



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**ATEROSCLEROSIS PRECLÍNICA
EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2
DE RECIENTE DIAGNÓSTICO**

Trabajo presentado por:

Marta María Catalán Adell

Para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Directores de Tesis:

Dr. Emilio Ortega Martínez de Victoria
Dr. Antoni Sisó Almirall

Barcelona, 2017

“Quien se atreva a enseñar, nunca debe dejar de aprender”

John Cotton

A Carla y Blanca,

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director de tesis, el Dr. Emilio Ortega Martínez de Victoria, por su inestimable ayuda en la realización de esta tesis. Siempre le estaré en deuda.

A mi co-director de tesis, el Dr. Antoni Sisó Almirall, responsable de que iniciara el camino de la tesis. Sin su impulso inicial, no hubiera llegado hasta aquí.

Quiero agradecer también especialmente, a “mis compañeras de FIS”, la Dra. Zoe Herreras y la Dra. Montse Pinyol. Su trabajo, dedicación y exigencia han permitido que este trabajo se haya podido realizar.

Al Dr. Antonio Amor y al Dr. Aleix Sala, colaboradores indispensables para que esta tesis se haya llevado a cabo.

Al Dr. Jacinto Ortiz, mi tutor de la residencia; creo que tuve el mejor de los tutores tanto por su faceta profesional, como por su calidad humana. De verdad, gracias.

A todos los compañeros del CAPSBE, por su colaboración en la inclusión de pacientes.

A todo el equipo de enfermería de CAPSBE, principalmente a las enfermeras del CAP Borrell y a la auxiliar clínica, Ester Domínguez.

A mis compañeros del CAP Casanova por su apoyo y aliento para que finalizara esta tesis. Sois un equipo magnífico tanto a nivel profesional como personal. Siempre diré que trabajar en un grupo tan estupendo, es la mayor suerte que una puede tener.

A mis amigas del CAP Casanova, Dra. Ethel Sequeira y Dra. Isabel Boix, por su incondicional apoyo y amistad. Gracias por los buenos momentos que paso con vosotras.

A mis directoras del CAP, Dra. Anna Pereira y Dra. Elisenda Sant. Siempre me habéis hecho sentir apoyada y valorada en mi trabajo.

Al Dr. Jaume Benavent, Dra. Laura Sebastián y Dr. Rafael Ruiz, por brindarme la posibilidad de realizar este proyecto y darme todas las facilidades para su realización. Quiero mencionar en especial al Dr. Jaume Benavent, que confió en mí para trabajar en el CAP Casanova.

A los residentes que he tutelado, Dr. Frank Palacios, Dra. Carmen Goicoa y Dra. Alba Herrero. De cada uno de ellos he aprendido más de lo que yo les he podido enseñar. Estoy muy orgullosa de todos ellos.

En el ámbito más personal,

A mis padres, no tengo palabras para agradecerles todo lo que han supuesto para mí. Lo han sido, son y serán todo para mí.

A mi marido Jenaro y a mis hijas Carla y Blanca; sois la familia que siempre soñé. Me siento la persona más afortunada del mundo por teneros a mi lado.

A mi hermano Albert, compañero de aventuras en la infancia y amigo incondicional. Siempre estaré ahí cuando me necesites.

A mi tía Pilar y mi tío Joan, sois los dos una parte muy importante en mi vida, os quiero mucho.

A mis abuelos, su memoria y recuerdo me hacen ser cada día mejor persona. Espero que estéis orgullosos de mí.

A todos mis amigos. Su amistad ha sido indispensable para ser la persona que soy.

A todos los que me dejo, que seguro serán muchos, y que han compartido conmigo penas y alegrías, llantos y risas.

ÍNDICE

1. Introducción.....	11
1.1. Prevalencia, datos epidemiológicos, costes y complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus.....	11
1.2. El riesgo cardiovascular en la Diabetes Mellitus tipo 2: La enfermedad cardiovascular como complicación de la Diabetes Mellitus tipo 2.....	13
1.2.1. Causas del incremento del riesgo cardiovascular.....	14
1.2.2. ¿Cuándo aparece la enfermedad cardiovascular?.....	16
1.2.3. Objetivos de tratamiento.....	16
1.2.4. Tratamiento farmacológico y modificación del estilo de vida en la reducción del riesgo cardiovascular en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.....	20
1.2.5. Prevalencia de la enfermedad cardiovascular en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.....	23
1.3. Fisiopatología de la aterosclerosis: ¿Un proceso ya en marcha en los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 en el momento del diagnóstico?.....	24
1.4. La Dislipemia Aterógena o Dislipemia Diabética.....	27
1.5. Evaluación actual del riesgo cardiovascular en el paciente con Diabetes Mellitus tipo 2: Estrategias.....	32
1.6. Biomarcadores/detección de aterosclerosis en la evaluación de la enfermedad cardiovascular.....	37
1.6.1. Biomarcadores circulantes.....	37
1.6.2. Índice Tobillo-Brazo.....	39
1.6.3. Calcio Coronario.....	40
1.6.4. La ecografía carotídea para la valoración de la enfermedad cardiovascular.....	43
1.6.4.1. El Grosor de Íntima Media Carotídea.....	43
1.6.4.2. La Placa Carotídea.....	45
2. Justificación e Hipótesis de Trabajo.....	48
3. Objetivos.....	52

4. Resumen breve Artículos.....	53
4.1. Prevalence by sex of preclinical carotid atherosclerosis in newly diagnosed type 2 diabetes.....	53
4.2. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in newly-diagnosed type 2 diabetes and their association with preclinical carotid atherosclerosis.	56
4.3. The proportion of total C18:1 trans-fatty acids in red blood cell membranes relates to carotid plaque prevalence.....	58
5. Discusión.....	60
6. Conclusiones.....	76
7. Bibliografía.....	77
8. Anexos: Artículos.....	91

ABREVIATURAS

AACE: American Association of Clinical Endocrinologist

AAS: Ácido acetilsalicílico

ABCD: Appropriate Blood Pressure Control in Diabetes

ACC: American College of Cardiology

ACE: American College of endocrinology

ADA: American Diabetes Association

ADVANCE: Action in Diabetes and Cardiovascular Disease

AHA American Heart Association

AHA: American Heart Association

ApoB: Apolipoproteína B

ARIC: Atherosclerosis Risk in Communities

ASCEND: Study of Cardiovascular Events iN Diabetes

AVC: Accidente vascular cerebral

BNPs: Péptido natriurético tipo B

CAC: Score de Calcio coronario

CAPS: Carotid Atherosclerosis Progression Study

CARDS: Collaborative Atorvastatin Diabetes Study

CETP: Proteína transportadora de ésteres de colesterol

DM: Diabetes Mellitus

DM1: DM tipo 1

DM2: DM tipo 2

DMDEBUT: Diabetes Mellitus de reciente diagnóstico

EAP: Enfermedad arterial periférica

EASD : European Association for the Study of Diabetes

FDA: Food and Drug Administration

FRCV: Factores de riesgo cardiovascular

GBA: Glucemia basal alterada

GIMC: Grosor de intima media de la carótida

HbA1c: Hemoglobina glicosilada

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HOPE: Heart Outcomes Prevention Evaluation

HTA: Hipertensión arterial

HVI: Hipertrofia del ventrículo izquierdo

IAM: Infarto agudo de miocardio

IECA: Inhibidores del Enzima de conversión de la angiotensina

IMC: Índice de masa corporal

ITB: Índice tobillo-Brazo

LADA: Latent Autoimmune Diabetes in Adults

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LIFE: Intervention for the End point reduction in hypertension study

MAU: Microalbuminuria

NICE: National Institute of Care and Excellence

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds ratio

PA: Presión arterial

PAPPS: Programa de prevención primaria de salud

PC: Placa carotídea

PCR: Proteína C reactiva

PCSK9: Proproteína sérica convertasa subtilisina/hexina tipo 9

PREDIMED:

RCV: Riesgo cardiovascular

REGICOR: Registre gironí del cor

RMN: Resonancia magnética nuclear

SCORE: Systematic Coronary Risk Evaluation

TGA: Tolerancia a la glucosa alterada

TNT: Treating to New Targets

UKPDS: UK Prospective Diabetes Study

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Prevalencia, datos epidemiológicos, costes y complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus.

La Diabetes Mellitus (DM) es una de las enfermedades más prevalentes en los pacientes atendidos en Atención Primaria. Se trata de una alteración metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica debido a un desequilibrio entre la sensibilidad a la insulina y la secreción insuficiente (total o relativa) de la misma. Los criterios diagnósticos definidos por la American Diabetes Association (ADA 2017)¹ incluyen: a) glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dl, b) Hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6,5\%$, c) Glucemia al azar mayor de 200 (estos valores confirmados en 2 determinaciones) y d) valores de glucemia tras 2 h de la sobrecarga oral de glucosa ≥ 200 mg/dl. Los dos tipos de diabetes más frecuentes son la DM tipo 1 (DM1) y DM tipo 2 (DM2). Otras formas de DM menos frecuentes incluyen la DM gestacional, las diabetes monogénicas (causadas por mutaciones genéticas específicas que afectan al normal funcionamiento de la célula beta pancreática), y la diabetes tipo LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults), una diabetes autoinmune del adulto con un fenotipo más próximo a la DM1 que al de la DM2.

La DM2 es la forma más común de diabetes. Se caracteriza por un el déficit relativo de producción de insulina y una deficiente utilización de la glucosa por los tejidos. Se desarrolla a menudo en etapas adultas de la vida, y es muy frecuente la asociación con otros factores de riesgo cardiovascular como la obesidad, la hipertensión y la dislipemia. La DM2 representa un 90% de todos los pacientes con diabetes mellitus. La edad avanzada, la obesidad, los antecedentes familiares de diabetes, determinadas etnias (latinoamericanas, asiáticas), el sedentarismo, el nivel socioeconómico bajo, la

tolerancia alterada a la glucosa, la hipertensión arterial y la hiperlipidemia, son todos factores de riesgo que se asocian con el desarrollo de la DM2.

Según el Informe Mundial de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de Abril 2016, 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980². La prevalencia mundial, normalizada por edades, casi se ha duplicado desde ese año, pues ha pasado del 4,7% al 8,5% en la población adulta. Además se prevé que se duplicará en los próximos 20 años. En nuestro país, los resultados del estudio epidemiológico de ámbito nacional Di@bet.es³ del 2012, estimó que la prevalencia global de la enfermedad era de un 13,6%, un 6% era desconocida, existía una prevalencia de glucemia basal alterada de 3,4% y de tolerancia anormal a la glucosa del 9,2%. En general, casi un 30% de la población presentaba algún trastorno (diabetes o prediabetes) relacionado con el metabolismo de los hidratos de carbono. En España la incidencia estimada de diabetes según estudios locales o autonómicos, se encuentra entre 8-19 casos/1000 habitantes/año. La extensión del estudio Di@bet.es, actualmente en marcha, podrá dar un dato más preciso a nivel nacional próximamente.

Además del impacto de la diabetes en la salud y la calidad de vida de las personas, el coste sanitario de la enfermedad en nuestro sistema de salud es importante. Se estima que el coste anual (incluyendo visitas a atención primaria, hospitalizaciones, derivaciones a otras especialidades, analíticas, tiras reactivas de glucemia, medicación y programas de diálisis) de un paciente con DM2 en España es aproximadamente 3.110 € (frente a los 1.803 € de pacientes sin DM2)⁴. La Enfermedad Cardiovascular (ECV) es responsable de la mayor parte de este gasto sanitario⁵ y la principal causa de mortalidad atribuida a las complicaciones crónicas de la DM.

1.2. El Riesgo Cardiovascular en la DM2: La ECV como complicación de la DM2.

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de mortalidad en personas con diabetes. Los pacientes con DM2 tienen entre 2 a 6 veces más riesgo^{6,7,8} de padecer una ECV que los sujetos sin DM2, y algunos investigadores han estimado que es comparable al de haber padecido un infarto agudo de miocardio (IAM) previamente⁹, aunque existe controversia^{10,11} en este sentido y es posible que esto no aplique ni a todas las poblaciones, ni sea igual en hombres que en mujeres¹².

Diferentes metaanálisis han confirmado sobre una muestra total de 450.000 pacientes de 37 estudios prospectivos, que el riesgo relativo de mortalidad coronaria es superior en personas con DM2, hombres y mujeres, tras ajustar por otros factores de riesgo cardiovascular (FRCV)¹³. Además este riesgo relativo es superior en las mujeres postmenopáusicas respecto a los hombres, y es superior (paradójicamente) en personas más jóvenes (<55 años), y en particular aquellos que presentan enfermedad renal (microalbuminuria (MAU) >30mg/gr)¹⁴.

Además de ser más prevalente, la enfermedad cardiovascular es más agresiva y tiene un peor pronóstico en este grupo de pacientes. Los individuos con diabetes tienen lesiones coronarias más extensas y la enfermedad coronaria un peor pronóstico que en los individuos sin diabetes, sobretodo en pacientes mujeres^{15,13} en la postmenopausia y en pacientes jóvenes. El hecho de que la enfermedad coronaria curse de forma asintomática con más frecuencia que en la población general, y que contribuya por tanto al retraso en el diagnóstico, puede explicar, en parte, este peor pronóstico.

1.2.1. Causas del incremento del riesgo cardiovascular.

Los motivos por los que la DM se asocia a este mayor riesgo de ECV son múltiples y muchos de ellos aún no se conocen con precisión.

Los datos epidemiológicos del estudio United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)¹⁶, mostraban que en el momento del diagnóstico, los pacientes con DM2, además de la edad y el género, presentaban una alta prevalencia de factores de riesgo para ECV modificables: elevación del LDL, HDL bajo, hiperglucemia, hipertensión y tabaco. Esta mayor prevalencia de otros FRCV parece ser un factor relevante. Existe mayor prevalencia de hipertensión en personas con diabetes, con un mayor porcentaje de pacientes recibiendo hipotensores, pero un menor porcentaje de ellos bien controlados. Se ha descrito un mayor porcentaje de pacientes con hipertrofia ventrículo izquierdo, y/o disfunción del mismo, asociado a la hipertensión de larga evolución. En relación al tabaquismo parece, sin embargo, que el diagnóstico de diabetes se asocia a mayor probabilidad de éxito de abandono del tabaco. Otros factores de riesgo peor conocidos y cuantificados, incluyen la inflamación crónica, la esteatosis hepática, la predisposición genética, la dieta inadecuada y la inactividad física.

Sin embargo, si nos centramos en aspectos más propios de la diabetes por los que se hipotetiza que la ECV es más prevalente, cabe destacar los siguientes:

- a. Obesidad : En el estudio Di@bet.es³ la presencia de obesidad se observaba en un 53% de los pacientes con diabetes frente al 26% de los que no la presentaban.
- b. Dislipemia aterogénica (ver en siguientes apartados).
- c. Hipoglucemia¹⁷: En el estudio Action in Diabetes and Cardiovascular Disease (ADVANCE)¹⁸, la hipoglucemia grave estuvo claramente asociada con un riesgo

mayor de eventos macrovasculares, eventos microvasculares y muerte por causas cardiovasculares y no cardiovasculares. Esta relación también ha sido bien establecida en los pacientes que están recibiendo insulina¹⁷.

- d. Fármacos asociados al tratamiento: No sólo la hipoglucemia, sino que algunos fármacos hipoglucemiantes pueden condicionar un mayor riesgo de eventos cardiovasculares. Este parece que fue el caso de rosiglitazona que fue retirada del mercado por este motivo¹⁹. Por esta causa, desde el año 2008, y siguiendo una normativa específica de la Food and Drug Administration (FDA), todos los fármacos hipoglicemiantes deben de contar con un estudio de seguridad cardiovascular.
- e. Duración de la DM2: Una de las variables con mayor impacto en el riesgo de enfermedad cardiovascular es la duración de la DM. Datos longitudinales del estudio Framingham sugieren que por cada 10 años de duración de la DM, el riesgo relativo de enfermedad coronaria es 1,38 veces mayor [IC 95% 0,99- 1,92] y el riesgo de mortalidad por esta misma causa es 1,86 veces más alto [IC 95% 1,17-2,93]²⁰.

