort), s'hi va detectar una prevalença d'EHNA del 15,9%. De forma molt similar a la nostra investigació,

van comprovar l'existència d'una major concentració de triglicèrids i de tractament hipolipemiant entre els pacients amb DM1 i esteatosi.

En l'avaluació de l'arterioesclerosi subclínica feta pel grup xinés, van detectar una vinculació directa i significativa entre la presència d'EHNA i el GIMC ($0,69 \pm 0,18$ mm vs $0,81 \pm 0,25$ vs, $p < 0,001$, en el grup amb EHNA). Aquesta relació també es va comprovar amb l'existència de plaques ateromatoses carotídies (16,9 vs 28,9%, en el grup amb EHNA, $p = 0,005$). D'aquestes associacions detectades en l'estudi univariant, van persistir les detectades entre EHNA i GIMC, perdent-se la que implicava la presència de plaques.

Esteatosi hepàtica com a factor de risc cardiovascular no clàssic en els pacients amb diabetis mellitus tipus 1 de l'àrea Mediterrània

Vistes les dades amb perspectiva, es poden extreure consideracions importants del nostre estudi de l'EHNA entre els pacients amb DM1. Tot i la reduïda prevalença d'hepatopatia diagnosticada en el nostre treball i respecte els altres estudis^{111,112} es va aconseguir detectar una associació significativa en l'estudi univariant que vinculava l'existència d'esteatosi hepàtica i l'arteroesclerosi carotídia subclínica. Crec que, en un estudi amb una major cohort i per tant, amb una major potència estadística, es podria corroborar aquesta associació, fins i tot en el nostre territori de baixa prevalença de MCV¹²⁹.

En resum i com a principal troballa d'aquest treball, es detecta una molt reduïda prevalença de MCV subclínica entre els pacients amb DM1 de l'àrea Mediterrània en comparació amb la d'altres poblacions. És probable que alguns factors protectors de diversa naturalesa, com ara ambientals, geogràfics, nutricionals, genètics i derivats també d'un actual millor control dels FRCV clàssics expliquin aquesta troballa, fins i tot en aquests pacients afectes d'una malaltia considerada com un dels paradigmes de l'arterioesclerosi precoç.

Paral·lelament, les proves de detecció de la MCV subclínica utilitzades en aquest treball, l'ecografia carotídia i la quantificació de la calcificació coronària, han demostrat una correlació positiva entre elles que recolza la seva utilització en la nostra població. Tanmateix i, ajustant-nos a l'esmentada baixa prevalença d'arterioesclerosi subclínica carotídia i coronària en els pacients asimptomàtics amb DM1 de la nostra àrea, el cribratge universal de MCV subclínica no estaria justificat. Així doncs, el rol d'aquestes proves d'imatge s'haurà d'acotar a l'avaluació i estratificació del risc CV d'aquest grup de pacients. Probablement, tractant-se d'una prova no invasiva i atenent a criteris d'accessibilitat, reproductibilitat i cost, l'eina més adequada per a la detecció de MCV subclínica en els pacients amb DM1 asimptomàtics de molt alt risc és l'ecografia carotídia.

En la recerca de FRCV no clàssics s'han descartat els paràmetres analítics avaluats en aquest treball de tesi. Malgrat haver-se detectat una molt elevada prevalença d'insuficiència i deficiència de 25OHD entre els pacients subjectes a estudi, no hem trobat associacions estadísticament significatives entre les concentracions de la vitamina i els resultats de CACs o GIMC en la nostra cohort. En un esforç per mitigar potencials biaixos metodològics o de selecció, freqüents en els estudis amb vitamina D, hem validat les dades de la mesura de la vitamina D amb un test d'exposició solar i s'han ajustat les concentracions a les variabilitats estacionals. Tot i aquestes consideracions, no es detectaren associacions significatives. D'altra banda, l'estudi de les concentracions d'adiponectina i YKL-40 en la nostra cohort de pacients va demostrar que, malgrat existien unes dèbils associacions entre els marcadors inflamatoris i la presència de microalbuminúria per nefropatia diabètica, aquesta vinculació no s'establia amb les complicacions macrovasculars estudiades per CACs o GIMC.

Finalment, l'avaluació ecogràfica del fetge dels pacients inclosos en l'estudi va demostrar una molt baixa prevalença d'esteatosi hepàtica en comparació a les dades reportades d'altres poblacions amb DM1 i, en l'estudi univariant, una associació entre la presència d'esteatosi hepàtica i la mesura del GIMC. En conclusió, en una població amb una molt disminuïda prevalença de MCV subclínica i d'EHNA, aquesta associació en l'estudi univariant i en línia amb d'altres treballs publicats, ens fa senyalar l'ecografia abdominal com una valuosa eina en l'estratificació CV del pacient amb DM1 de la nostra àrea.

En resum, els pacients amb DM1 de l'àrea Mediterrània de Badalona presenten una molt reduïda prevalença de MCV subclínica. Tot i que no n'és necessari un cribratge universal en el sentit estricte, la sospita d'arterioesclerosi precoç del pacient amb DM1 ha de formar part de la pràctica clínica habitual basant-nos en l'elevada incidència d'esdeveniments CV d'aquest grup de pacients. En l'estratificació del risc CV de les persones amb DM1, crec pels nostres resultats i els d'altres, que es pot incloure l'ecografia carotídia per a la detecció de MCV subclínica i l'ecografia abdominal amb la detecció d'esteatosi hepàtica; ambdues proves tenen un cost reduït i són de fàcil implementar en la pràctica clínica diària, a més de no ser invasives. La diagnosi d'alguna de les dues entitats incrementa el risc CV, ja elevat de per sí, dels pacients amb DM1 i per tant, ha de fer-nos adoptar estratègies més intensives de control i seguiment dels FRCV clàssics.