1.2.2. ¿Cuándo aparece la Enfermedad Cardiovascular?

Otro de los aspectos poco conocidos de la asociación entre diabetes y enfermedad cardiovascular es su relación temporal. Estudios epidemiológicos indican que este riesgo ya se inicia en las etapas más tempranas, aun en fase de prediabetes: Tolerancia a la glucosa alterada (TGA), la glucemia basal alterada (GBA) o la hemoglobina glicosilada entre 5,7 y 6,4%)^{21,22,23,24,25}.

Un reciente metaanálisis²⁶ comparó la normoglucemia con la prediabetes y demostró que la prediabetes está asociada a un mayor riesgo cardiovascular (RCV) (Riesgo relativo (RR) 1,13 y 1,30 para TGA y GBA respectivamente), enfermedad coronaria (RR 1,10 y 1,20, respectivamente), accidente vascular cerebral (AVC) (RR 1,06 y 1,20, respectivamente), y todas las causas de mortalidad (RR 1,13, y 1,32, respectivamente).

La prediabetes, por tanto, no sólo predispone a la aparición de diabetes, sino también a la progresión/aparición de sus complicaciones crónicas, incluida la enfermedad cardiovascular. Por tanto, aunque los puntos de corte para el diagnóstico de diabetes se basan en niveles a partir de los cuales puede detectarse retinopatía, cabría preguntarse también cuando comienza el desarrollo de la enfermedad cardiovascular en la diabetes y por tanto si existen formas más precisas de realizar el diagnóstico de la misma (apartado posterior).

1.2.3. Objetivos de tratamiento.

Es bien conocido que en el tratamiento para disminuir la mortalidad por ECV y por todas las causas en los pacientes con DM2, son muy importantes las intervenciones intensivas sobre los otros FRCV, tales como, el cese del hábito tabáquico, la reducción de la presión arterial (PA) y el control de los lípidos. Entre ellos, el LDL es,

posiblemente, el predictor más potente de enfermedad coronaria en los pacientes con DM2, y por tanto, junto con el control de PA, objetivos terapéuticos prioritarios en estos pacientes.

No parece ocurrir lo mismo en cuanto al control intensivo de la glucemia. Los estudios UKPDS (en pacientes con DM2) y DCCT²⁷ (en pacientes DM1) habían demostrado los beneficios en el control precoz e intensivo de la glucosa en pacientes diabéticos, pero los estudios ACCORD²⁸, ADVANCE y VADT²⁹ mostraron que ese control intensivo de la glucemia no parecía ser beneficioso, en cuanto a ECV y mortalidad, e incluso podía ser perjudicial, en etapas más avanzadas de la enfermedad.

En el post-estudio de seguimiento del UKPDS³⁰, una población de diabetes de reciente diagnóstico, demostraron que los beneficios se mantenían en el tiempo en cuanto a las complicaciones microvasculares, pero también aparece, y surge aquí el concepto de legado metabólico, un beneficio en cuanto a la reducción de IAM y mortalidad por causa cardiovascular (que al inicio del ensayo no resultaron significativos). Similar observación se hizo con pacientes con diabetes tipo 1 en los estudios DCCT y EDIC.

En el estudio ADVANCE-ON³¹ (población de mayor edad, tiempo de evolución y complicaciones), post ensayo del estudio ADVANCE, no se demostró que este control intensivo de la hiperglucemia, produjera el ansiado efecto legado. Sí demostraron, sin embargo, el beneficio del control intensivo de la PA en la mortalidad total y cardiovascular en pacientes DM2. Además de pacientes de reciente diagnóstico, el control intensivo de la glucemia también parece ser un factor protector, aunque de menor intensidad que la PA o el control de LDL. Este parece ser el caso de los pacientes con diabetes y enfermedad renal incipiente como nos muestra el estudio STENO ^{32,33},

donde se concluye que el tratamiento intensivo multifactorial reduce la mortalidad y la ECV en este subgrupo de pacientes. Lo que se concluyó después de los post-estudios de seguimiento (UKPDS, EDIC, ADVANCE-ON) es que este control intensivo y precoz parece beneficiar principalmente a los pacientes relativamente jóvenes, con diabetes de corta evolución y sin complicaciones asociadas.

Tabla1. Objetivos multifactoriales de la ADA 2017

Objetivos de Control		Nivel Recomendación
Hb glicosilada	<7%	A
	<6,5% en individuos seleccionados o DM diagnóstico reciente	C
	<8 en pacientes ancianos, frágiles, riesgo hipoglucemia grave, esperanza de vida reducida, comorbilidades.	B
P.A	<140/90	A
	<130/80 si alto RCV	C
Colesterol	1.Si ECV: Estatina Alta intensidad y si no alcanza objetivo asociar ezetimiba	A
	2.Si no ECV pero sí FRCV y 40-75años: Estatina alta intensidad	A
	3.Si no ECV, no FRCV y 40-75 años: Estatina moderada o alta intensidad	A
	4.Si no ECV, no FRCV >75 años: Estatina moderada intensidad o alta intensidad	B
Triglicéridos/HDL	1.Si TG>150 y/o HDL <40 varones/<50 mujeres: intensificar medidas no farmacológicas y control glucémico	C
	2.Si TG>500 buscar causa secundaria y tratar para no presentar pancreatitis	C
	3.En Varones jóvenes y TG>204 y HDL <34 podría considerarse iniciar Fenofibrato	B

FRCV: Tabaco, HTA, LDL >100, Sobrepeso, Obesidad, Antecedentes familiares de ECV prematura

Estatinas Alta intensidad: Atorvastatina 40-80mg, Rosuvastatina 20-40mg
Estatinas moderada intensidad: Atorvastatina 10-20mg, Rosuvastatina 5-10mg, Simvastatina 20-40mg, Pravastatina 40-80mg, Lovastatina 40mg, Fluvastatina 80mg, Pitavastatina 2-4mg.

1.2.4 Tratamiento farmacológico y modificación del estilo de vida en la reducción del RCV en pacientes con DM2

Es conocido que el hecho de focalizar en el control individualizado de la DM2 y otros FRCV asociados a la DM2 reduce el RCV, pero este beneficio es aún mayor, si se tratan de manera simultánea y sinérgica la hiperglucemia y los otros FRCV como la dislipemia y la PA. Esta hipótesis está sustentada en el estudio STENO-2 y posteriormente con el BARI-2D.

Los tratamientos de los que existe una evidencia en la capacidad de reducción del RCV en pacientes con DM2 se pueden resumir en los siguientes apartados:

- a. Estatinas: Existe una fuerte evidencia de que el tratamiento con estatinas reduce el RCV y la mortalidad en los pacientes con DM2³⁴. Disminuir en 39mg/dL la cifra de LDL en pacientes de alto riesgo reduce la mortalidad del riesgo coronario en un 21%^{35,36}. En el estudio Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS) y el estudio Treating to New Targets (TNT) mostraron un 37% y un 25%, respectivamente de reducción de eventos CV en pacientes con DM2. A pesar de la recomendación de tratar a una gran mayoría de los pacientes con DM2 con una estatina, existe el debate sobre si esto ha de hacerse desde el inicio de la enfermedad, y la preocupación por los posibles efectos adversos incluida el incremento de la incidencia de DM³⁷ o empeoramiento del control glicémico en pacientes con DM.
- b. Hipolipemiantes no-estatinas. El estudio IMPROVE-IT demostró que la asociación de una estatina (simvastatina) con ezetimiba era superior en reducción de nuevos eventos cardiovasculares frente a estatina sola en pacientes de muy alto riesgo cardiovascular, y este beneficio parecía ser incluso superior en el

subgrupo de pacientes con DM2³⁸. También el efecto protector de los fibratos ha sido evaluados (ver capítulo de Dislipemia diabética). Más recientemente han aparecido los inhibidores de la PCSK9 (alirocumab, evolocumab) que no han demostrado de momento tener un mayor o menor beneficio en pacientes con diabetes en comparación con la población general.

- c. Hipotensores: La prevalencia de hipertensión arterial (HTA) en los pacientes con DM2 es muy elevada. Su asociación eleva el riesgo de complicaciones tanto micro como macrovasculares en pacientes con DM2¹⁶. Los estudios Appropriate Blood Pressure Control in Diabetes (ABCD)³⁹ y el Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE)⁴⁰ demostraron que los inhibidores del enzima de conversión de la angiotensina (IECA) eran beneficiosos para la reducción de ECV en pacientes con DM2. También el losartan en el estudio Losartan Intervention for the End point reduction in hypertension study (LIFE)⁴¹ demostró su capacidad de reducción de ECV.
- d. Antiagregantes: El beneficio del ácido acetilsalicílico (AAS) en pacientes con DM2 en prevención primaria sigue siendo controvertido, en cambio la evidencia es clara en pacientes con DM2 y presencia de ECV. Por este motivo, las distintas evidencias hasta el momento no avalan el tratamiento con AAS de los pacientes con DM2 en prevención primaria⁴², a pesar de ello la American Diabetes Association (ADA), y la American Heart Association (AHA) refieren que podría considerarse su uso a dosis bajas en pacientes mayores de 50 años en prevención primaria en los pacientes con al menos un factor de riesgo cardiovascular adicional y riesgo a 10 años mayor de 10%, siempre que no esté aumentado el riesgo de sangrado (grado recomendación C). Se espera próximamente los resultados del estudio Study of Cardiovascular Events in

Diabetes (ASCEND) sobre los efectos de bajas dosis de AAS en prevención de ECV en más de 15.000 pacientes con DM2.

- e. Cambios en el estilo de vida: A pesar que el estudio Look AHEAD⁴³ no demostró una reducción del RCV con una intervención sobre estilos de vida intensivos frente a uno convencional, sí que mostró beneficios como la disminución de las complicaciones renales, la reducción del IMC y la mejora del control glicémico con la posterior disminución de la necesidad de ADO, lo cual repercute en el RCV y mejora la calidad de vida de estos pacientes. Sin embargo, en el estudio PREDIMED⁴⁴ realizado en pacientes con RVC elevado (la mitad de ellos con DM2), la dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra o frutos secos redujo de forma significativa la incidencia de eventos cardiovasculares.
- f. Hipoglucemiantes no insulínicos: El estudio UKPDS demostró el beneficio cardiovascular de la metformina, pero en un pequeño número de pacientes⁴⁵. A raíz de los efectos adversos sobre el RCV de la Rosiglitazona, la FDA en 2008 dictaminó que todos los nuevos antidiabéticos orales debían mostrar su seguridad cardiovascular. Recientes estudios han demostrado el beneficio cardiovascular de algunos fármacos más allá de su efecto hipoglucemiante como la Empagliflozina (SGLT2 inhibidor)⁴⁶, y la liraglutida⁴⁷. Se esperan resultados de una decena al menos de estudios de seguridad cardiovascular de fármacos no insulínicos en los próximos años.

1.2.5. Prevalencia de la ECV en pacientes con reciente diagnóstico de DM2

Finalmente, si nos referimos a la prevalencia de la ECV clínica en pacientes con DM2, se ha estimado que puede llegar a un porcentaje importante de pacientes, en función del tiempo de evolución de la enfermedad.

Pero, actualmente son escasos los estudios que la hayan valorado en el momento del diagnóstico. En el estudio UKPDS, la prevalencia de ECV en el momento de la inclusión del estudio (pacientes <65 años de reciente diagnóstico), fue tan solo del 3,4%, en cambio en el estudio de Hoorn⁴⁸ (Holanda) en pacientes de 50 a 75 años diagnosticados en consultas de atención primaria entre 1999 y 2001, fue del 37,7%. En Reino Unido, la cohorte del SOUL-D presentó enfermedad cardiovascular clínica en menos del 10% (12,7% en pacientes de raza blanca) y el 33% de los pacientes tenían al menos una complicación microvascular⁴⁹. En España, en un estudio realizado en el País Vasco por la red de médicos centinelas, fue del 22%⁵⁰ y en un estudio realizado en un centro de atención primaria en Barcelona fue del 16% durante el año siguiente al diagnóstico⁵¹.

1.3. Fisiopatología de la aterosclerosis: ¿un proceso ya en marcha en los pacientes con DM2 en el momento del diagnóstico?

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico que afecta a la pared de las arterias a lo largo de la vida. Este proceso se desarrolla en varias fases, iniciándose en la capa íntima arterial, y posteriormente afectando al resto de las capas arteriales. Existen múltiples factores moleculares y celulares que participan en el desarrollo de la aterosclerosis⁵².

En una primera etapa, existe el acúmulo de colesterol circulante en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL). La oxidación del colesterol LDL da lugar a metabolitos proinflamatorios, iniciándose una reacción inflamatoria local en la íntima arterial, que da lugar a un progresivo engrosamiento de la misma. La inflamación del endotelio vascular provoca la expresión de moléculas de adhesión, favoreciendo el reclutamiento de monocitos, mastocitos, neutrófilos y linfocitos. Es entonces, cuando las células musculares lisas de la íntima activadas, comienzan a secretar la matriz extracelular de proteoglicanos, colágeno y fibras elásticas. Además los monocitos se diferencian en macrófagos y se transforman en células espumosas tras la captación masiva de colesterol. Este nivel de acumulación de colesterol es la pieza clave para el desarrollo de la aterosclerosis. Cuando se inicia el acúmulo extracelular de núcleos lipóideos, se inicia el engrosamiento intimal patológico. Este proceso inflamatorio aterosclerótico junto con el acúmulo progresivo de lípidos provoca una necrosis celular que va destruyendo la estructura de la íntima y va dando lugar a la placa de ateroma. La placa de ateroma está formada por un núcleo lipóideo separado del torrente circulatorio por una cápsula fibrosa. La placa de ateroma crece y se desarrolla de forma regular o irregular. A medida que la placa crece, produce una desestructuración de las capas

media y adventicia. La secreción de mediadores inflamatorios y la producción de metaloproteasas debilitan la cápsula externa de la placa. La rotura o erosión conduce a la formación del trombo rico en plaquetas que se extiende a la luz vascular. El acúmulo de calcio se produce de forma progresiva a lo largo de todo este proceso.

En los pacientes con DM, este proceso se encuentra acelerado, y ya se inicia cuando aún el diagnóstico de pre-diabetes o de diabetes no está establecido, pero no se conoce con precisión, el porqué de esta aceleración. De hecho, aunque la evidencia es insuficiente, se ha reportado una prevalencia de ECV preclínica en pacientes con prediabetes y/o diabetes de reciente diagnóstico^{53,54}. Los pacientes con DM presentan mayor presencia de placa de ateroma, y de mayor volumen, y presentan menor diámetro del orificio de las arterias coronarias que las personas que no tienen DM⁵⁵.

Desde un punto de vista fisiopatológico existen varias alteraciones metabólicas en pacientes con diabetes relacionadas con la mayor prevalencia de aterosclerosis^{56 57}, siendo quizá los más destacados, o mejor conocidos, los siguientes:

- a. La hiperglicemia: Se estima que por cada 1% de aumento de la hemoglobina glicosilada, el RCV aumenta del 11 al 16%³⁰ y ocurre lo mismo con aumentos de glucemia de 18mg/dL con aumentos del 12% de este riesgo¹³.
- b. La resistencia a la insulina/hiperinsulinemia: Presente en estadios muy iniciales de la enfermedad y con múltiples estudios que la asocian con un RCV mayor⁵⁸.
- c. La hipercoagulabilidad: Por la elevada presencia en sangre de factores procoagulantes y otras proteínas protrombóticas que condicionan un mayor riesgo de trombosis⁵⁹.
- d. La inflamación: La diabetes es una enfermedad crónica inflamatoria de bajo grado y son muchos los estudios que han evidenciado que los pacientes con diabetes tienen concentraciones más elevadas de diferentes biomarcadores inflamatorios⁶⁰. Estos

biomarcadores como la Proteína C reactiva (PCR), no sólo están aumentados, sino que además predicen la presencia de ECV⁶¹, una enfermedad inflamatoria en si misma.

- e. La disfunción endotelial asociada a la DM: La función endotelial está atenuada en la DM2⁶², y esta disfunción acelera el proceso aterosclerótico.
- f. La aceleración de la calcificación vascular en la DM: Los pacientes con DM2 tienen de manera más frecuente lesiones ateroscleróticas calcificadas⁶³. Además presentan mayor calcificación de las arterias coronarias que los pacientes sin DM2, y similar presencia de placa carotídea que los pacientes más mayores sin DM2⁶⁴.
- g. La dislipemia: El 60-70% de los pacientes con DM2 presentan alteraciones en el perfil lipídico⁶⁵, y de manera característica, estos pacientes presentan una dislipemia especialmente aterogénica, también llamada dislipemia diabética.

1.4. La Dislipemia Aterogénica o Dislipemia Diabética

Los pacientes con DM2 presentan en su mayor parte alteraciones del perfil lipídico⁶⁶. Sin embargo, la alteración más característica de todas ellas es la dislipemia aterogénica, un perfil lipídico específico que se ha hipotetizado como uno de los factores más determinantes, sino el mayor, de la mayor presencia y agresividad de la aterosclerosis en estos pacientes. La dislipemia aterogénica es propia también de otros estados de insulino-resistencia como la obesidad central y los trastornos o enfermedades inflamatorias, y de hecho, es la resistencia a la insulina el determinante principal de esta alteración metabólica (aproximadamente el 80% de los pacientes con DM2 y exceso de grasa abdominal presentan insulino-resistencia).

La dieta, la inactividad física, la obesidad y la presencia de DM2, son estados que provocan resistencia a la insulina. Éste, parece ser el mecanismo esencial para que en estos pacientes se desarrolle este tipo de dislipemia. La secuencia se inicia por la incapacidad de la insulina en condiciones de insulinoresistencia de suprimir la actividad de la lipasa del tejido adiposo, lo que se asocia a una mayor lipólisis, y a la liberación de ácidos grasos y glicerol. Este aporte excesivo de ácidos grasos libres, junto a los quilomicrones derivados de la dieta, es dirigido y captado por el hígado. Esta infiltración grasa de los hepatocitos provoca una producción aumentada de partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos (VLDL). Estas partículas, tras llegar al torrente circulatorio desde el hígado, transfieren triglicéridos a cambio de ésteres de colesterol a otras lipopartículas como las LDL y las HDL, por mediación de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP). Esta enzima presenta una mayor actividad en personas con diabetes. Las partículas HDL enriquecidas en triglicéridos son sustrato, tanto para la lipoproteína lipasa periférica como para la lipasa hepática, que

hidroliza sus triglicéridos, y las partículas resultantes son partículas de HDL más pequeñas y con escaso contenido en colesterol. Estas partículas además de tener una peor funcionalidad son más proclives a su destrucción por distintos mecanismos (entre ellos el aclaramiento renal), lo que explica las concentraciones bajas de colesterol HDL de estos pacientes. Un proceso similar de transferencia de triglicéridos desde las VLDL a las LDL hace que estas LDL enriquecidas de triglicéridos sean de menor tamaño y densidad y, por tanto, más aterógenicas ⁶⁷.

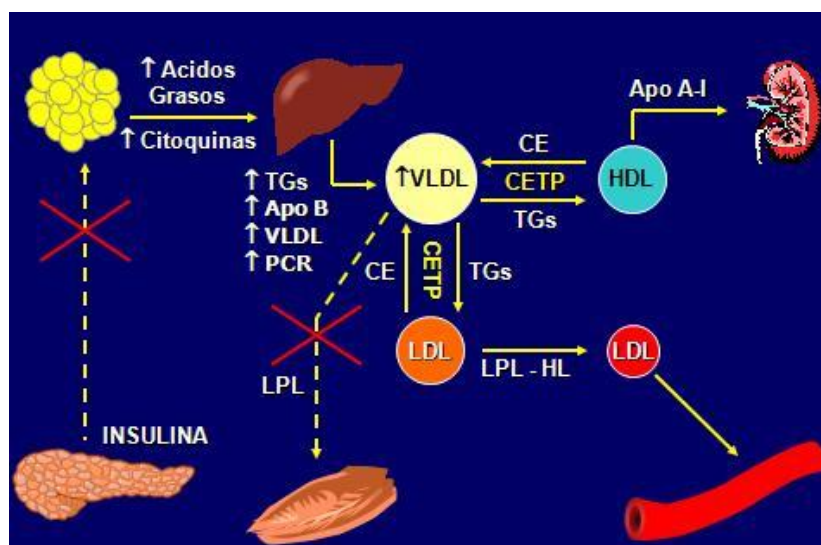


Fig 1: Fisiopatología de la Dislipemia Aterogénica ⁶⁸

De este resumen de la fisiopatología de la dislipemia aterogénica se desprende que, el perfil clásico venga determinado por niveles elevados de triglicéridos, colesterol HDL disminuido, y partículas de colesterol LDL de pequeño tamaño y densas (diámetro < 25,5 nm), así como un aumento de la Apolipoproteína B (ApoB), lipoproteína que presenta partículas aterógenicas (LDL y remanentes) ^{69,70}. En cambio los niveles de colesterol total y de LDL suelen ser normales o sólo ligeramente aumentados. Esto implica que en las personas con y sin diabetes que tienen concentraciones de LDL similares, el riesgo sea mayor en el paciente con DM2, puesto

que ante una misma concentración de colesterol LDL, este colesterol lo vehiculizarán un mayor número de partículas. Por este motivo, entre otros, los objetivos de control de LDL de las sociedades implicadas en la prevención de la ECV, son más estrictos para personas con diabetes. Este riesgo residual atribuido a la dislipemia aterogénica se acompaña de una elevada incidencia de eventos macrovasculares⁷¹ y es importante su evaluación y tratamiento a la hora de reducir el riesgo cardiovascular⁷².

La prevalencia de la dislipemia aterogénica se ha estimado en diferentes estudios. En la población española del Dyslipidemia Internacional Study⁷³, los pacientes con DM2 presentaron un 36,4% de prevalencia de colesterol HDL bajo (<40mg/dl en los varones y <50mg/dl en las mujeres), un 43% de hipertrigliceridemia (>150mg/dl) y un 21,3% de dislipemia aterogénica (combinación de ambos). En el estudio de Vinagre⁷⁴ sobre un total de 286.791 sujetos con DM2 en la práctica clínica habitual, mostraron que las concentraciones medias de triglicéridos eran de 156±105mg/dl, siendo en el 60,4% de los sujetos superiores a 150mg/dl y en el 20,3% superiores a 200mg/dl, aunque solo el 4,5% recibían tratamiento con fibratos. Las concentraciones medias de HDL fueron de 49,3±13,2mg/dl (46,2±12,3 mg/dl en varones y 52,7±13,4 mg/dl en mujeres), siendo inferiores a 40mg/dl en el 21% de los hombres e inferiores a 50mg/dl en el 30% de las mujeres.

A pesar de su alta prevalencia, el impacto de la dislipemia aterogénica sobre el desarrollo de eventos cardiovasculares, o el impacto de su tratamiento más allá de las concentraciones de LDL no es bien conocida⁷⁵, aunque recientemente se ha publicado un estudio donde este tipo de dislipemia en DM2 comporta un riesgo 1,54 veces mayor de padecer un evento coronario o AVC en pacientes con DM2⁷⁶. Por el contrario sí es bien conocida, la relación entre los niveles elevados de LDL y el incremento del RCV, y

la disminución del riesgo asociada a la reducción del mismo en población general y en población con diabetes^{77,78}.

Varios estudios epidemiológicos han establecido que el HDL es un factor de riesgo independiente para la incidencia de enfermedad coronaria, tanto en pacientes con DM como sin DM⁷⁹. También existen estudios de randomización mendeliana que han objetivado que ciertas variantes genéticas asociadas a concentraciones más bajas de HDL se asocian con un incremento en el riesgo de ECV^{80,81}. Se estima que por cada 1mg/dl que aumenta la concentración de HDL, se reduce el riesgo de enfermedad coronaria en un 2-3%⁸². Es clara la asociación de un HDL bajo (sobre todo si es inferior a 35mg/dl) con un aumento del riesgo vascular en pacientes tratados con estatinas según diferentes metaanálisis en pacientes con DM2⁷⁸. Además, diversos estudios epidemiológicos han demostrado que las concentraciones de triglicéridos se asocian a una mayor incidencia de enfermedad cardiovascular⁸³. Sin embargo cuando se han establecido medidas terapéuticas encaminadas a incrementar las concentraciones de HDL, por ejemplo usando ácido nicotínico, el resultado no ha sido beneficioso, y de hecho los efectos secundarios han hecho que este grupo farmacológico haya sido retirado del mercado⁸⁴.

En cuanto a otras formas de tratamiento de la dislipemia aterogénica, por ejemplo con fibratos, que reducen las concentraciones de triglicéridos y condicionan un incremento discreto de HDL, no existe actualmente evidencia de que su uso en personas con diabetes, una vez se ha conseguido el objetivo de LDL, reduzca el riesgo de eventos cardiovasculares. Existen estudios en marcha para aclarar este beneficio (*Clinical trial.gov*; NCT02015988: *Effectiveness and Tolerability of Early Initiation of Combined Lipid -Lowering Therapy Included Simvastatin and Fenofibrate vs Simvastatin Alone in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus, Hypertriglyceridemia and Acute Coronary*

Syndrome; NCT02079376: The DIAMOND® for the Treatment of Type 2 Diabetes: Can Blood Triglycerides Level be the Predictor for Therapy Efficiency A Multicentre, Prospective, Semi-randomized Study) . Mientras tanto, la información de estudios post-hoc y metaanálisis de ensayos randomizados⁸⁵⁸⁶ (ACCORD, FIELD, HHS BIP y VA-HIP) puede aportar alguna información interesante. Estos análisis indicarían que el tratamiento con fibratos sí podrían disminuir el riesgo de eventos (reducción de IAM no fatal), solo en aquellos individuos que presentan una combinación de HDL bajo (<35/40 mg/dl) y triglicéridos altos (>180-200 mg/dl), pero no presentan efecto significativo sobre la mortalidad u otros eventos cardiovasculares.

En nuestro escenario clínico habitual no asociado a estudios epidemiológicos, esta dislipemia aterogénica se encuentra infradiagnosticada y por lo tanto infratratada⁸⁷. Se han realizado consensos de expertos en nuestro país y a nivel europeo para intentar mejorar el diagnóstico y el consecuente tratamiento de esta dislipemia⁸⁸ mediante la combinación de estatinas con fenofibrato. Es pues importante, en la práctica clínica diaria del médico de familia, aprender a evaluar este riesgo residual de los pacientes con DM2 tratados con estatinas en nuestras consultas de atención primaria.

1.5 Evaluación actual del RCV en el paciente con DM2: Estrategias.

De la evidencia presentada en los apartados previos se deduce que evaluar el RCV en los pacientes con DM2 sea relevante. Sin embargo, no existe un claro consenso sobre estrategias y objetivos terapéuticos, y existen diversas estrategias que describimos a continuación:

1. La diabetes es parte de la evaluación global del riesgo poblacional. Tratamiento acorde al riesgo calculado: Framingham/REGICOR

Las primeras tablas que se utilizaron para el cálculo del RCV están basadas en la cohorte de Framingham (población de Estados Unidos), publicándose la primera versión de la función Framingham en 1990⁸⁹, la segunda en 1998 y la tercera en 2008⁹⁰. Sus principales limitaciones son que sobreestima el riesgo en poblaciones con baja incidencia de cardiopatía isquémica, como la española, por lo que llevó a los investigadores del estudio Registre Gironí del Cor (REGICOR)⁹¹ en 2003 a adaptar esta tabla a la población española. Existen también otra calibración en población española basada en el estudio DORICA⁹², pero la estimación del RCV es más elevada con estas tablas. La tabla más utilizada por los médicos de atención primaria de nuestro medio es el REGICOR. Se considera riesgo alto a partir de un valor de riesgo del 10% y en estos pacientes estaría recomendado el iniciar tratamiento con estatina con un objetivo de LDL<130 mg/dl. Los objetivos de presión arterial son llegar a una cifra lo más cercana a 130/80 mmHg. Sus principales limitaciones son : la fuerte dependencia de la edad, la no consideración de factores como la duración, la exposición, la intensidad y el tratamiento de algunos factores de riesgo, que la incidencia de IAM en la población de Girona es menor que en la media española, y que otros factores de riesgo emergentes, como la obesidad, no están considerados en esta ecuación.

Según la Guía del Institut Català de la Salut del 2015 (<http://ics.gencat.cat/web/.content/documents/assistencia/gpc/GuiaDiabetis2015.pdf>), se recomienda realizar REGICOR al diagnóstico de la DM2 y de manera anual a todos los pacientes con DM2. Refieren que no es necesario realizar el REGICOR en pacientes que presenten microalbuminuria o enfermedad renal, hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) o calcificaciones vasculares, debido a que estos pacientes los considera directamente de alto riesgo.

Esta estrategia sería similar a la recomendada por el National Institute of Care and Excellence (NICE) de Reino Unido (QRISK2 risk assessment)⁹³ o la ACC/AHA (American College of Cardiology and American Heart Association)⁹⁴.

2. La diabetes es una situación a priori de alto/muy alto riesgo: Objetivos de control específicos.

No fue hasta el año 2003 que el proyecto SCORE⁹⁵ (Systematic Coronary Risk Evaluation) dio lugar a tablas de riesgo basadas en la población europea, incluida España. SCORE estima el riesgo conjunto de mortalidad coronaria, cerebrovascular, insuficiencia cardíaca, arteriopatía periférica y otras como aneurisma disecante de aorta en sujetos de 40 a 65 años. La función de SCORE estima el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular a los 10 años. Debido a que el riesgo varía entre regiones geográficas, existen 2 modelos de tablas SCORE para la determinación del RCV según el país europeo se considere de alto o de bajo riesgo (la población española por ejemplo). Esta estrategia recomienda en primer lugar evaluar si el paciente corresponde a una categoría a priori de alto o muy alto riesgo y si es así, se establecen directamente objetivos de control y estrategias de tratamiento y no se calcula el RCV con la función SCORE. Entre estas situaciones de riesgo a priori alto o muy alto se encuentra la diabetes. Según la guías europeas del 2016 sobre prevención de la enfermedad

cardiovascular en la práctica clínica⁹⁶ (que proponen la ecuación SCORE para el cálculo del RCV), en los pacientes con riesgo alto (donde se incluirían pacientes con diabetes sin otros FRCV) los objetivos a conseguir en cuanto a LDL son de <100mg/dl, y en los de riesgo muy alto (incluidos pacientes con diabetes con otros FRCV o lesión de órgano diana) un LDL<70mg/dl.

Esta estrategia, de marcar a priori un riesgo más alto, la siguen también otras sociedades más enfocadas en el cuidado de la persona con diabetes como EAS/ESC⁹⁷, la ADA, la European Association for the Study of Diabetes (EASD) y el Grupo de trabajo Diabetes y Enfermedad Cardiovascular de la Sociedad Española de Diabetes. Similar estrategia es la de guía del 2017 de AACE/ACE⁹⁸ (American Association of Clinical Endocrinologist y American College of endocrinology) donde consideran riesgo alto a los pacientes con DM2 sin otro FRCV, o muy alto si tiene asociado otro FRCV. Recientemente, también en nuestro país, las guías PAPPS 2016⁹⁹ (recomendaciones preventivas cardiovasculares) también apuntan en esta dirección por lo que probablemente, existirá una modificación de la recomendación REGICOR, vigente aún en guías de práctica clínica de nuestro entorno.