9. CONCLUSIONS

- 9.1** Globalment, existeix una molt reduïda presència de MCV subclínica independentment de la prova diagnòstica utilitzada, en la població amb DM1 de l'àrea Mediterrània de Badalona, asimptomàtica des d'un punt de vista CV i amb més de 10 anys d'evolució de la malaltia. Proves com el CACs o la mesura del GIMC són útils en la diagnosi de la MCV subclínica en aquesta població de molt baix risc CV.
- 9.2** Més enllà de la latitud i la climatologia de la nostra regió, la prevalença de deficiència i de “deficiència marcada” de vitamina D entre els pacients amb DM1 és habitual (43,2% i 20,5%, respectivament). Aquesta deficiència no s'associa amb els resultats de les proves CV, ni amb el CACs, ni amb el GIMC ni amb la detecció de plaques carotídies. Aquesta manca d'associació es manté inclús amb els casos amb deficiència de 25OHD més greu.
- 9.3** En la nostra cohort de pacients amb DM1 es demostra una major concentració d'YKL-40 i d'adiponectina respecte els controls no diabètics. Més enllà d'una dèbil associació amb la nefropatia diabètica, aquestes concentracions no s'associaren ni amb la presència d'altres complicacions microvasculars ni amb les macrovasculars, ja fossin estudiades mitjançant el CACs o mitjançant el GIMC.
- 9.4** La prevalença d'EHNA entre els pacients amb DM1 de la nostra àrea és reduïda i es vincula amb un major GIMC. Sembla prudent considerar la detecció d'esteatosi hepàtica per ecografia abdominal com un FRCV no clàssic en el pacient amb DM1. La presència d'EHNA i els valors incrementats del GIMC o de CACs haurien d'orientar-nos a l'hora d'estratificar els pacients amb DM1 segons el risc CV amb la finalitat d'aplicar estratègies preventives més intenses.

10. LÍNIES DE FUTUR

10.1 ESTUDI DE LA QUALITAT DE L'OS TRABECULAR I LA PREVALENCIA D'OSTEOPÈNIA I OSTEOPOROSI EN ELS PACIENTS AMB DIABETIS MELLITUS TIPUS 1 DE L'ÀREA MEDITERRÀNIA DE BADALONA I AVALUACIÓ DE LA POTENCIAL RELACIÓ AMB LA PRESENCIA DE MALALTIA CARDIOVASCULAR SUBCLÍNICA

En població general, hi ha estudis que vinculen una disminuïda densitat mineral òssia amb un perfil lipídic aterogènic, una major presència de calci a nivell carotídi, coronari i ilíac, una major incidència d'infarts de miocardi i un increment de la mortalitat CV.

L'objectiu principal de l'estudi és l'avaluació de la densitat mineral òssia d'una cohort de pacients amb DM1 de la nostra àrea, mitjançant la realització d'una densitometria i l'avaluació de la qualitat de l'os trabecular mitjançant la mesura del càlcul del *Trabecular Bone Score*. Les dades es correlacionaran amb proves d'imatge que avaluin la MCV subclínica com l'ecografia carotídia o la detecció d'esteatosi hepàtica per ecografia abdominal.

10.2 ESTUDI DE LES CONCENTRACIONS DE MARCADORS SÈRICS DE REMODELAT OSSI EN ELS PACIENTS AMB DIABETIS MELLITUS TIPUS 1 DE LA NOSTRA ÀREA I ANÀLISI DE L'ASSOCIACIÓ AMB L'ARTERIOESCLEROSI SUBCLÍNICA

Alguns marcadors de remodelat ossi com la osteoprotegerina, l'esclerostina i el dickkopf-1 (o DKK1) han estat proposats com a uns factors implicats tant en la remodelació òssia com en la calcificació vascular. L'osteoprotegerina s'ha associat positivament amb el valor del CACs en pacients amb DM2 i s'ha proposat com un marcador independent d'esdeveniments CV en els pacients amb DM1. D'altra banda, l'esclerostina i DKK1 s'han associat amb la disfunció endotelial, la calcificació vascular i l'increment de GIMC, novament en DM2, mentre que en pacients amb DM1 únicament s'han associat amb els resultats de la DMO, les concentracions de la parathormona i la presència de macroangiopatia.

L'objectiu d'aquesta futura línia d'investigació és l'estudi de marcadors de remodelat ossi com l'osteoprotegerina, l'esclerostina i el DKK1 i de la seva potencial associació amb la MCV subclínica mesurada per GIMC.