3. Evaluación del riesgo propia para sujetos con diabetes. UKPDS.

Las tablas del United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)¹⁶, específicas para pacientes diabéticos tipo 2, se crearon al considerar que el resto de tablas, no valoraban con exactitud a este tipo de pacientes, debido a que no se valoraba el control de la enfermedad ni los años de evolución de la misma. Fue realizado entre el 1977-1997 y se conoce como UKPDS Risk Engine OM1. Tras el estudio UKPDS, donde seguían a 5.102 pacientes diabéticos británicos durante veinte años, estimaron que la mayoría de las tablas de RCV infravaloraban este riesgo en los pacientes diabéticos. Argumentaban que se incluyeron relativamente pocos diabéticos en sus cohortes en el

estudio en Framingham y ninguno en el estudio que aportó la tabla SCORE. Existe una nueva versión del 2013, UKPDS Risk Engine OM2¹⁰⁰. La principal característica que lo diferencia con REGICOR/Framingham es que tiene en cuenta diferentes aspectos relacionados con la DM, como por ejemplo, su duración, la cifra de hemoglobina glicosilada y el IMC. Sus principales limitaciones es que infraestima el riesgo cuanto más retraso haya entre el inicio de la diabetes y su diagnóstico, y solo está basado en población británica.

A pesar de que su uso no se encuentra extendido en la práctica clínica, se podría considerar una herramienta de mayor valor en estos pacientes, respecto a las tablas anteriormente mencionadas en algunos estudios publicados en nuestro entorno.

En resumen podemos decir que la capacidad de predicción de las estrategias actuales para personas con diabetes es pobre¹⁰¹, y quizá la segunda estrategia mencionada sería la más adecuada, es decir, la de considerar un mayor riesgo a priori en estos pacientes y por tanto marcar unos objetivos de control diferentes. Sin embargo, incluso esta estrategia no nos aporta la discriminación suficiente como para poder decidir a qué pacientes tratar de manera más intensiva, ya que sabemos que no todas las personas con diabetes tienen el mismo riesgo. Por tanto, en la era de la medicina más individualizada o personalizada, los médicos de familia, necesitamos de nuevas herramientas que nos ayuden a definir mejor el riesgo de los pacientes con diabetes.

Tabla 2. Comparativa de tablas de riesgo cardiovascular más utilizadas.

	<i>Framingham</i>	<i>REGICOR</i>	<i>SCORE SUR</i> <i>Europa</i>	<i>UKPDS OM2</i>
Método	Ecuación basada estudio de cohortes	Calibración Framingham	Ecuación basada estudio de cohortes	Ecuación basada estudio de cohortes
¿Qué miden?	Morbimortalidad	Morbimortalidad	Mortalidad	Morbimortalidad
Eventos incluidos	IAM mortal/no mortal o silente Ictus (última versión)	IAM mortal/no mortal o silente	Muerte de causa coronaria, cerebrovascular, I. Cardíaca, muerte súbita o rotura aneurisma	IAM fatal/no fatal Ictus fatal/no fatal
Valoración específica DM2	Si	Si	No (los considera de alto riesgo)	Si
Edad	35-74	35-74	40-65	25-65
Procedencia	EEUU	España	Sur Europa (principalmente Italia)	Gran Bretaña
Variables Incluidas	Edad, sexo, tabaco, colesterol total, HDL	= Framingham	Sexo, edad, tabaco, Presión arterial sistólica, colesterol total	Edad, sexo, raza, tabaco, hemoglobina glicosilada, IMC, duración DM2, Presión arterial sistólica, etnia, presencia de Fibrilación auricular, HDL, LDL
Definición de riesgo	Alto >20 Medio 10-19 Bajo <10	Muy alto >15 Alto >10 Medio 5-9.9 Bajo <5	Muy alto >10 Alto 5-10 Bajo <5	Alto >30 Medio 15-30 Bajo <15

1.6. Biomarcadores/Detección de aterosclerosis en la evaluación de la ECV

1.6.1. Biomarcadores Circulantes

Los biomarcadores en general, y los circulantes en particular, deberían tener un papel destacado en la predicción, diagnóstico y tratamiento de la ECV en la medicina más personalizada de nuestro tiempo. La necesidad de una mejor estratificación de los pacientes e individualización de su tratamiento ha hecho que en estos años, múltiples estudios hayan evaluado el potencial de nuevos biomarcadores en la predicción de eventos cardiovasculares.

En DM2, diversos estudios epidemiológicos han demostrado que diversos biomarcadores lipídicos (colesterol total, Apolipoproteína B, ratio Apolipoproteína A/Apolipoproteína B) o relacionados con la glucemia (glucosa, hemoglobina glicosilada) e inflamatorios (PCR, TNF- α , IL-6, TGF- β) se asocian de manera prospectiva a la incidencia de eventos cardiovasculares¹⁰². Como hemos comentado en capítulos anteriores, la DM es una enfermedad inflamatoria de bajo grado que presenta biomarcadores inflamatorios circulantes que confieren un aumento de riesgo cardiovascular¹⁰³. El más utilizado y estudiado en la práctica clínica es la Proteína C Reactiva. Se trata de una citocina que se sintetiza en el hígado (tras el estímulo de IL-6 y TNF- α), pero que también puede ser sintetizada por los adipocitos maduros si existe un estímulo inflamatorio. La PCR aumenta la producción de las moléculas de adhesión intracelular tipo 1 y de citocinas proinflamatorias por parte de células endoteliales, las cuales están involucradas en el desarrollo de la arterioesclerosis. Es pues conocido que, niveles aumentados de PCR, se asocian con enfermedad coronaria, DM2, tabaquismo y sedentarismo. Un paciente con DM2 que presente unas cifras de PCR elevadas, tiene

mayor RCV¹⁰⁴. Sin embargo su inespecificidad es manifiesta; del mismo modo que una PCR elevada se asocia a enfermedad cardiovascular, también se asocia a muchas otras causas de muerte de origen no cardiovascular tales como neoplasias de pulmón, mama, digestivas, hematológicas y genitourinarias. En definitiva, la PCR no parece ser un biomarcador que permita discriminar con mayor precisión en la estimación de riesgo cardiovascular¹⁰⁵. Especial mención merece el receptor de la IL-6, cuyo bloqueo con anticuerpos monoclonales permitiría reducir la incidencia de enfermedad coronaria¹⁰⁶.

En el horizonte de nuevos biomarcadores estarían marcadores relacionados con:

1. Metabolismo lipídico: como las concentraciones plasmáticas de la proteína PCSK9 (proteína sérica convertasa subtilisina/hexina tipo 9) y subclases de distintas lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL, HDL) así como su número de partículas y las concentraciones y proporciones de colesterol/triglicéridos que vehiculizan.
2. Metabolómica/Metabonómica: En los últimos años la posibilidad de detectar y cuantificar diferentes metabolitos relacionados con el metabolismo lipídico, proteico, o glucídico han abierto un nuevo campo en la investigación de los procesos biológicos involucrados en el desarrollo de la ECV. La metabolómica para ello utiliza técnicas como la cromatografía de gases-espectrometría de masas o la espectrometría-Resonancia magnética nuclear (RMN) (en este caso se puede denominar metabonómica). Actualmente la evidencia es limitada, pero ya existen estudios prospectivos que han demostrado el potencial predictor en ECV de metabolitos como aminoácidos de cadena ramificada, acilcarnitinas y aminoácidos aromáticos¹⁰⁷, así como la evaluación de lipoproteínas y su relación con la ECV con esta técnica^{108,109}.
3. La glicemia y la resistencia a la insulina: como la Adiponectina¹¹⁰ que presenta resultados heterogéneos en cuanto a su asociación con la ECV.

4. El daño cardíaco : como las Troponinas de alta sensibilidad¹¹¹¹¹² o el BNP (péptido natriurético tipo B)¹¹³
5. El Ácido úrico: Muchos estudios prospectivos han relacionado la hiperuricemia con la ECV y que podría tratarse de un factor de riesgo independiente de eventos macrovasculares^{114,115}.
6. Genéticos: como los miRNAs¹¹⁶ (ARN monocatenario, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, y que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos) y su relación con el metabolismo lipídico (HDL principalmente)¹¹⁷.

1.6.2 Índice Tobillo-Brazo

El Índice tobillo-Brazo (ITB) se define como la relación entre la Presión arterial sistólica (PAS) medida en el tobillo y la arteria braquial¹¹⁸. Fue descrito por Winsor en los años 50 para el diagnóstico no invasivo de la enfermedad arterial periférica (EAP) de las extremidades inferiores y posteriormente en los años 70, Yao correlacionó la severidad de la arteriopatía con la alteración de el ITB¹¹⁹. Se utiliza como herramienta diagnóstica de la EAP principalmente, pero también como marcador pronóstico de eventos cardiovasculares. Un $ITB \leq 0,9$ será diagnóstico de EAP, a pesar que hasta un 80% de los pacientes no presente ninguna clínica asociada¹²⁰. Un $ITB < 0,9$ presenta una sensibilidad del 95% y una especificidad del 99% para identificar la presencia de EAP en relación con una arteriografía. Un ITB disminuido se asocia a un mayor riesgo de arterioesclerosis en otros territorios vasculares (coronario, cerebrovascular) y con un mayor riesgo de mortalidad cardiovascular¹²¹.

La presencia de DM es el factor que más afecta a la validez de la prueba con una $OR=4,36^{122}$, por lo que la eficacia diagnóstica del ITB podría estar limitada en estos

pacientes , ya que valores normales podrían no ser suficientes para descartar EAP. Por su baja sensibilidad y alto índice de falsos negativos se aconseja en los pacientes con DM aumentar el punto de corte a 1 o 1,10¹²³. A pesar de este nuevo valor de corte, pacientes con rigidez arterial de la íntima de las arterias, tan prevalente en pacientes con DM de larga duración, comportará valores altos de ITB y por tanto subestimaré en algunos casos la prevalencia de patología.

Las recomendaciones de las principales sociedades en pacientes con DM sobre el ITB son las siguientes: 1) AHA aconseja la realización de ITB en pacientes DM de 50 a 69 años y la ADA en pacientes >50 años con DM o >50 años con varios FRCV o DM de >10 años de evolución.

Por tanto, se trata de un procedimiento sencillo, barato y reproducible de evaluación directa de la lesión arterioesclerótica, que justificaría su uso habitual en las consultas de atención primaria para diagnosticar enfermedad arterial avanzada, pero con limitaciones en los pacientes con DM2.

1.6.3. Calcio Coronario

El Score de Calcio coronario (CAC) se determina mediante la realización de un TAC helicoidal y valora la cantidad de calcio a nivel de las arterias coronarias. La cantidad de calcio se evalúa mediante el Índice de Agatston¹²⁴ (rango de 0 a más de 400). Un CAC con Índice de Agatston por encima de 300 o por encima del percentil 75 de su población de misma edad, sexo y raza, se considera en riesgo alto^{125,126}. Existen múltiples estudios que han conseguido definir la presencia de CAC como hallazgo definitorio de arterioesclerosis y una medida de la carga anatómica de placas arterioescleróticas¹²⁷.

La importancia de la determinación y detección de CAC es la de incrementar el poder de las escalas de riesgo para la identificación de pacientes en riesgo, puesto que añade información pronóstica independiente a los FRCV^{128,127}. Donde ha mostrado mayor utilidad ha sido en los pacientes clasificados como de riesgo moderado, reclasificándolos tanto en RCV bajo o alto¹²⁹. Sin embargo, algunos de estos estudios prospectivos excluían a pacientes con DM2 del análisis primario¹²⁸. La presencia de calcio coronario no es equivalente a la presencia de estenosis coronaria relevante, ya que su especificidad, en lo que se refiere a la presencia de una estenosis $\geq 50\%$, es sólo del 50%.

En un metaanálisis sobre la capacidad de predicción del CAC en paciente con DM2¹³⁰ mostraba que un $CAC \geq 10$ predecía todas las causas de mortalidad y eventos cardiovasculares con alta sensibilidad y baja especificidad. Clínicamente, esta prueba nos ayudaría a poder estratificar en bajo riesgo a los pacientes con DM2 con $CAC \leq 10$ ya que, presentan 6,8 veces menos riesgo de presentar un evento cardiovascular que los pacientes con CAC más elevado. Además algún estudio ha reportado que una proporción importante de pacientes con DM2 (un 22%) presentaban CAC de 0, lo cual representaba un RCV bajo¹³¹.

Sus principales limitaciones son, por un lado, la nula disponibilidad de la prueba desde el primer nivel asistencial, y por otro lado la no existencia de un algoritmo de tratamiento basado en resultados de CAC generado en ensayos aleatorizados. Por este motivo muchas de las guías de práctica clínica, como la ADA¹, no recomiendan su utilización de manera sistemática. Sin embargo, la guía europea para la prevención de la ECV en la práctica clínica, describe como pacientes de alto riesgo aquellos con lesión de órgano diana, entre los que se incluye la detección de calcio coronario en grado significativo.

Entre sus inconvenientes presenta un alto coste, una no despreciable cantidad de imágenes incidentales (nódulos pulmonares) y una irradiación al paciente no despreciable (aproximadamente el doble que la realización de una mamografía).

1.6.4. La ecografía carotídea para la valoración de la enfermedad cardiovascular.

La ecografía carotídea, técnica de imagen no invasiva, es un método útil para la valoración clínica y preclínica de la enfermedad aterosclerótica¹³² y ha sido recomendada para definir mejor el riesgo en grupos seleccionados de pacientes con RCV intermedio o en pacientes con DM2¹²⁶.

Existen diferentes consensos para estandarizar las medidas que se pueden obtener mediante la ecografía carotídea, entre ellos los más utilizados, son el consenso de Mannheim (última versión del 2011)¹³³ y el de la Sociedad Americana de Ecocardiografía¹³⁴. La Ecografía carotídea permite evaluar el grosor de íntima media de la carótida (GIMC) y detectar, cuantificar, y caracterizar placa carotídea (PC).

1.6.4.1. El Grosor de Intima Media Carotídea

El grosor de íntima media de la carótida (GIMC) es la distancia que existe entre la interfase constituida por la luz arterial con la íntima arterial, y la interfase entre la capa media y la adventicia. Se trata de una imagen ecográfica de “doble línea”, que comprende por un lado la íntima-media y por el otro lado la adventicia. El GIMC es un indicador de la edad vascular del individuo, y se ha propuesto como un marcador de aterosclerosis sistémica¹³⁵ y se correlaciona con el grado de aterosclerosis aórtica¹³⁶, aterosclerosis coronaria¹³⁷ y de las extremidades inferiores¹³⁶.

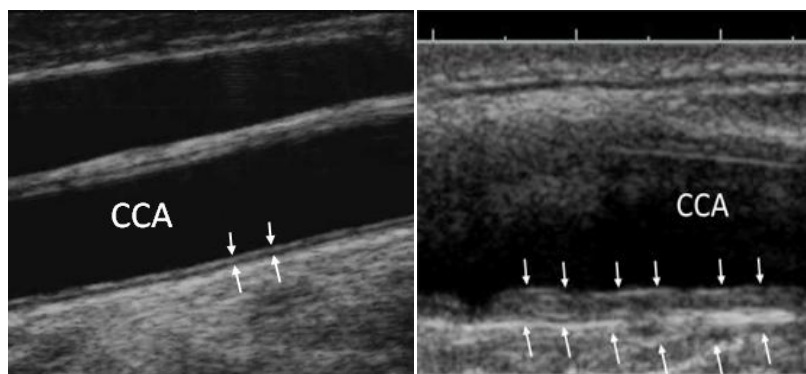


Fig. 2: Aspecto de la pared arterial para medir el grosor íntima-media (GIMC) o distancia entre la capa adventicia y la capa íntima de la pared arterial, a nivel de la carótida común. Las flechas delimitan el GIMC (GIMC normal y engrosado).

Los principales determinantes del GIMC son conocidos factores de riesgo cardiovascular. Unos no modificables, como la edad y el sexo (sus principales determinantes) o los antecedentes familiares de enfermedad aterotrombótica, pero otros potencialmente modificables, como las concentraciones de lípidos plasmáticos (principalmente LDL y HDL), la presión arterial, el tabaquismo, el control glucémico en sujetos con diabetes, la obesidad y la distribución central de la grasa y la hiperuricemia. Sin embargo, la mayoría de estudios muestran que el conjunto de estos factores no explica más que un 25-30% de la variabilidad de GIMC. Para establecer la normalidad o anormalidad del valor del GIMC es necesario disponer de valores de referencia en población general o sin factores de riesgo cardiovascular. En nuestro país esta población se describió en el estudio de Junyent¹³⁸ et al y más recientemente en un subestudio del REGICOR por Grau et al¹³⁹. Un valor de GIMC por encima del percentil 75 de la población de referencia se consideraría patológico e indica que el individuo tiene una predisposición a la aterosclerosis.

Utilidad del GIMC en la predicción de ECV en la población general y DM

El GIMC puede predecir de eventos cardiovasculares futuros. Los estudios prospectivos de la Cohorte de Rotterdam¹⁴⁰, Carotid Atherosclerosis Progression Study

(CAPS)¹⁴¹, y Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)¹⁴² demuestran la asociación entre GIMC e incidencia de morbi-mortalidad CV. Lorenz et al¹⁴³ siguieron a 37.197 sujetos durante un periodo de 5,5 años, demostrando que un incremento de 0,1 mm del GIMC, aumentaba el riesgo de IAM en un 10-15% y de AVC en 13-18%.

Sin embargo, más recientemente, en cuanto a la progresión del GIMC, el PROG-IMT Project¹⁴⁴, evidenció que aunque la progresión del GIMC se enlentecía gracias a la acción de las estatinas, ésta no se trasladaba a reducciones de eventos cardiovasculares.

Además en los últimos años, estudios con tamaños poblacionales significativos, han puesto en duda el GIMC por sí sólo, e independientemente de los FRCV sea capaz de predecir eventos futuros¹⁴⁵¹⁴⁶¹⁴⁷.

En los pacientes con DM, el GIMC también ha sido evaluado. En este subgrupo de pacientes ha demostrado que: 1) Los pacientes con DM presentan mayor GIMC¹⁴⁸, comparados con aquellos sin diabetes, siendo su grosor aproximadamente de 0,13 mm/año mayor, 2) el GIMC se asocia con enfermedad coronaria¹⁴⁹, 3) la progresión se asocia con eventos futuros en población sin eventos cardiovasculares¹⁵⁰, 4) la evaluación del GIMC puede ser útil en la identificación de sujetos en mayor riesgo de presentar eventos durante el seguimiento¹⁴³¹⁵¹.

1.6.4.2. Placa Carotídea

Se define placa carotídea (PC) como un engrosamiento de la pared de más del 50% (o 0,5mm) del GIMC circundante, o un GIMC >1,5mm¹³³. Además de evaluar presencia o ausencia de placa, la ecografía permite evaluar su localización, cantidad (número, altura, área o volumen) y características (superficie, ulceración, ecogenicidad).

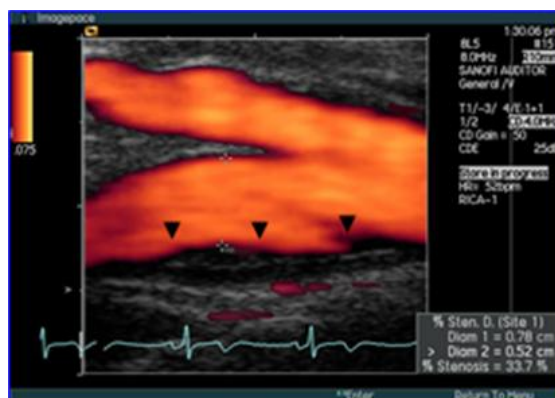


Fig. 3: Placa Carotídea

Utilidad de la PC en la predicción de ECV en la población general y DM

La presencia de PC detecta aterosclerosis más avanzada en relación al GIMC, es sustrato potencial de un evento clínico y permite por tanto aumentar la capacidad de predicción para ECV en general, coronaria, y cerebrovascular (AVC y Accidente Vascular Transitorio)^{152,153} Por el contrario, la ausencia de PC se asocia un riesgo bajo (4%) de presentar un IAM en los 10 años posteriores a la evaluación. La detección de placa mejora la predicción basada en factores de riesgo¹⁵⁴ y ayuda a reclasificar el 21,7% de los pacientes con riesgo intermedio¹⁵⁵.

En cuanto a las diferentes variables asociadas a la PC y su capacidad de predicción de ECV, podemos destacar:

- a. Medidas relacionadas con la cantidad o carga de enfermedad (altura de placa, número, área y volumen) se asocian de forma proporcional con la probabilidad de presentar eventos y mortalidad cardiovascular^{156,157,158}.
- b. La progresión (nueva aparición o cambio) de placa carotídea tiene impacto en la predicción de ECV y puede identificar a pacientes de más alto riesgo¹⁵⁹.

- c. También las características de vulnerabilidad de la placa como la ecolucencia (placa rica en lípidos)¹⁶⁰, la presencia de calcio¹⁶¹, y la ulceración se han identificado como predictores de eventos cardiovasculares.

En pacientes con DM2 sin ECV, la presencia de PC ha sido evaluada en diferentes estudios^{162,163,164,165}, en los que se ha evidenciado una prevalencia alta (entre 43% y 81,8%). En estos pacientes además se ha demostrado que el hecho de presentar PC hace que la posibilidad de padecer un evento CV es mayor que en los pacientes con ausencia de placas. En un estudio en pacientes con DM2 en nuestro ámbito la presencia de PC en pacientes DM2 con y sin retinopatía diabética fue de 52,2 y del 68%¹⁶⁶.

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

En la introducción de este trabajo hemos reflejado el mayor RCV y la mayor tasa de ECV en los individuos con diabetes, además de la gran prevalencia de la enfermedad en nuestras consultas de atención primaria. También hemos indicado la limitación de las tablas de riesgo para evaluar correctamente a estos pacientes. Por tanto, se plantea la necesidad de buscar nuevas herramientas para identificar mejor a sujetos con un mayor RCV sobre los cuales realizar una intervención más personalizada, más acorde a su riesgo real. En esta estrategia moderna de medicina más personalizada, los biomarcadores de enfermedad cardiovascular tienen un papel destacado, como ya lo tienen en la otra causa de mortalidad más prevalente: el cáncer¹⁶⁷. La detección de aterosclerosis preclínica mediante pruebas de imagen, en especial la ecografía carotídea, parece el biomarcador más atractivo para esta tarea, pero los biomarcadores circulantes probablemente sean más sencillos de implementar en el escenario de la Atención Primaria de Salud. Además estos biomarcadores pueden contribuir al mejor conocimiento de la enfermedad cardiovascular en la diabetes, una enfermedad diferente y con determinantes diferentes a otras situaciones de riesgo cardiovascular.

En la introducción de este trabajo hemos reflejado mucha información relativa a la evaluación de aterosclerosis preclínica en pacientes con diabetes de la que disponemos actualmente. Sin embargo, en el momento de plantear este trabajo la información relativa a enfermedad aterosclerótica preclínica en pacientes con diabetes sin enfermedad cardiovascular era escasa, y decidimos evaluar de manera consecutiva a un grupo de pacientes de nuestro medio con diabetes y sin enfermedad cardiovascular que acudieron de forma consecutiva a las consultas de Atención Primaria (Tabla 3).

Tabla 3. Características generales de los sujetos estudiados

Variables (n=34)	Media (DE)
Edad (años)	61,3 (6,7)
IMC(Kg/m2)	31,2 (4,9)
Años evolución DM2	7,6 (5,4)
Colesterol total (mg/dl)	191,9 (40,7)
LDL actual(mg/dl)	111,1 (27,9)
LDL medio(mg/dl)	120,7 (23,3)
Glucosa (mg/dL)	166,2 (70,5)
HbA1c actual (%)	7,7 (1,4)
HbA1c media (%)	7,5 (1,3)
Regicor (%)	7,8 (3,3)
UKPDS a 10 años (%)	20,1 (12)
Sexo, mujeres, n, (%)	18, (53)
Tabaquismo (%)	23
Exfumadores(%)	41
HTA(%)	69
Dislipemia(%)	67
Tratamiento con AAS(%)	56
Tratamiento para la dislipemia(%)	65

Tabla 4. Comparación con GIMC con población de referencia

Percentil*	N	%
< P50	6	17,65
P50-P75	10	29,41
P75-P90	13	38,34
>P90	5	14,71

*En relación a población de referencia por edad y sexo

Tabla 5. Presencia de PC

Variable	N	%
Presencia de Placas	25	73
Presencia de 1 o 2 placas	12	35
Presencia de 3 o más placas	13	38

Pudimos observar que:

1. El GIMC en sujetos con DM2 y sin ECV era superior (Tabla 4) a población de referencia de su misma edad y sexo.
2. El 53% de los sujetos tenían un GIMC superior al percentil 75 de la población sana y un 15% sobre el percentil 90. (Tabla 4)
3. Existía una alta prevalencia (73%) de placa carotídea (Tabla 5).

Esta alta prevalencia de aterosclerosis preclínica avalaba la estrategia más agresiva de considerar a todos los pacientes con diabetes como de alto o muy alto riesgo, al menos este perfil de pacientes con una evolución media de 7,6 años de evolución de la enfermedad y elevada prevalencia de comorbilidades. Sin embargo, la evidencia resumida presentada en la introducción de este trabajo, muestra que solo la intervención intensiva y multifactorial desde el inicio de la diabetes permitiría reducir enfermedad cardiovascular futura.

Por tanto, la pregunta relevante era doble:

1. En primer lugar, si la enfermedad preclínica ya podría existir desde el inicio de la enfermedad, y, si en ese momento disponer de esa información puede ser relevante para establecer tratamientos más intensivos que sirvan para reducir eventos futuros. En este caso, para responder a esta pregunta la información disponible era aun más escasa. Disponíamos sólo de un trabajo que incluía diabetes de nuevo diagnóstico¹⁶⁸, hecho que justificaba plenamente la realización de este trabajo.

2. En segundo lugar, si se confirmaba la presencia de enfermedad preclínica, si esta podría explicarse por la mayor prevalencia de FRCV clásicos

que hemos justificado en la introducción, o si los factores de riesgo más íntimamente relacionados con la diabetes (HbA1c, resistencia a la insulina, adiposidad, y dislipemia aterogénica, entre otros) podrían explicar esta presencia de enfermedad preclínica. En este caso ningún trabajo previo había previsto ajustar por estos factores de riesgo clásicos.

Por todo ello planteamos la siguiente hipótesis de trabajo;

En una población mediterránea del centro de Barcelona:

1. La edad vascular (GIMC) de los pacientes con DM2 de reciente diagnóstico es superior a la de una población control sin diabetes de similar edad y sexo y prevalencia de hipertensión arterial, dislipemia, y tabaquismo.
2. La presencia de placa carotídea es más prevalente en los pacientes con DM2 de reciente diagnóstico en comparación con una población control sin diabetes de similar edad y sexo y prevalencia de hipertensión arterial, dislipemia, y tabaquismo.
3. Esta mayor prevalencia de enfermedad subclínica (GIMC) o preclínica (PC) se asocia a las características de riesgo propias de los pacientes con diabetes, en particular la HbA1c y la dislipemia aterogénica.

3. OBJETIVOS

Objetivo primario

Investigar las diferencias en el GIMC y en la presencia de PC entre sujetos con DM2 de reciente diagnóstico (DMDEBUT) y una población control. Estudio de diseño transversal.

Objetivos secundarios

Estudiar los principales determinantes del GIMC y de la presencia de PC en sujetos DMDEBUT y en una población control:

- a. Identificar las características asociadas a un mayor GIMC en esta población.
- b. Identificar las características asociadas a una mayor prevalencia de placa carotídea y la carga de placa en esta población.

Además de los FRCV clásicos, se estudiarán:

- a. La asociación con dislipemia aterogénica evaluada mediante RMN-Espectometría.
- b. La asociación con biomarcadores de consumo de grasas.

4. RESUMEN BREVE ARTÍCULOS

4.1. Prevalence by sex of preclinical carotid atherosclerosis in newly diagnosed type 2 diabetes

Autores: **Catalan M**, Herreras Z, Pinyol M, Sala-Vila A, Amor AJ, de Groot E, Gilabert R, Ros E, Ortega E.

Publicado el 7/5/2015 en la revista *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*

La ECV asociada a la aterosclerosis es la principal causa de muerte en los pacientes con DM2. El tratamiento intensivo y multifactorial en pacientes con diabetes puede reducir tanto la mortalidad como la morbilidad cardiovascular en estos pacientes. Sin embargo, existe poca información sobre la presencia de ECV en los pacientes DM2 al inicio de la enfermedad que nos pueda ayudar a establecer un tratamiento más individualizado de manera precoz. La evaluación de la aterosclerosis preclínica puede medirse con diferentes técnicas de imagen, entre ellas, la ecografía carotídea, valorando el GIMC (aterosclerosis subclínica) y la presencia de PC (aterosclerosis preclínica).

El objetivo de este estudio fue la valoración del GIMC y la presencia de PC en pacientes DM2 sin ECV previa y su comparación con pacientes controles apareados por edad, sexo y presencia de FRCV, así como evaluar los determinantes asociados al GIMC y la presencia de placa carotídea en esta población. También se evaluaron, las diferencias entre sexos sobre la presencia de aterosclerosis preclínica y subclínica en este estadio precoz de la DM2.

Se diseñó un estudio de casos y controles, observacional y transversal, en el que incluimos 205 pacientes, de los cuales eran 106 pacientes con DM2 (edad media 62 años, 46% mujeres, 19% fumadores, 54% HTA en tratamiento y 41% dislipemia en tratamiento) apareados con controles (99 pacientes) por sexo, edad y presencia de FRCV (hábito tabáquico si/no, dislipemia en tratamiento si/no, hipertensión arterial en tratamiento si/no).

Se recogieron datos demográficos, antropométricos, así como los datos procedentes de la ecografía carotídea. Las variables específicas y el método estadístico de evaluación se describen en el artículo mencionado.

Los resultados más relevantes fueron que el GIMC fue significativamente más alto en los pacientes DM2 comparados con los controles (carótida común 0,725 vs. 0,801 mm $p=0.01$; carótida interna 0.727 vs 0.802 mm, $p=0.04$) excepto en las mediciones en el bulbo (0.976 vs.1.028 mm, $p=0.12$). Mientras que el GIMC era mayor en hombres controles sin DM2 en comparación con las mujeres controles sin DM2 ($p<0.01$), no existían diferencias entre sexos en el grupo con DM2 ($p>0.4$).

En cuanto a la presencia de PC, la edad (OR [IC 95%] 1,40 [1,15-1,71], $p=0,009$) y el sexo masculino (OR 1,80 [0,99-3,29], $p=0,05$), eran las variables que asociaban su presencia y el número de placas. Las PC tendían a ser más prevalentes en los pacientes con reciente diagnóstico de DM2 comparado con los controles (72% vs. 60%, $p=0,06$), principalmente por una mayor presencia de PC en la Carótida interna ($p<0,01$), pero no en la carótida común o el bulbo. La carga de PC fue superior en pacientes con diagnóstico reciente en comparación con los controles y presentaban más frecuentemente ≥ 3 PC (OR 2,86 [1,45-5,62] o al menos 1 PC con una altura $>2,5$ mm (OR 2,44 [1,25-4,75])). Las pacientes mujeres con diagnóstico reciente de DM2 presentaron mayor presencia de PC (OR 3,02 [1,22-7,48]) y más presencia de ≥ 3 PC

(OR 4,62 [1,36-15,65]) en comparación con las pacientes control. No existían diferencias en la presencia de PC entre los hombres con DM2 y sus controles. La prevalencia de PC entre hombres y mujeres controles, era mayor en los hombres ($p=0,01$), en cambio no había diferencias entre hombres y mujeres con DM2. De todos los factores estudiados comparando los dos grupos, los modelos de regresión indicaron que se asociaban con aterosclerosis carotídea la HbA1c, los triglicéridos y/o HDL.