11. REFERÈNCIES

1. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiu E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 2012 Jan;55(1):88-93.
2. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009 Jun 13;373(9680):2027-33.
3. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la Causa de Muerte Año 2015. Notas de prensa. 1-7. 27-2-2017.
4. Ruiz-Ramos M, Escolar-Pujolar A, Mayoral-Sanchez E, Corral-San LF, Fernandez-Fernandez I. [Diabetes mellitus in Spain: death rates, prevalence, impact, costs and inequalities]. *Gac Sanit* 2006 Mar;20 Suppl 1:15-24.
5. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 2001 Sep;44 Suppl 2:S14-S21.
6. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998 Jul 23;339(4):229-34.
7. Bulughapitiya U, Siyambalapatiya S, Sithole J, Idris I. Is diabetes a coronary risk equivalent? Systematic review and meta-analysis. *Diabet Med* 2009 Feb;26(2):142-8.
8. Cano JF, Baena-Diez JM, Franch J, Vila J, Tello S, Sala J, et al. Long-term cardiovascular risk in type 2 diabetic compared with nondiabetic first acute myocardial infarction patients: a population-based cohort study in southern Europe. *Diabetes Care* 2010 Sep;33(9):2004-9.
9. Rao Kondapally SS, Kaptoge S, Thompson A, Di AE, Gao P, Sarwar N, et al. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med* 2011 Mar 3;364(9):829-41.
10. Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di AE, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 2010 Jun 26;375(9733):2215-22.
11. Dorman JS, Laporte RE, Kuller LH, Cruickshanks KJ, Orchard TJ, Wagener DK, et al. The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study. Mortality results. *Diabetes* 1984 Mar;33(3):271-6.
12. Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Toeller M, Ferriss B, Reboldi P, Michel G, et al. Risk factors for coronary heart disease in type 1 diabetic patients in Europe: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care* 2004 Feb;27(2):530-7.
13. Rawshani A, Rawshani A, Franzen 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 Apr 13;376(15):1407-18.
14. Fernandez-Friera L, Penalvo JL, Fernandez-Ortiz A, Ibanez B, Lopez-Melgar B, Laclaustra M, et al. Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort: The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation* 2015 Jun 16;131(24):2104-13.

15. Barzilay JI, Spiekerman CF, Kuller LH, Burke GL, Bittner V, Gottdiener JS, et al. Prevalence of clinical and isolated subclinical cardiovascular disease in older adults with glucose disorders: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes Care* 2001 Jul;24(7):1233-9.
16. Dabelea D, Kinney G, Snell-Bergeon JK, Hokanson JE, Eckel RH, Ehrlich J, et al. Effect of type 1 diabetes on the gender difference in coronary artery calcification: a role for insulin resistance? The Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) Study. *Diabetes* 2003 Nov;52(11):2833-9.
17. Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med* 2007 Aug;262(2):157-72.
18. Mazzone T, Chait A, Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet* 2008 May 24;371(9626):1800-9.
19. Chillaron JJ, Flores-Le-Roux JA, Goday A, Benaiges D, Carrera MJ, Puig J, et al. [Metabolic syndrome and type-1 diabetes mellitus: prevalence and associated factors]. *Rev Esp Cardiol* 2010 Apr;63(4):423-9.
20. Liang CP, Han S, Senokuchi T, Tall AR. The macrophage at the crossroads of insulin resistance and atherosclerosis. *Circ Res* 2007 Jun 8;100(11):1546-55.
21. Plutzky J, Viberti G, Haffner S. Atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus and insulin resistance: mechanistic links and therapeutic targets. *J Diabetes Complications* 2002 Nov;16(6):401-15.
22. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk C, Giorgino F, Ebeling P, Fuller JH, et al. Vascular risk factors and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care* 2003 Jul;26(7):2165-73.
23. Targher G, Bertolini L, Zoppini G, Zenari L, Falezza G. Increased plasma markers of inflammation and endothelial dysfunction and their association with microvascular complications in Type 1 diabetic patients without clinically manifest macroangiopathy. *Diabet Med* 2005 Aug;22(8):999-1004.
24. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Fuller JH, Stehouwer CD. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes--the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2005 Feb;48(2):370-8.
25. Rask-Madsen C, King GL. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007 Jan;3(1):46-56.
26. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005 Apr 21;352(16):1685-95.
27. Devaraj S, Glaser N, Griffen S, Wang-Polagruto J, Miguelino E, Jialal I. Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2006 Mar;55(3):774-9.
28. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999 Nov;138(5 Pt 2):S419-S420.

29. Moreno PR, Fuster V. New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2004 Dec 21;44(12):2293-300.
30. Derosa G, Avanzini MA, Geroldi D, Fogari R, Lorini R, De SA, et al. Matrix metalloproteinase 2 may be a marker of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004 Jan;27(1):273-4.
31. Maxwell PR, Timms PM, Chandran S, Gordon D. Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med* 2001 Oct;18(10):777-80.
32. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999 Sep 28;100(13):1481-92.
33. Lahoz C, Mostaza JM. [Atherosclerosis as a systemic disease]. *Rev Esp Cardiol* 2007 Feb;60(2):184-95.
34. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005 Oct 8;366(9493):1267-78.
35. Neal B, MacMahon S, Chapman N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Lancet* 2000 Dec 9;356(9246):1955-64.
36. Rosenberg L, Kaufman DW, Helmrich SP, Shapiro S. The risk of myocardial infarction after quitting smoking in men under 55 years of age. *N Engl J Med* 1985 Dec 12;313(24):1511-4.
37. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008 Oct 9;359(15):1577-89.
38. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001 May 16;285(19):2486-97.
39. 9. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 2018 Jan;41(Suppl 1):S86-S104.
40. de Ferranti SD, de Boer IH, Fonseca V, Fox CS, Golden SH, Lavie CJ, et al. Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2014 Oct;37(10):2843-63.
41. Paneni F. 2013 ESC/EASD guidelines on the management of diabetes and cardiovascular disease: established knowledge and evidence gaps. *Diab Vasc Dis Res* 2014 Jan;11(1):5-10.
42. Ryden L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2013 Oct;34(39):3035-87.