Concluimos que los pacientes con DM2 de reciente diagnóstico presentaban una alta prevalencia de aterosclerosis preclínica, especialmente en mujeres. Esta alta prevalencia de aterosclerosis preclínica en pacientes con reciente diagnóstico, nos tiene que hacer pensar, que solo el tratamiento precoz e intensivo de estos pacientes al inicio de la enfermedad puede revertir en una menor prevalencia a la larga de ECV de esta población. Además, esta información al diagnóstico de la enfermedad, puede ayudar a individualizar mejor el tratamiento.

4.2 Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in newly-diagnosed type 2 diabetes and their association with preclinical carotid atherosclerosis

Autores: Amor AJ, **Catalan M**, Pérez A, Herreras Z, Pinyol M, Sala-Vila A, Cofán M, Gilabert R, Ros E, Ortega E

Publicado en la revista *Atherosclerosis* el 17/2/2016

La dislipemia aterogénica es común en los pacientes con DM2 y predice la aparición de la ECV. Esta dislipemia es posiblemente una de las principales características de la gran prevalencia e incidencia de ECV en los pacientes con DM2. Los métodos convencionales, como la evaluación analítica del perfil lipídico, evalúan pobremente esta dislipemia. La evaluación del perfil de lipoproteínas mediante Resonancia Magnética Nuclear podría ser útil para caracterizar mejor este tipo de dislipemias.

El objetivo de este estudio fue evaluar el perfil lipídico mediante RMN en pacientes DM2 de reciente diagnóstico y controles y su asociación con la presencia de aterosclerosis preclínica.

Se diseñó un estudio de casos y controles, observacional y transversal, en el que incluimos 186 pacientes, de los cuales eran 96 pacientes con DM2 aparejados con controles, 90 pacientes, por sexo, edad y presencia de FRCV (Hábito tabáquico si/no, Dislipemia en tratamiento si/no, Hipertensión arterial en tratamiento si/no). Se evaluó el perfil lipídico mediante una RMN espectroscopia y se realizó una ecografía carotídea para valoración del GIMC y PC a todos los pacientes.

Los resultados más importantes fueron que en los pacientes con DM2 era mayor el número y tamaño de las lipoproteínas VLDL (ricas en colesterol y triglicéridos), las lipoproteínas HDL de mayor tamaño eran menos abundantes, y las lipoproteínas HDL tenía un tamaño medio menor, y se encontraban en general enriquecidas en triglicéridos en comparación con los controles ($p < 0.05$). En cuanto a la asociación con la aterosclerosis preclínica, el contenido VLDL-triglicéridos (odds ratio OR, 8.975; 95% [IC], 2.330-34.576), el número total de partículas-VLDL (OR, 2.713[1.601-4.598]), el tamaño de VLDL(OR, 2.044[1.320-3.166]), y la ratio colesterol/triglicéridos en el HDL(OR 0,638 [0.477-0.852]), estaban asociados con la carga de placa carotídea (≥ 3 placas) independientemente de factores de confusión (incluidos los niveles convencionales de lípidos).

Concluimos que la RMN del perfil lipídico identifica anomalías en los pacientes con reciente diagnóstico de DM2 y aterosclerosis preclínica. Estos resultados no son evidentes con sólo la valoración analítica de dicho perfil. En estadios iniciales de la DM2, la RMN podría ser un buen método para identificar a pacientes con DM2 con un mayor RCV y así poder realizar tratamientos más intensivos a este tipo de pacientes destinados a mejorar su dislipemia aterogénica y su riesgo cardiovascular.

4.3. The proportion of total C18:1 trans-fatty acids in red blood cell membranes relates to carotid plaque prevalence

Autores: Zoe Herreras, Montserrat Cofán, Marta Catalán, Carlos Calvo, Montserrat Pinyol, Antonio J. Amor, Rosa Gilabert, Emilio Ros, Aleix Sala-Vil, Emilio Ortega

Publicado en la revista *Journal of Nutritional Biochemistry* 10/08/2016

Existe una clara evidencia de la aterogenicidad de la dieta rica en ácidos grasos. De entre ellos, los ácidos grasos trans, son los que mayor evidencia tienen de aumentar el riesgo de presentar un evento coronario. Sin embargo no existen datos sobre su relación con la presencia de placa de ateroma (PC).

El objetivo de este estudio fue evaluar si la proporción ácidos grasos trans C18:1 contenidos en la membrana de hematíes, como biomarcador objetivo de consumo de ácidos grasos trans, está relacionada con la prevalencia de PC en pacientes con DM2 de reciente diagnóstico sin evidencia de ECV.

Se diseñó un estudio de casos y controles, observacional y transversal, en el que incluimos 197 pacientes, de los cuales 101 eran pacientes con DM2 aparejados con controles (96 pacientes) por sexo, edad y presencia de FRCV (hábito tabáquico si/no, dislipemia en tratamiento si/no, hipertensión arterial en tratamiento si/no). Se evaluó la presencia de ácidos grasos en membrana de hematíes mediante cromatografía de gases y se realizó una ecografía carotídea para valoración del GIMC y PC a todos los pacientes.

Los resultados más importantes fueron que por cada incremento de 0.1% de la proporción de C18:1 (que no fue diferente entre personas con y sin diabetes), la

prevalencia de PC aumentaba en un 53% ($p=0,002$). Contrariamente, el incremento de 0,1% de ácido alfa-linoleico (ácido graso vegetal omega-3) se asociaba con una disminución en la prevalencia de PC en un 43% ($p=0,001$).

Concluimos que el contenido de ácidos grasos trans C18:1 en membrana eritrocitaria está relacionado con las alteraciones mostradas por la ecografía carotídea. Nuestros resultados avalan las actuales recomendaciones de la disminución de la ingesta de ácidos grasos trans en la dieta para la prevención de la enfermedad cardiovascular en pacientes con (mayor riesgo cardiovascular basal) y sin diabetes.

5. DISCUSIÓN

A continuación se discuten los principales hallazgos de este trabajo, sus implicaciones, y algunas oportunidades para trasladar a la clínica y a futuros proyectos de investigación.

1. Enfermedad Cardiovascular en pacientes con diabetes de reciente diagnóstico

Es bien conocido que el diagnóstico de la diabetes tipo 2 constituye un momento importante en la historia de la enfermedad, pues ya pueden existir complicaciones crónicas de la misma. Clásicamente, éstas se conciben como microangiopáticas puramente, pero la prevalencia de enfermedad cardiovascular es, de hecho, la principal causa de mortalidad. En este trabajo nos centramos en esta complicación crónica de la diabetes, la aterosclerosis, y en cómo identificarla.

Actualmente en la práctica clínica de nuestras consultas de atención primaria y según las vigentes recomendaciones de la ADA 2017, realizamos cribado de complicaciones microvasculares (retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía diabética) mediante la valoración de la microalbuminuria, el filtrado glomerular, el fondo de ojo y la evaluación del pie. Se realiza en el momento del diagnóstico y de manera anual, excepto en el cribado de la retinopatía diabética que se realiza bienal. Realizamos estas pruebas de cribado, porque la detección de alguna de estas complicaciones comporta un cambio del tipo de seguimiento e intervención. Si existe nefropatía se aconseja valorar el inicio de estatina y/o fármaco antihipertensivo con optimización de la glicemia; estos pacientes además son considerados de más alto riesgo vascular. Si presenta retinopatía, el consejo también es el de optimizar el control glucémico, de la hipertensión y del perfil lipídico. La misma recomendación en cuanto al control glicémico sería para la

presencia de neuropatía diabética y pie diabético. Además a estos pacientes que presentan complicaciones microvasculares se les realizan controles más frecuentes para la detección precoz de otras posibles complicaciones asociadas o empeoramiento de las patologías que presenta.

La recomendación actual de las guías de práctica clínica no incluye el cribado de enfermedad macrovascular a todos los pacientes diagnosticados de DM2. Existe el convencimiento, que también el diagnóstico precoz del sustrato del riesgo cardiovascular (aterosclerosis), podría ser de ayuda para decidir implementar estrategias de prevención cardiovascular más individualizadas, pues en estos momentos, la mayoría de nuestros pacientes con diabetes según distintas guías de práctica clínica serían de alto/muy alto riesgo. Pero, ¿es cierto esto también desde el momento del diagnóstico de la enfermedad? En nuestro estudio, en pacientes con DM2 de reciente diagnóstico, aproximadamente un tercio de los pacientes no tenían PC, un tercio tenían 1-2 PC y otro tercio presentaban una aterosclerosis preclínica claramente avanzada con >3PC. Es posible que el primer grupo fuese candidato a una intervención menos intensiva, y que, al menos, este último tercio de pacientes, sí fuesen candidatos a un tratamiento más intensivo, al presentar ya una aterosclerosis preclínica claramente establecida.

En el momento de iniciar esta tesis doctoral existían a nivel mundial en población con DM2 de diagnóstico reciente muy pocos datos sobre el GIMC (172 pacientes americanos del estudio de Wagenknecht¹⁶⁸, 71 pacientes en el estudio búlgaro de Temelkova¹⁶⁹ y 51 pacientes alemanes de Frost¹⁷⁰) y tan solo 2 estudios que valoraban también la presencia de PC. El primero de Sigurdardottir¹⁷¹ en población sueca¹⁷¹ (24 pacientes, valoraban GIMC y PC) donde identificaban PC (definida como una área con un 50% más grosor que en territorios adyacentes) en un 30% de los pacientes, y el segundo, el estudio de Son et al en población china¹⁷² (142 pacientes en los que

valoraban GIMC y PC) donde no se reporta claramente la prevalencia de placa en esta población, ya que dan datos totales de GIMC>0,9 junto con PC (19% de los pacientes con DM con diagnóstico reciente).

En los últimos 5 años, mientras nuestro trabajo estaba en curso o finalizaba, se añadieron varios estudios más. Dos en población asiática, uno de Gu et al¹⁷³, el cual nos muestra que adolescentes y adultos jóvenes (14 a 30 años) con DM2 de reciente diagnóstico frente a los diagnosticados de DM1, presentan GIMC mayor (ODS ratio 2,38 p=0,001), y Li et al¹⁷⁴ con 423 pacientes con DM2 de reciente diagnóstico, donde muestran que en fases iniciales la aterosclerosis preclínica (PC) ya es evidente (31%-73% de PC en pacientes de 50 a ≥ 70 años). También tenemos datos de población española ¹⁷⁵ (n=121, 60,8% hombres, edad media 63,9 años) con diabetes de reciente diagnóstico (con una única determinación de HbA1c), a los que se detectó un 64,2% de PC y un GIMC superior al esperado por edad y sexo. Y finalmente otro estudio en población latina¹⁷⁶ con diabetes de nuevo diagnóstico (n=80, 69% mujeres, edad media 48 $\pm$ 7, GIMC 0,8 $\pm$ 2 mm), donde también se evidenció un GIMC superior que en población control sana sin diabetes (n=20). La variabilidad en la definición de placa carotídea en estos estudios hace que en ocasiones las comparaciones sean difíciles (GIMC 0,9-1,5 mm). En nuestro trabajo elegimos un punto de corte para la definición de PC (1,5 mm) que no dejaba lugar a dudas de la existencia de la lesión aterosclerótica.

Al evaluar la carga de placa de los pacientes con reciente diagnóstico fue superior en los pacientes control con un OR 2,36 [1,45-5,62] para presentar ≥ 3 PC o al menos una con $\geq 2,5$ mm de altura (OR 2,44 [1,25-4,75]).

Todos estos estudios muestran que, la presencia de aterosclerosis subclínica o preclínica en pacientes con una DM2 en estadio precoz, está presente en un porcentaje

elevado de pacientes, pero no en todos, y por tanto concuerdan con nuestros datos e hipótesis.

Nos podríamos preguntar a raíz de estos datos, por qué no existe una recomendación específica de evaluación de ECV en los pacientes con DM2 de reciente diagnóstico o corta evolución. Una evaluación basada no solo en presencia/ausencia de enfermedad clínica (infarto, ictus, enfermedad renal, arteriopatía ocluyente), sino en presencia o ausencia de enfermedad (aterosclerosis). Esta evaluación, al igual que la evaluación fina y sutil que realizamos con la valoración de complicaciones microvasculares (microalbuminuria y no pérdida de filtrado, microaneurismas y no pérdida de visión, o disminución de sensibilidad y no presencia/ausencia de úlcera en pie), debería ser útil para la individualización del tratamiento (objetivos) y seguimiento. De hecho, sin identificar específicamente a quien y cuando, diferentes sociedades científicas recomiendan mover a una categoría de riesgo muy alto (y lo que terapéuticamente esto implica) a pacientes que presentan “placa carotídea”.

Estos resultados y la evidencia actual sobre el tema, refuerzan la necesidad de plantear un ensayo clínico randomizado en el que se traten pacientes según la afectación arterial frente a la forma convencional basada en presencia de factores de riesgo.

2. Diferencias entre sexos en cuanto a la presencia de aterosclerosis preclínica.

Destacamos de nuestro trabajo que la prevalencia de aterosclerosis preclínica en mujeres con DM2 de reciente diagnóstico era similar a la de los hombres con DM2. Las mujeres presentaban más alta prevalencia de PC que sus controles sin DM2, mientras que no existían diferencias significativas en los hombres con DM2 y sus controles. Nuestro estudio fue concebido para detectar en general diferencias en el grupo diabetes frente al grupo no diabetes. Estas diferencias entre sexos son por tanto exploratorias, pero coinciden con lo observado en estudios de eventos clínicos.

El sexo masculino es un FRCV bien establecido, y en comparación con el sexo femenino presenta mayor posibilidad de padecer un evento cardiovascular. En nuestro estudio y en otros publicados han mostrado un aumento del GIMC y PC en pacientes hombres no diabéticos en comparación con mujeres no diabéticas. En cambio en pacientes (hombres y mujeres) que presentan DM2, esta asociación de “sexo masculino-mayor RVC” no se cumple. Comparado con poblaciones sin DM2, la DM2 aumenta el RCV en 3-4 veces en mujeres y solo 2 en hombres¹⁷⁷. Varios estudios han comparado el GIMC y PC en hombres y mujeres. Sin embargo, existe poca información sobre las diferencias en la aterosclerosis preclínica en pacientes hombres y mujeres con DM2 comparados con poblaciones con similares FRCV asociados y sin DM2. Es de reseñar que las pacientes con DM2 de inicio presentaban aterosclerosis preclínica similar a los hombres con DM2, lo que nos hace pensar que la DM2, elimina el efecto protector del sexo a nivel cardiovascular. Entre las razones de estas diferencias, existen varias causas evaluadas en diferentes estudios, entre las cuales podemos destacar: motivos socioeconómicos¹⁷⁸, una menor sensación de riesgo percibido por el clínico asociado al sexo femenino y por tanto tratamiento menos agresivo¹⁷⁹, menor control de los otros FRCV¹⁸⁰, la peor respuesta clínica a algunos fármacos como las estatinas¹⁸¹ y ácido

acetilsalicílico¹⁸², la mayor presencia de obesidad en la mujeres por encima de los >45 años en comparación con los hombres¹⁸³ y el mayor RCV en estadios de prediabetes (principalmente GBA) en mujeres¹⁸⁴.

Nuestros resultados son concordantes con esta hipótesis, de que la enfermedad cardiovascular es más agresiva y tiene un peor pronóstico en mujeres, siempre y cuando las comparemos con las mujeres sin diabetes, y las pone a un nivel de riesgo similar al de los hombres con diabetes.

3. Predominio de características propias de la diabetes en la asociación con la enfermedad preclínica

Tal y como hemos reflejado en la introducción los pacientes con diabetes tienen asociados más FRCV clásicos y esto puede ser una causa de mayor prevalencia de aterosclerosis y de eventos cardiovasculares en esta población. Es por este motivo que, apareamos los pacientes, además de por edad y sexo (los principales factores de riesgo), por los principales FRCV que presentaban (dislipemia en tratamiento si/no, fumador activo si/no, hipertensión en tratamiento si/no). Quisimos con ello intentar identificar los factores específicos de la diabetes que contribuían a las diferencias que se hipotetizaba se encontrarían.

De las características propias de la DM2 encontramos una asociación, entre la mayor prevalencia de aterosclerosis preclínica y la HbA1c, OR 1,27 [1,00-1,62] para la presencia de ≥ 3 PC. Es posible que el tiempo en prediabetes (del cual no tenemos datos), que podría relacionarse con una mayor HbA1c al diagnóstico, pueda haber tenido relación con estos hallazgos, ya que estudios epidemiológicos indican que la aterosclerosis ya se inicia en etapas más tempranas y que los pacientes con prediabetes tienen mayor riesgo cardiovascular, tal y como mostramos en la introducción; la GBA y la TGA ya presentan riesgos aumentados de enfermedad coronaria, AVC y todas las causas de mortalidad.

En cuanto a la presencia de dislipemia diabética, ya comentamos, que es por sí misma un indicador de alto riesgo cardiovascular en los sujetos con diabetes. En nuestro trabajo, esta asociación se hace evidente, con la presencia de ≥ 3 PC en los pacientes que presentaban dislipemia diabética (por cada incremento de 1mg/dl de HDL OR 0,96 [0,93-0,99]) y por cada incremento de 1mg/dl de triglicéridos OR 1,01 [1,001-1,013]). También existía esta asociación mediante la caracterización del perfil lipídico mediante

RMN-espectroscopia, el tamaño de VLDL (OR 2,044[1,320-3,166]) y la ratio colesterol/triglicéridos en el HDL (OR 0,638[0,477-0,852]), estaban asociados con la carga de placa carotídea (≥ 3 placas) independientemente de factores de confusión (incluidos los niveles convencionales de lípidos).

En cambio el IMC o la resistencia a la insulina, que a priori podríamos pensar que influirían en su prevalencia, en nuestro estudio no se mostraron significativos. A pesar de ello, sabemos que la obesidad y esta resistencia a la insulina, son factores que marcan el inicio de la dislipemia diabética y por tanto, serían los inductores de este tipo de dislipemia, que finalmente provocaría esta mayor presencia de aterosclerosis. Tampoco otros factores que están relacionados con la inflamación, como la PCR ultrasensible o los leucocitos totales, se mostraron significativos.

4. Ecografía carotídea: una herramienta para la evaluación de la enfermedad preclínica y su utilidad clínica

De todos los posibles marcadores de aterosclerosis, la imagen ha demostrado con claridad ser la mejor herramienta, no sólo en la detección de enfermedad, y su asociación con eventos futuros, sino por su capacidad de reclasificar individuos en diferentes niveles de riesgo¹²⁶. Por tanto permite ayudar al clínico a individualizar la propuesta terapéutica a los pacientes y a prescribir informando mejor al paciente. Esta es la base de la medicina personalizada, en la que nos acercamos más a los problemas del paciente más allá del grupo de riesgo al que pertenece.

En atención primaria, se utiliza frecuentemente el ITB, pero tal y como comentamos en la introducción, es conocido que la presencia de DM es el factor que más afecta a la validez de esta prueba, por lo que la eficacia diagnóstica del ITB podría estar limitada en estos pacientes, ya que valores normales podrían no ser suficientes para descartar EAP, debido a su baja sensibilidad y alto índice de falsos negativos. Además no discrimina fases precoces de aterosclerosis, ya que en pacientes con DM2 un ITB<0,9 podría indicar estenosis de hasta 40-50%. Por tanto mientras que el paciente con ITB < 0,9 es sin duda un paciente en una etapa avanzada de aterosclerosis, el que no lo tiene no tiene por qué estar libre de enfermedad significativa. Por estos motivos, el ITB, no se consideraría de elección en el cribado preclínico de ECV en los pacientes con DM2 en las fases más iniciales de la enfermedad.

El CAC, en cambio, es una técnica que sí podría ser de utilidad para este diagnóstico precoz de ECV en los pacientes con DM2. Su mayor ventaja es su alto valor predictivo negativo según el cual una persona con CAC igual a 0 estaría libre de eventos cardiovasculares al menos en los 5 años posteriores a la realización de la prueba¹⁸⁵. Pero presenta diferentes inconvenientes (alto coste, irradiación y incidencia de nódulos

pulmonares) que hacen que actualmente no sea una prueba complementaria al alcance de nuestras consultas de atención primaria.

En nuestro estudio hemos valorado la enfermedad aterosclerótica preclínica mediante ecografía carotídea. La ecografía es una prueba complementaria muy accesible para el médico de atención primaria. Además en los últimos años, la ecografía ha pasado de ser una exploración complementaria realizada por radiólogos, y de circuito hospitalario preferentemente, a ser realizada por clínicos (incluido el médico de familia en los centros de atención primaria) para la ayuda a la decisión clínica.

En este sentido, la exploración ecográfica con el objetivo de detectar enfermedad arteriosclerótica se ha desarrollado más allá de la propia carótida, para viajar a otras estructuras vasculares. En el 2012 Zweig et al¹⁸⁶ demostraron que la presencia de ateromatosis en la aorta abdominal es un predictor de presencia de placa de ateroma coronaria y de cardiopatía isquémica utilizando la tomografía computerizada sin contraste y la angiografía coronaria, con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 57%. En la cohorte MESA (MultiEthnic Study of Atherosclerosis) se demuestra una asociación fuerte entre la presencia de calcio en la aorta abdominal y otras medidas de aterosclerosis subclínica, particularmente con la presencia de calcio en las arterias coronarias. Este mismo estudio demuestra que la edad, la DM2, el tabaquismo y las cifras elevadas de LDL-colesterol eran factores de riesgo independientes para el desarrollo de ateromatosis en la aorta abdominal¹⁸⁷. Un reciente estudio nipón llevado a cabo por Hirata et al se evaluó por medio de ecografía la presencia de arteriosclerosis sistémica en 102 pacientes diabéticos determinando que más del 60% presentaban arteriosclerosis en distintos territorios vasculares, que incluían el territorio carotídeo, aorta, ilíacas y arterias renales¹⁸⁸. Este estudio nos aporta ideas de futuro en relación a una posible evaluación global del riesgo fundamentada en la observación de distintos

territorios vasculares que permitiría establecer sistemas de puntuación de daño vascular, algo que sin duda podría sustituir, a largo plazo, a las ecuaciones de estimación de riesgo que conocemos. En nuestro país Sisó-Almirall et al¹⁸⁹ ha realizado un estudio en la misma línea, llevado a cabo en Atención Primaria y mediante ecografía de bolsillo. En dicho estudio se analizó la presencia de aneurisma de aorta abdominal pero también la presencia de ateromatosis de la aorta abdominal en una cohorte de 106 pacientes, de los cuales el 38% presentaron ateromatosis, siendo la DM2 un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la misma (OR 3,35).

Debido a la mayor capacitación de los médicos de familia en esta técnica, junto con la disponibilidad cada vez más frecuente de ecógrafos en los centros de atención primaria, hace que se pueda valorar, en un futuro bastante inmediato, que el médico de familia pueda diagnosticar enfermedad cardiovascular en estados más precoces mediante esta técnica, valorando por ejemplo, si presentan placa carotídea o no.

5. Caracterización y estudio de la Dislipemia aterogénica

Según los datos aportados en los estudios publicados para la realización de esta tesis, la dislipemia aterogénica, frecuentemente infravalorada y tratada en nuestras consultas, parece ser clave en la génesis de la aterosclerosis.

En nuestras consultas evaluamos el perfil lipídico de los pacientes con DM2, incluyendo el colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos y dependiendo del objetivo a conseguir de LDL iniciamos tratamiento con estatinas. No evaluamos de manera tan específica la presencia de dislipemia diabética, pero tal y como hemos explicado, tendríamos que plantear en algunos pacientes, objetivos de cifras de triglicéridos < 150-200 mg/dl y cifras de HDL >40/45mg/dl (hombres/mujeres) con muy probablemente igual importancia que el objetivo de LDL. El tratamiento de esta dislipemia es un elemento trascendental que podría mejorar el riesgo residual que queda tras el tratamiento con estatinas mediante la instauración de cambios de estilo de vida, el ejercicio físico y la valoración de tratamiento con fibratos. El estudio ACCORD, demostró que añadir fibratos a pacientes con diabetes ya tratados con estatinas, no implicaba ningún beneficio cardiovascular. Sin embargo, cuando se estudió que ocurría en el subgrupo de pacientes con dislipemia aterogénica (Triglicéridos $\geq$ 204 mg/dl y HDL $\leq$ 34 mg/dl), se objetivó una reducción absoluta de un 4.9% en el riesgo de eventos cardiovasculares¹⁹⁰. Ésto implicaría que se precisarían tratar a sólo 20 pacientes con diabetes tipo 2 de estas características para evitar un evento cardiovascular. Estos resultados han sido reproducidos en un meta-análisis de ensayos clínicos⁸⁵. Existen ensayos clínicos randomizados en marcha para testar precisamente esta hipótesis (REDUCE-IT (EPA), STRENGTH (OM3-CA)).

Además debido a la importancia de esta patología sería preciso en algunos casos, una mejora en la caracterización y estudio de la dislipemia aterogénica mediante otros biomarcadores o técnicas. En la atención primaria tenemos al alcance algún biomarcador que nos pudiera ayudar a esta evaluación, como el c-no-HDL o la Apo B.

Esta última no se encuentra en todos los centros, pero la primera (c-no-HDL) sería fácilmente calculable (resta resultante del colesterol total menos el HDL) y de hecho guías de práctica clínica nos indican objetivos secundarios para este parámetro después del objetivo primario (el LDL). Según la reciente guía de la Sociedad Española de Aterosclerosis¹⁹¹, el objetivo a conseguir sería un c-no-HDL <130 mg/dl en pacientes de alto riesgo (obesidad abdominal, asociación con otros FRCV, DM) o <100 mg/dl en pacientes de muy alto riesgo (ECV, DM2 con lesión de órgano diana, o asociación FRCV grave) y como objetivo adicional, cifras de triglicéridos <150mg/dl , HDL >40/45 mg/dl (hombres/mujeres).

Otra técnica de imagen para esta mejor caracterización y que hemos utilizado en nuestro estudio es la RMN-espectometría del perfil lipídico. Esta técnica no está disponible en la mayoría de hospitales y menos aún en los centros de salud, pero se trata de una herramienta potente para la investigación, y en nuestro estudio identificó anomalías en el perfil lipídico relacionadas con la dislipemia aterogénica que estaban asociadas a aterosclerosis preclínica y que no eran evidentes con sólo la valoración analítica de dicho perfil.

6. La importancia de la dieta, en especial, en Atención Primaria

El cambio del estilo de vida es un factor fundamental en la prevención y el control de la DM2 y comprende diferentes aspectos como la actividad física, el cese del hábito tabáquico, la reducción de peso y la dieta.

Los centros de atención primaria, con los médicos de familia y profesionales de enfermería son los principales encargados de dar este tipo de recomendaciones. Entre las dietas existentes para la DM2, la dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra y nueces ha mostrado que su utilización en los pacientes de alto riesgo con y sin diabetes¹⁹² reduce la posibilidad de padecer un ECV.

El concepto dieta en el estudio PREDIMED va más allá. Se amplía el concepto al de patrones nutricionales (patrón dieta mediterránea) y la importancia de mejorarlos en ocasiones a expensas de ir marcando objetivos individuales de ciertos componentes clave que mejoran el patrón en general. Uno de estos componentes (además de la fruta/verdura, legumbres, consumo moderado de vino, etc.), es el incremento de consumo de grasa saludable en detrimento de la menos saludable. De manera específica en cuanto a la ingesta de grasa en los pacientes con DM2, las recomendaciones vigentes están encaminadas a la reducción de las grasas saturadas y de los ácidos grasos trans, junto con la recomendación de incrementar la ingesta de ácidos grasos omega-3. En nuestro estudio pudimos observar que pequeños incrementos en la cantidad de ácidos grasos trans en la membrana de los hematíes, estaban asociados a una mayor prevalencia de aterosclerosis preclínica y por el contrario, pequeños incrementos de ácidos grasos saludables se asociaban a menor prevalencia de aterosclerosis; por tanto, nuestro estudio apoya las vigentes recomendaciones sobre la ingesta de grasas. Los resultados más importantes fueron que por cada incremento de 0,1% de la proporción de ácidos grasos trans C18:1 en membrana de hematíes, la prevalencia de PC aumentaba en

un 53% ($p=0,002$). Contrariamente, el incremento de 0,1% de los valores de ácido alfa-linoleico (ácido graso vegetal omega-3), presentaba una disminución de prevalencia de PC en un 43% ($p=0,001$). Es también importante destacar que el biomarcador usado en nuestro trabajo, ácidos grasos de membrana eritrocitaria, nos muestra de manera objetiva la cantidad de ácidos grasos que se incorporan a las membranas celulares y por tanto cuál es la carga real de los ácidos grasos menos saludables en estos pacientes, a diferencia de la subjetividad de la valoración cualitativa de las encuestas alimentarias. Pero, a pesar de su superioridad en la evaluación de la valoración de la ingesta grasa por parte del paciente y su capacidad como posible predictor de eventos cardiovasculares futuros, esta técnica, actualmente solo se realiza y está al alcance en centros especializados, muy relacionados con la investigación, por lo que no está aún al abasto de los clínicos.

Así pues, las recomendaciones dietéticas ofrecidas por parte del equipo de atención primaria, y los registros sencillos de adherencia a patrones nutricionales cardiosaludables (como por ejemplo los 14 o 17 ítems de dieta mediterránea)⁴⁴ siguen siendo parte fundamental en el consejo dietético a los pacientes con DM2, tanto en el momento del diagnóstico de la enfermedad como en su posterior seguimiento.

7. Investigación Atención Primaria-Hospital

La investigación en atención primaria es desde hace años una herramienta de una importancia incuestionable para mejorar el conocimiento de muchas enfermedades prevalentes. Existen diferentes causas por las que la Atención Primaria es el ámbito asistencial donde la investigación desarrollada por médicos de familia, enfermería y otros profesionales de los centros de salud es clave¹⁹³:

1. Se atienden y se pueden diagnosticar las enfermedades en fases más precoces.
2. Es donde se atienden las enfermedades más prevalentes.
3. Existe una relación continua con los pacientes, lo que ofrece la oportunidad de la observación de los pacientes durante toda su vida y en su marco bio-psico-social.
4. Es posible el acceso a la población general para establecer estudios epidemiológicos, debido que tan solo un pequeño porcentaje de pacientes se atienden el ámbito hospitalario.

A raíz de lo comentado, junto con la excelencia de los resultados científicos obtenidos por la Unidad de Investigación del CAPSBE, y debido a la buena experiencia de nuestro equipo en el desarrollo de la presente tesis doctoral, con diferentes ámbitos asistenciales implicados, creemos que la investigación transversal entre los equipos de atención primaria y los institutos o servicios hospitalarios debe ser estratégica en los planes de investigación de Sanidad y financiada de forma suficientemente atractiva con el fin de que siga siendo competitiva .