43. Jarvisalo MJ, Putto-Laurila A, Jartti L, Lehtimaki T, Solakivi T, Ronnema T, et al. Carotid artery intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Diabetes* 2002 Feb;51(2):493-8.
44. Margeirsdottir HD, Stensaeth KH, Larsen JR, Brunborg C, Dahl-Jorgensen K. Early signs of atherosclerosis in diabetic children on intensive insulin treatment: a population-based study. *Diabetes Care* 2010 Sep;33(9):2043-8.
45. Spence JD, Barnett PA, Bulman DE, Hegele RA. An approach to ascertain probands with a non-traditional risk factor for carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999 Jun;144(2):429-34.
46. Kuo F, Gardener H, Dong C, Cabral D, Della-Morte D, Blanton SH, et al. Traditional cardiovascular risk factors explain the minority of the variability in carotid plaque. *Stroke* 2012 Jul;43(7):1755-60.
47. Rundek T, Blanton SH, Bartels S, Dong C, Raval A, Demmer RT, et al. Traditional risk factors are not major contributors to the variance in carotid intima-media thickness. *Stroke*. 2013 Aug;44(8):2101-8
48. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007 Jul 19;357(3):266-81.
49. Bierschenk L, Alexander J, Wasserfall C, Haller M, Schatz D, Atkinson M. Vitamin D levels in subjects with and without type 1 diabetes residing in a solar rich environment. *Diabetes Care* 2009 Nov;32(11):1977-9.
50. Pozzilli P, Manfrini S, Crino A, Picardi A, Leomanni C, Cherubini V, et al. Low levels of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 2005 Nov;37(11):680-3.
51. Littorin B, Blom P, Scholin A, Arnqvist HJ, Blohme G, Bolinder J, et al. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia* 2006 Dec;49(12):2847-52.
52. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Scala L, Cigolini M, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006 Nov;65(5):593-7.
53. Hanwell HE, Vieth R, Cole DE, Scillitani A, Modoni S, Frusciante V, et al. Sun exposure questionnaire predicts circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations in Caucasian hospital workers in southern Italy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Jul;121(1-2):334-7.
54. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med* 2011 Jan 20;364(3):248-54.
55. Thrailkill KM, Jo CH, Cockrell GE, Moreau CS, Fowlkes JL. Enhanced excretion of vitamin D binding protein in type 1 diabetes: a role in vitamin D deficiency? *J Clin Endocrinol Metab* 2011 Jan;96(1):142-9.
56. Young KA, Snell-Bergeon JK, Naik RG, Hokanson JE, Tarullo D, Gottlieb PA, et al. Vitamin D deficiency and coronary artery calcification in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2011 Feb;34(2):454-8.

57. Sachs MC, Brunzell JD, Cleary PA, Hoofnagle AN, Lachin JM, Molitch ME, et al. Circulating vitamin D metabolites and subclinical atherosclerosis in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2013 Aug;36(8):2423-9.
58. Joergensen C, Hovind P, Schmedes A, Parving HH, Rossing P. Vitamin D levels, microvascular complications, and mortality in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2011 May;34(5):1081-5.
59. Taskiran B, Cansu GB, Bahadir E, Mutluay R. Role of Vitamin D in Intima Media Thickness in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *J Natl Med Assoc* 2017;109(1):14-20.
60. Reis JP, von MD, Michos ED, Miller ER, III, Appel LJ, Araneta MR, et al. Serum vitamin D, parathyroid hormone levels, and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009 Dec;207(2):585-90.
61. Joergensen C, Reinhard H, Schmedes A, Hansen PR, Wiinberg N, Petersen CL, et al. Vitamin D levels and asymptomatic coronary artery disease in type 2 diabetic patients with elevated urinary albumin excretion rate. *Diabetes Care* 2012 Jan;35(1):168-72.
62. Rachez C, Freedman LP. Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions. *Gene* 2000 Apr 4;246(1-2):9-21.
63. Brewer LC, Michos ED, Reis JP. Vitamin D in atherosclerosis, vascular disease, and endothelial function. *Curr Drug Targets* 2011 Jan;12(1):54-60.
64. Willheim M, Thien R, Schratlbauer K, Bajna E, Holub M, Gruber R, et al. Regulatory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 Oct;84(10):3739-44.
65. Oh J, Weng S, Felton SK, Bhandare S, Riek A, Butler B, et al. 1,25(OH)2 vitamin d inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2009 Aug 25;120(8):687-98.
66. Wu-Wong JR, Nakane M, Ma J, Ruan X, Kroeger PE. Effects of Vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2006 May;186(1):20-8.
67. Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care* 2005 May;28(5):1228-30.
68. Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 May;25(5):932-43.
69. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002 Jul;110(2):229-38.
70. Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, Hoeg JM, Doherty T, Detrano R, et al. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation* 1997 Sep 16;96(6):1755-60.
71. Norman PE, Powell JT. Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Jan;25(1):39-46.

72. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004 May;286(5):E686-E696.
73. Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J* 2004 Jul;25(14):1197-207.
74. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003 Jan 28;107(3):363-9.
75. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 2000 Jul 22;321(7255):199-204..
76. Wang TJ, Nam BH, Wilson PW, Wolf PA, Levy D, Polak JF, et al. Association of C-reactive protein with carotid atherosclerosis in men and women: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 Oct 1;22(10):1662-7.
77. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Kupka MJ, Manning WJ, et al. C-reactive protein is associated with subclinical epicardial coronary calcification in men and women: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2002 Sep 3;106(10):1189-91.
78. Pleskovic A, Letonja MS, Vujkovic AC, Nikolajevic SJ, Gazdikova K, Caprnda M, et al. C-reactive protein as a marker of progression of carotid atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Vasa* 2017 May;46(3):187-92.
79. Godsland IF, Elkeles RS, Feher MD, Nugara F, Rubens MB, Richmond W, et al. Coronary calcification, homocysteine, C-reactive protein and the metabolic syndrome in Type 2 diabetes: the Prospective Evaluation of Diabetic Ischaemic Heart Disease by Coronary Tomography (PREDICT) Study. *Diabet Med* 2006 Nov;23(11):1192-200.
80. Hunt KJ, Baker NL, Cleary PA, Klein R, Virella G, Lopes-Virella MF. Longitudinal Association Between Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Clotting Biomarkers With Subclinical Atherosclerosis in Type 1 Diabetes: An Evaluation of the DCCT/EDIC Cohort. *Diabetes Care* 2015 Jul;38(7):1281-9.
81. Kupfer R, Larrubia MR, Bussade I, Pereira JRD, Lima GAB, Epifanio MA, et al. Predictors of subclinical atherosclerosis evaluated by carotid intima-media thickness in asymptomatic young women with type 1 diabetes mellitus. *Arch Endocrinol Metab* 2017 Mar;61(2):115-21.
82. Colhoun HM, Schalkwijk C, Rubens MB, Stehouwer CD. C-reactive protein in type 1 diabetes and its relationship to coronary artery calcification. *Diabetes Care* 2002 Oct;25(10):1813-7.
83. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992 Jan 30;326(5):310-8.
84. Green D, Chan C, Kang J, Liu K, Schreiner P, Jenny NS, et al. Longitudinal assessment of fibrinogen in relation to subclinical cardiovascular disease: the CARDIA study. *J Thromb Haemost* 2010 Mar;8(3):489-95.
85. Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Jun;89(6):2563-8.

86. Vinagre I, Sanchez-Quesada JL, Sanchez-Hernandez J, Santos D, Ordonez-Llanos J, De LA, et al. Inflammatory biomarkers in type 2 diabetic patients: effect of glycemic control and impact of LDL subfraction phenotype. *Cardiovasc Diabetol* 2014 Feb 4;13:34.
87. Frystyk J, Tarnow L, Hansen TK, Parving HH, Flyvbjerg A. Increased serum adiponectin levels in type 1 diabetic patients with microvascular complications. *Diabetologia* 2005 Sep;48(9):1911-8.
88. Imagawa A, Funahashi T, Nakamura T, Moriwaki M, Tanaka S, Nishizawa H, et al. Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002 Sep;25(9):1665-6.
89. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003 Aug;26(8):2442-50.
90. Gardener H, Sjoberg C, Crisby M, Goldberg R, Mendez A, Wright CB, et al. Adiponectin and carotid intima-media thickness in the northern Manhattan study. *Stroke* 2012 Apr;43(4):1123-5.
91. Dullaart RP, de VR, van TA, Sluiter WJ. Lower plasma adiponectin is a marker of increased intima-media thickness associated with type 2 diabetes mellitus and with male gender. *Eur J Endocrinol* 2007 Mar;156(3):387-94.
92. Goksen D, Levent E, Kar S, Ozen S, Darcan S. Serum adiponectin and hsCRP levels and non-invasive radiological methods in the early diagnosis of cardiovascular system complications in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013 Sep 10;5(3):174-81.
93. Costacou T, Zgibor JC, Evans RW, Otvos J, Lopes-Virella MF, Tracy RP, et al. The prospective association between adiponectin and coronary artery disease among individuals with type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia* 2005 Jan;48(1):41-8.
94. Hadjadj S, Aubert R, Fumeron F, Pean F, Tichet J, Roussel R, et al. Increased plasma adiponectin concentrations are associated with microangiopathy in type 1 diabetic subjects. *Diabetologia* 2005 Jun;48(6):1088-92.
95. Maahs DM, Ogden LG, Kinney GL, Wadwa P, Snell-Bergeon JK, Dabelea D, et al. Low plasma adiponectin levels predict progression of coronary artery calcification. *Circulation* 2005 Feb 15;111(6):747-53.
96. Sherief EM, Amr NH, Adly AA, Gharib H. Do children with type 1 diabetes have a relation between adiponectin level and vascular complications? *Pediatr Endocrinol Rev* 2014 Jun;11(4):383-9.
97. Yazici D, Yavuz D, Ogunc AV, Sirikci O, Toprak A, Deyneli O, et al. Serum adipokine levels in type 1 diabetic patients: association with carotid intima media thickness. *Metab Syndr Relat Disord* 2012 Feb;10(1):26-31.
98. Sakamoto F, Katakami N, Kaneto H, Yasuda T, Takahara M, Miyashita K, et al. Association of serum YKL-40 levels with urinary albumin excretion rate in young Japanese patients with type 1 diabetes mellitus. *Endocr J* 2013;60(1):73-9.

99. Forsblom C, Thomas MC, Moran J, Saraheimo M, Thorn L, Waden J, et al. Serum adiponectin concentration is a positive predictor of all-cause and cardiovascular mortality in type 1 diabetes. *J Intern Med* 2011 Oct;270(4):346-55.
100. Rathcke CN, Vestergaard H. YKL-40--an emerging biomarker in cardiovascular disease and diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2009 Nov 23;8:61.
101. Nishikawa KC, Millis AJ. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res* 2003 Jul 1;287(1):79-87.
102. Bakirci EM, Unver E, Degirmenci H, Kivanc T, Gunay M, Hamur H, et al. Serum YKL-40/chitinase 3-like protein 1 level is an independent predictor of atherosclerosis development in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2015 Jun;43(4):333-9.
103. Ma WH, Wang XL, Du YM, Wang YB, Zhang Y, Wei DE, et al. Association between human cartilage glycoprotein 39 (YKL-40) and arterial stiffness in essential hypertension. *BMC Cardiovasc Disord* 2012 May 29;12:35.
104. Jafary F., Khamechi S.P., Talari H.R., SMR, Nikoueinejad H., Sehhat M. Correlation between serum YKL-40 and carotid intima media thickness in type 1 diabetics. *International Journal of Diabetes in Developing Countries* 2015 May 15;35:411-7.
105. Kim HM, Lee BW, Song YM, Kim WJ, Chang HJ, Choi DH, et al. Potential association between coronary artery disease and the inflammatory biomarker YKL-40 in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 2012 Jul 18;11:84.
106. Rathcke CN, Persson F, Tarnow L, Rossing P, Vestergaard H. YKL-40, a marker of inflammation and endothelial dysfunction, is elevated in patients with type 1 diabetes and increases with levels of albuminuria. *Diabetes Care* 2009 Feb;32(2):323-8.
107. Røndbjerg AK, Omerovic E, Vestergaard H. YKL-40 levels are independently associated with albuminuria in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2011 Jun 22;10:54.
108. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002 Apr 18;346(16):1221-31.
109. Vendhan R, Amutha A, Anjana RM, Unnikrishnan R, Mohan V. Clinical profile of nonalcoholic Fatty liver disease among young patients with type 1 diabetes mellitus seen at a diabetes speciality center in India. *Endocr Pract* 2014 Dec;20(12):1249-57.
110. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Pichiri I, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *J Hepatol* 2010 Oct;53(4):713-8.
111. Targher G, Mantovani A, Pichiri I, Mingolla L, Cavalieri V, Mantovani W, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of chronic kidney disease in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2014 Jun;37(6):1729-36
112. Mantovani A, Mingolla L, Rigolon R, Pichiri I, Cavalieri V, Zoppini G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular disease in adult patients with type 1 diabetes. *Int J Cardiol* 2016 Dec 15;225:387-91.

113. Petit JM, Pedro L, Guiu B, Duvillard L, Bouillet B, Jooste V, et al. Type 1 diabetes is not associated with an increased prevalence of hepatic steatosis. *Diabet Med* 2015 Dec;32(12):1648-51.
114. Caballeria L, Pera G, Auladell MA, Toran P, Munoz L, Miranda D, et al. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010 Jan;22(1):24-32.
115. Parés A, Tresserras R, Nuñez I, Cerralbo M, Plana P, Francisco-Javier P, et al. Prevalence and associated factors for fatty liver in apparent healthy adult men. *Med Clin* 2000 Jan 1.
116. Hamer OW, Aguirre DA, Casola G, Lavine JE, Woenckhaus M, Sirlin CB. Fatty liver: imaging patterns and pitfalls. *Radiographics* 2006 Nov;26(6):1637-53.
117. Rumack CM. *Diagnostic Ultrasound*. Rumack CM, editor. St Louis: Mosby. 1998. p. 110-2.
118. Kotronen A, Yki-Jarvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 Jan;28(1):27-38.
119. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005 May;115(5):1343-51.
120. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, et al. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2006 Jun;29(6):1325-30.
121. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010 Sep 30;363(14):1341-50.
122. Targher G, Marra F, Marchesini G. Increased risk of cardiovascular disease in non-alcoholic fatty liver disease: causal effect or epiphenomenon? *Diabetologia* 2008 Nov;51(11):1947-53.
123. Cakir E, Ozbek M, Colak N, Cakal E, Delibasi T. Is NAFLD an independent risk factor for increased IMT in T2DM? *Minerva Endocrinol* 2012 Jun;37(2):187-93.
124. Petit JM, Guiu B, Terriat B, Loffroy R, Robin I, Petit V, et al. Nonalcoholic fatty liver is not associated with carotid intima-media thickness in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 Oct;94(10):4103-6.
125. Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatol* 2008 Oct;49(4):600-7.
126. Kim SK, Choi YJ, Huh BW, Park SW, Lee EJ, Cho YW, et al. Nonalcoholic Fatty liver disease is associated with increased carotid intima-media thickness only in type 2 diabetic subjects with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 May;99(5):1879-84.
127. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Poli F, Scala L, Zenari L, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with carotid artery wall thickness in diet-controlled type 2 diabetic patients. *J Endocrinol Invest* 2006 Jan;29(1):55-60.
128. Kwak MS, Yim JY, Kim D, Park MJ, Lim SH, Yang JI, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with coronary artery calcium score in diabetes patients with higher HbA1c. *Diabetol Metab Syndr* 2015;7:28.

129. Zhang L, Guo K, Lu J, Zhao F, Yu H, Han J, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease is Associated with Increased Carotid Intima-Media Thickness in Type 1 Diabetic Patients. *Sci Rep* 2016 May 26;6:26805.
130. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De BG, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003 Jun;24(11):987-1003.
131. Marrugat J, D'Agostino R, Sullivan L, Elosua R, Wilson P, Ordovas J, et al. An adaptation of the Framingham coronary heart disease risk function to European Mediterranean areas. *J Epidemiol Community Health* 2003 Aug;57(8):634-8.
132. Stevens RJ, Kothari V, Adler AI, Stratton IM. The UKPDS risk engine: a model for the risk of coronary heart disease in Type II diabetes (UKPDS 56). *Clin Sci (Lond)* 2001 Dec;101(6):671-9.
133. Jimeno MJ, Molist BN, Franch NJ, Serrano B, V, Serrano BL, Gracia GR. [Variability in the calculation of coronary risk in type-2 diabetes mellitus]. *Aten Primaria* 2005 Jan;35(1):30-6.
134. Zgibor JC, Ruppert K, Orchard TJ, Soedamah-Muthu SS, Fuller J, Chaturvedi N, et al. Development of a coronary heart disease risk prediction model for type 1 diabetes: the Pittsburgh CHD in Type 1 Diabetes Risk Model. *Diabetes Res Clin Pract* 2010 Jun;88(3):314-21.
135. Zgibor JC, Orchard TJ, Saul M, Piatt G, Ruppert K, Stewart A, et al. Developing and validating a diabetes database in a large health system. *Diabetes Res Clin Pract* 2007 Mar;75(3):313-9.
136. Zheng ZJ, Sharrett AR, Chambless LE, Rosamond WD, Nieto FJ, Sheps DS, et al. Associations of ankle-brachial index with clinical coronary heart disease, stroke and preclinical carotid and popliteal atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis* 1997 May;131(1):115-25.
137. Newman AB, Shemanski L, Manolio TA, Cushman M, Mittelmark M, Polak JF, et al. Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 Mar;19(3):538-45.
138. Fowkes FG, Murray GD, Butcher I, Heald CL, Lee RJ, Chambless LE, et al. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA* 2008 Jul 9;300(2):197-208.
139. Wild SH, Byrne CD, Smith FB, Lee AJ, Fowkes FG. Low ankle-brachial pressure index predicts increased risk of cardiovascular disease independent of the metabolic syndrome and conventional cardiovascular risk factors in the Edinburgh Artery Study. *Diabetes Care* 2006 Mar;29(3):637-42.
140. Wyman RA, Keevil JG, Busse KL, Aeschlimann SE, Korcarz CE, Stein JH. Is the ankle-brachial index a useful screening test for subclinical atherosclerosis in asymptomatic, middle-aged adults?. *WMJ* 2006 Sep;105(6):50-4.
141. Vicente I, Lahoz C, Taboada M, Laguna F, Garcia-Iglesias F, Mostaza Prieto JM. [Ankle-brachial index in patients with diabetes mellitus: prevalence and risk factors]. *Rev Clin Esp* 2006 May;206(5):225-9.

142. Norman PE, Davis WA, Bruce DG, Davis TM. Peripheral arterial disease and risk of cardiac death in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Care* 2006 Mar;29(3):575-80.
143. Bagheri R, Schutta M, Cumaratunge RG, Wolfe ML, Terembula K, Hoffman B, et al. Value of electrocardiographic and ankle-brachial index abnormalities for prediction of coronary atherosclerosis in asymptomatic subjects with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2007 Apr 1;99(7):951-5.
144. Potier L, Abi KC, Mohammedi K, Roussel R. Use and utility of ankle brachial index in patients with diabetes. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011 Jan;41(1):110-6.
145. Chevitchouk L, Silva MHSD, Nascimento OJMD. Ankle-brachial index and diabetic neuropathy: study of 225 patients. *Arq Neuropsiquiatr* 2017 Aug;75(8):533-8.
146. Young MJ, Adams JE, Anderson GF, Boulton AJ, Cavanagh PR. Medial arterial calcification in the feet of diabetic patients and matched non-diabetic control subjects. *Diabetologia* 1993 Jul;36(7):615-21.
147. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* 1997 Sep 2;96(5):1432-7.
148. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol* 1997 Sep 15;146(6):483-94.
149. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007 Jan 30;115(4):459-67.
150. 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 Jun 18;105(24):2872-7.
151. Nagai Y, Metter EJ, Earley CJ, Kemper MK, Becker LC, Lakatta EG, et al. Increased carotid artery intimal-medial thickness in asymptomatic older subjects with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation* 1998 Oct 13;98(15):1504-9.
152. Brohall G, Oden A, Fagerberg B. Carotid artery intima-media thickness in patients with Type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance: a systematic review. *Diabet Med* 2006 Jun;23(6):609-16.
153. Temelkova-Kurktschiev TS, Koehler C, Leonhardt W, Schaper F, Henkel E, Siegert G, et al. Increased intimal-medial thickness in newly detected type 2 diabetes: risk factors. *Diabetes Care* 1999 Feb;22(2):333-8.
154. Bernard S, Serusclat A, Targe F, Charriere S, Roth O, Beaune J, et al. Incremental predictive value of carotid ultrasonography in the assessment of coronary risk in a cohort of asymptomatic type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2005 May;28(5):1158-62.
155. Frost D, Beischer W. Determinants of carotid artery wall thickening in young patients with Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1998 Oct;15(10):851-7.

156. Singh TP, Groehn H, Kazmers A. Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2003 Feb 19;41(4):661-5.
157. Effect of intensive diabetes treatment on carotid artery wall thickness in the epidemiology of diabetes interventions and complications. *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group. Diabetes* 1999 Feb;48(2):383-90.
158. Sun YP, Cai YY, Li HM, Deng SM, Leng RX, Pan HF. Increased carotid intima-media thickness (CIMT) levels in patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM): A meta-analysis. *J Diabetes Complications* 2015 Jul;29(5):724-30.
159. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco 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;23(1):75-80
160. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, Bild DE, Burke G, Folsom AR, et al. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med* 2008 Mar 27;358(13):1336-45.
161. Elkeles RS. Coronary artery calcium and cardiovascular risk in diabetes. *Atherosclerosis* 2010 Jun;210(2):331-6.
162. Shaw LJ, Raggi P, Schisterman E, Berman DS, Callister TQ. Prognostic value of cardiac risk factors and coronary artery calcium screening for all-cause mortality. *Radiology* 2003 Sep;228(3):826-33.
163. Youssef G, Kalia N, Darabian S, Budoff MJ. Coronary calcium: new insights, recent data, and clinical role. *Curr Cardiol Rep* 2013 Jan;15(1):325.
164. Simons DB, Schwartz RS, Edwards WD, Sheedy PF, Breen JF, Rumberger JA. Noninvasive definition of anatomic coronary artery disease by ultrafast computed tomographic scanning: a quantitative pathologic comparison study. *J Am Coll Cardiol* 1992 Nov 1;20(5):1118-26.
165. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Jr., Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990 Mar 15;15(4):827-32.
166. Wolfe ML, Iqbal N, Geftter W, Mohler ER, III, Rader DJ, Reilly MP. Coronary artery calcification at electron beam computed tomography is increased in asymptomatic type 2 diabetics independent of traditional risk factors. *J Cardiovasc Risk* 2002 Dec;9(6):369-76.
167. Elkeles RS, Godsland IF, Feher MD, Rubens MB, Roughton M, Nugara F, et al. Coronary calcium measurement improves prediction of cardiovascular events in asymptomatic patients with type 2 diabetes: the PREDICT study. *Eur Heart J* 2008 Sep;29(18):2244-51.
168. Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993 Sep 30;329(14):977-86.

169. Steffes M, Molitch M, Chavers B, Cleary P, Lachin J, Genuth S, et al. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA* 2003;290:2159–2167.
170. Elkeles RS, Feher MD, Flather MD, Godsland IF, Nugara F, Richmond W, et al. The association of coronary calcium score and conventional cardiovascular risk factors in Type 2 diabetic subjects asymptomatic for coronary heart disease (The PREDICT Study). *Diabet Med* 2004 Oct;21(10):1129-34.
171. Olson JC, Edmundowicz D, Becker DJ, Kuller LH, Orchard TJ. Coronary calcium in adults with type 1 diabetes: a stronger correlate of clinical coronary artery disease in men than in women. *Diabetes* 2000 Sep;49(9):1571-8.
172. Cleary PA, Orchard TJ, Genuth S, Wong ND, Detrano R, Backlund JY, et al. The effect of intensive glycemic treatment on coronary artery calcification in type 1 diabetic participants of the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study. *Diabetes* 2006 Dec;55(12):3556-65.
173. Colhoun HM, Rubens MB, Underwood SR, Fuller JH. The effect of type 1 diabetes mellitus on the gender difference in coronary artery calcification. *J Am Coll Cardiol* 2000 Dec;36(7):2160-7.
174. Salem M, Moneir I, Adly AM, Esmat K. Study of coronary artery calcification risk in Egyptian adolescents with type-1 diabetes. *Acta Diabetol* 2011 Mar;48(1):41-53.
175. Djaberi R, Schuijff JD, Boersma E, Kroft LJ, Pereira AM, Romijn JA, et al. Differences in atherosclerotic plaque burden and morphology between type 1 and 2 diabetes as assessed by multislice computed tomography. *Diabetes Care* 2009 Aug;32(8):1507-12.
176. Gimenez M, Gilabert R, Lara M, Conget I. Preclinical arterial disease in patients with type 1 diabetes without other major cardiovascular risk factors or micro-/ macrovascular disease. *Diab Vasc Dis Res* 2011 Jan;8(1):5-11.
177. Frost D, Beischer W. [Carotid artery wall changes in young type-1 diabetics. The ultrasonic diagnosis of early arteriosclerosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 1994 Sep 16;119(37):1225-30.
178. Aguilera E, Serra-Planas E, Granada ML, Alonso N, Pellitero S, Pizarro E, et al. Low prevalence of subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with type 1 diabetes in a European Mediterranean population. *Diabetes Care* 2014;37(3):814-20.
179. Serra-Planas E, Aguilera E, Granada ML, Soldevila B, Salinas I, Reverter JL, et al. High prevalence of vitamin D deficiency and lack of association with subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with Type 1 Diabetes Mellitus from a Mediterranean area. *Acta Diabetol* 2015 Aug;52(4):773-9.
180. 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 Sep 18;14:121.
181. Serra-Planas E, Aguilera E, Castro L, Rodriguez R, Salinas I, Lucas A, et al. Low prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 1 diabetes is associated with decreased subclinical cardiovascular disease. *J Diabetes* 2017 Dec;9(12):1065-72.

- 182.** Sans S, Kesteloot H, Kromhout D. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur Heart J* 1997 Dec;18(12):1231-48.
- 183.** Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013 Apr 4;368(14):1279-90.
- 184.** Gray JA. New concepts in screening. *Br J Gen Pract.* 2004 Apr;54(501):292-8.
- 185.** Greer RM, Portelli SL, Hung BS, Cleghorn GJ, McMahon SK, Batch JA, et al. Serum vitamin D levels are lower in Australian children and adolescents with type 1 diabetes than in children without diabetes. *Pediatr Diabetes* 2013 Feb;14(1):31-41.
- 186.** Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol.* 1988 Jun;124(6):869-71.