6. CONCLUSIONES

1. La edad vascular (GIMC) de los pacientes con DM2 de reciente diagnóstico es superior a la de una población control sin diabetes de similar edad y sexo y prevalencia de hipertensión arterial, dislipemia, y tabaquismo.
2. La presencia de placa carotídea tiende a ser más prevalente en los pacientes con DM2 de reciente diagnóstico en comparación con una población control sin diabetes de similar edad y sexo y prevalencia de hipertensión arterial, dislipemia, y tabaquismo.
3. Esta mayor prevalencia de enfermedad subclínica (GIMC) o preclínica (PC) se asocia a las características de riesgo propias de los pacientes con diabetes, en particular la HbA1c y la dislipemia aterogénica.
4. La RMN-espectometría del perfil lipídico identifica anormalidades en los pacientes con reciente diagnóstico de DM2 (dislipemia aterogénica) y presencia de aterosclerosis preclínica.
5. Existe una asociación entre la mayor proporción de ácidos grasos trans en la membrana de los hematíes y la presencia de aterosclerosis preclínica.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Marathe PH, Gao HX, Close KL. American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes 2017. *J Diabetes* [Internet] 2017 [cited 2017 Jan 24]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28070960>
2. Collaboration GB of MRF for CD, Seuring T, Archangelidi O, et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. *Lancet* [Internet] 2016 [cited 2016 Jun 15];387(10027):1513–30. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616006188>
3. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* [Internet] 2012 [cited 2016 Jun 14];55(1):88–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21987347>
4. Mata-Cases M, Casajuana M, Franch-Nadal J, et al. Direct medical costs attributable to type 2 diabetes mellitus: a population-based study in Catalonia, Spain. *Eur J Heal Econ* [Internet] 2016 [cited 2016 Oct 20];17(8):1001–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10198-015-0742-5>
5. Chan JCN, Gregg EW, Sargent J, et al. Reducing global diabetes burden by implementing solutions and identifying gaps: a Lancet Commission. *Lancet* [Internet] 2016 [cited 2016 Jun 15];387(10027):1494–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616301659>
6. Hadaegh F, Fahimfar N, Khalili D, Sheikholeslami F, Azizi F. New and known type 2 diabetes as coronary heart disease equivalent: results from 7.6 year follow up in a Middle East population. *Cardiovasc Diabetol* [Internet] 2010 [cited 2016 Jun 15];9:84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21129219>
7. Vaccaro O, Eberly LE, Neaton JD, et al. Impact of diabetes and previous myocardial infarction on long-term survival: 25-year mortality follow-up of primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arch Intern Med* [Internet] 2004 [cited 2016 Jun 15];164(13):1438–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15249353>
8. Sattar N. Revisiting the links between glycaemia, diabetes and cardiovascular disease.
9. Haffner, Haffner S. 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;339(4):229–34.
10. Cano JF, Baena-Diez JM, Franch J, et al. Long-Term Cardiovascular Risk in Type 2 Diabetic Compared With Nondiabetic First Acute Myocardial Infarction Patients. *Diabetes Care* 2010;33(9).
11. Rana JS, Liu JY, Moffet HH, Jaffe M, Karter AJ. Diabetes and Prior Coronary Heart Disease are Not Necessarily Risk Equivalent for Future Coronary Heart Disease Events. *J Gen Intern Med* [Internet] 2016 [cited 2016 Dec 16];31(4):387–93. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11606-015-3556-3>
12. González-Clemente JM, Palma S, Arroyo J, et al. [Is diabetes mellitus a coronary heart disease equivalent? Results of a meta-analysis of prospective studies]. *Rev Esp Cardiol* [Internet] 2007 [cited 2017 Jan 18];60(11):1167–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996177>
13. Emerging Risk Factors Collaboration (inc Fletcher A,) Sarwar N, Gao P, et al.

- Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. 2010;
14. Tancredi M, Rosengren A, Svensson A-M, et al. Excess Mortality among Persons with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* [Internet] 2015 [cited 2017 Jan 18];373(18):1720–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26510021>
 15. Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ* [Internet] 2006 [cited 2017 Mar 17];332(7533):73–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371403>
 16. Turner RC. The U.K. Prospective Diabetes Study. A review. *Diabetes Care* [Internet] 1998 [cited 2016 Jun 16];21 Suppl 3:C35-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9850487>
 17. Khunti K, Davies M, Majeed A, Thorsted BL, Wolden ML, Paul SK. Hypoglycemia and Risk of Cardiovascular Disease and All-Cause Mortality in Insulin-Treated People With Type 1 and Type 2 Diabetes: A Cohort Study. *Diabetes Care* [Internet] 2015 [cited 2016 Dec 9];38(2):316–22. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/dc14-0920>
 18. ADVANCE-Action in Diabetes and Vascular Disease: patient recruitment and characteristics of the study population at baseline. *Diabet Med* [Internet] 2005 [cited 2016 Oct 20];22(7):882–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1464-5491.2005.01596.x>
 19. Nicolau Ramis J, Masmiqel Comas L. La historia de la rosiglitazona: mensajes clave. 2010.
 20. Fox CS, Sullivan L, D'Agostino RB, Wilson PWF, Framingham Heart Study. The significant effect of diabetes duration on coronary heart disease mortality: the Framingham Heart Study. *Diabetes Care* [Internet] 2004 [cited 2016 Sep 13];27(3):704–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988289>
 21. Coutinho, Coutinho M. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care* 1999;22(2):233–40.
 22. Ning F, Ning F. Cardiovascular Disease Mortality in Europeans in Relation to Fasting and 2-h Plasma Glucose Levels Within a Normoglycemic Range. *Diabetes Care* 2010;33(10):2211–6.
 23. Lorenz MW, Price JF, Robertson C, et al. Carotid intima-media thickness progression and risk of vascular events in people with diabetes: results from the PROG-IMT collaboration. *Diabetes Care* [Internet] 2015 [cited 2016 Jun 21];38(10):1921–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26180107>
 24. The Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* [Internet] 2010 [cited 2016 Dec 9];375(9733):2215–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610604849>
 25. Bamberg F, Hetterich H, Rospleszcz S, et al. Subclinical Disease Burden as Assessed by Whole-Body MRI in Subjects With Prediabetes, Subjects With Diabetes, and Normal Control Subjects From the General Population: The KORA-MRI Study. *Diabetes* 2016;66(1).

26. Huang Y, Cai X, Mai W, Li M, Hu Y. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ* [Internet] 2016 [cited 2017 Apr 12];355. Available from: <http://www.bmj.com/content/355/bmj.i5953.long>
27. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993;329(14):977–86.
28. Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, Gerstein HC, Miller ME, et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* [Internet] 2008 [cited 2016 Oct 20];358(24):2545–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539917>
29. Duckworth W, Abairra C, Moritz T, et al. Glucose Control and Vascular Complications in Veterans with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* [Internet] 2009 [cited 2016 Oct 20];360(2):129–39. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0808431>
30. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* [Internet] 2008 [cited 2016 Oct 20];359(15):1577–89. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0806470>
31. Zoungas S, Chalmers J, Neal B, et al. Follow-up of Blood-Pressure Lowering and Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* [Internet] 2014 [cited 2016 Oct 20];371(15):1392–406. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1407963>
32. Pedersen O, Gæde P. Intensified multifactorial intervention and cardiovascular outcome in type 2 diabetes: the Steno-2 study. *Metabolism* 2003;52:19–23.
33. Gæde P, Oellgaard J, Carstensen B, et al. Years of life gained by multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: 21 years follow-up on the Steno-2 randomised trial. *Diabetologia* [Internet] 2016 [cited 2016 Sep 12];1–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-016-4065-6>
34. Collins R, Reith C, Emberson J, et al. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *Lancet* [Internet] 2016 [cited 2017 Feb 10];388(10059):2532–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27616593>
35. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Fulcher J, O'Connell R, et al. Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174 000 participants in 27 randomised trials. *Lancet* [Internet] 2015 [cited 2017 Feb 10];385(9976):1397–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25579834>
36. Chou R, Dana T, Blazina I, Daeges M, Jeanne TL. Statins for Prevention of Cardiovascular Disease in Adults: Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA* [Internet] 2016 [cited 2017 Feb 10];316(19):2008–24. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2015.15629>
37. Rajpathak SN, Kumbhani DJ, Crandall J, Barzilai N, Alderman M, Ridker PM. Statin Therapy and Risk of Developing Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *Diabetes Care* [Internet] 2009 [cited 2017 Feb 10];32(10):1924–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19794004>
38. Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, et al. Ezetimibe Added to Statin

- Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med* [Internet] 2015 [cited 2017 Feb 10];372(25):2387–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26039521>
39. Havranek EP, Esler A, Estacio RO, Mehler PS, Schrier RW, Appropriate Blood Pressure Control in Diabetes Trial. Differential effects of antihypertensive agents on electrocardiographic voltage: results from the Appropriate Blood Pressure Control in Diabetes (ABCD) trial. *Am Heart J* [Internet] 2003 [cited 2017 Feb 10];145(6):993–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796754>
 40. Sleight P. The HOPE Study (Heart Outcomes Prevention Evaluation). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* [Internet] 2000 [cited 2017 Feb 10];1(1):18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11967789>
 41. Kjeldsen SE, Dahlöf B, Devereux RB, et al. Effects of losartan on cardiovascular morbidity and mortality in patients with isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy: a Losartan Intervention for Endpoint Reduction (LIFE) substudy. *JAMA* [Internet] 2002 [cited 2017 Feb 10];288(12):1491–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12243636>
 42. Kunutsor SK, Seidu S, Khunti K. Aspirin for primary prevention of cardiovascular and all-cause mortality events in diabetes: updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabet Med* [Internet] 2016 [cited 2017 Feb 10]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27086572>
 43. Look AHEAD Research Group, Wing RR. Long-term Effects of a Lifestyle Intervention on Weight and Cardiovascular Risk Factors in Individuals With Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Intern Med* [Internet] 2010 [cited 2017 Feb 10];170(17):1566–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876408>
 44. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N Engl J Med* [Internet] 2013 [cited 2017 Feb 15];368(14):1279–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432189>
 45. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* (London, England) [Internet] 1998 [cited 2017 Feb 10];352(9131):854–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742977>
 46. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* [Internet] 2015 [cited 2017 Apr 19];373(22):2117–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26378978>
 47. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, et al. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* [Internet] 2016 [cited 2017 Feb 10];375(4):311–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27295427>
 48. Spijkerman AMW, Henry RMA, Dekker JM, et al. Prevalence of macrovascular disease amongst type 2 diabetic patients detected by targeted screening and patients newly diagnosed in general practice: the Hoorn Screening Study. *J Intern Med* [Internet] 2004 [cited 2017 Mar 22];256(5):429–36. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2004.01395.x>
 49. Winkley K, Thomas SM, Sivaprasad S, et al. The clinical characteristics at diagnosis of type 2 diabetes in a multi-ethnic population: the South London

- Diabetes cohort (SOUL-D). *Diabetologia* [Internet] 2013 [cited 2016 Dec 9];56(6):1272–81. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-013-2873-5>
50. Polak JF, Backlund J-YC, Cleary PA, et al. Progression of Carotid Artery Intima-Media Thickness During 12 Years in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study. *Diabetes* [Internet] 2011 [cited 2015 Oct 10];60(2):607–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3028362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 51. Mata-Cases M, Fernández-Bertolín E, García-Durán M, Cos-Claramunt X, Pareja-Rossell C, Pujol-Ribera E. Prevalencia de enfermedad cardiovascular en personas recién diagnosticadas de diabetes mellitus tipo 2. *Gac Sanit* [Internet] 2009 [cited 2016 Oct 17];23(2):133–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213911108000496>
 52. Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* [Internet] 2015 [cited 2016 Sep 13];209(1):13–22. Available from: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201412052>
 53. Sigurdardottir V, Fagerberg B, Hulthe J. Preclinical atherosclerosis and inflammation in 61-year-old men with newly diagnosed diabetes and established diabetes. *Diabetes Care* [Internet] 2004 [cited 2015 Oct 10];27(4):880–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15047642>
 54. Li L-X, Zhao C-C, Ren Y, et al. Prevalence and clinical characteristics of carotid atherosclerosis in newly diagnosed patients with ketosis-onset diabetes: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol* [Internet] 2013 [cited 2015 Oct 9];12:18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3583071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 55. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Kalidindi S, et al. Effect of diabetes on progression of coronary atherosclerosis and arterial remodeling: a pooled analysis of 5 intravascular ultrasound trials. *J Am Coll Cardiol* [Internet] 2008 [cited 2016 Sep 13];52(4):255–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18634979>
 56. Bornfeldt KE. 2013 Russell Ross Memorial Lecture in Vascular Biology: Cellular and Molecular Mechanisms of Diabetes Mellitus-Accelerated Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet] 2014 [cited 2016 Oct 20];34(4):705–14. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.113.301928>
 57. Low Wang CC, Hess CN, Hiatt WR, Goldfine AB. Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Circulation* [Internet] 2016 [cited 2016 Sep 12];133(24):2459–502. Available from: <http://circ.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022194>
 58. Hanley A, Hanley A. Prediction of type 2 diabetes using simple measures of insulin resistance: combined results from the San Antonio Heart Study, the Mexico City Diabetes Study, and the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. (vol 52, pg 463, 2003). *Diabetes* 2003;52(5):1306–1306.
 59. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* [Internet] 2015 [cited 2016 Sep 12];38(1):140–

9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25538310>
60. Tataranni, Tataranni P. A burning question - Does an adipokine-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes? *Diabetes* 2005;54(4):917–27.
61. Ridker, Ridker P. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342(12):836–43.
62. Williams SB, Cusco JA, Roddy M-A, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* [Internet] 1996 [cited 2016 Oct 20];27(3):567–74. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0735109795005226>
63. Prognostic value of coronary artery calcium screening in subjects with and without diabetes. *ACC Curr J Rev* [Internet] 2004 [cited 2017 Jan 25];13(7):33–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1062145804004957>
64. Hoff J, Hoff JA. The prevalence of coronary artery calcium among diabetic individuals without known coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(6):1008–12.
65. Parhofer KG. Interaction between Glucose and Lipid Metabolism: More than Diabetic Dyslipidemia. *Diabetes Metab J* [Internet] 2015 [cited 2016 Oct 20];39(5):353–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26566492>
66. Hachem SB, Mooradian AD. Familial dyslipidaemias: an overview of genetics, pathophysiology and management. *Drugs* [Internet] 2006 [cited 2016 Nov 2];66(15):1949–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17100406>
67. Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* [Internet] 2006 [cited 2016 Dec 16];35(3):491–510, vii–viii. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889852906000429>
68. Lahsen M. R. Dislipidemia en medicina interna. *Medwave* [Internet] 2010 [cited 2017 Apr 21];10(4). Available from: <http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/4497>
69. Wagner, Wagner AM. Apolipoprotein(B) identifies dyslipidemic phenotypes associated with cardiovascular risk in normocholesterolemic type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999;22(5):812–7.
70. Walldius G, Walldius G. Rationale for using apolipoprotein B and apolipoprotein A-I as indicators of cardiac risk and as targets for lipid-lowering therapy. *Eur Heart J* 2005;26(3):210.
71. Fruchart JC, Sacks FM, Hermans MP. Implications of the ACCORD Lipid study: perspective from the Residual Risk Reduction Initiative (R³ i). *Curr Med Res Opin* [Internet] 2010 [cited 2016 Nov 2];26(8):1793–7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1185/03007995.2010.489341>
72. Fruchart J-C, Davignon J, Hermans MP, et al. Residual macrovascular risk in 2013: what have we learned? *Cardiovasc Diabetol* [Internet] 2014 [cited 2016 Nov 3];13(1):26. Available from: <http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2840-13-26>
73. Horgan, Horgan S. DYSlipidaemia International Study (DYSIS) - Ireland. *Eur Heart J* 2010;31:378–378.
74. Vinagre I, Mata-Cases M, Hermosilla E, et al. Control of glycemia and

- cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes in primary care in Catalonia (Spain). *Diabetes Care* [Internet] 2012 [cited 2014 Feb 18];35(4):774–9. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3308283&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
75. Reiner Ž. Are Elevated Serum Triglycerides Really a Risk Factor for Coronary Artery Disease? *Cardiology* [Internet] 2015 [cited 2016 Nov 3];131(4):225–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25968652>
 76. Lee JS, Chang P-Y, Zhang Y, Kizer JR, Best LG, Howard B V. Triglyceride and HDL-C Dyslipidemia and Risks of Coronary Heart Disease and Ischemic Stroke by Glycemic Dysregulation Status: The Strong Heart Study. *Diabetes Care* [Internet] 2017 [cited 2017 Feb 8];dc161958. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28122840>
 77. Colhoun, Colhoun H. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364(9435):685–96.
 78. Kearney, Kearney P. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet* 2008;371(9607):117–25.
 79. Ko DT, Alter DA, Guo H, et al. High-Density Lipoprotein Cholesterol and Cause-Specific Mortality in Individuals Without Previous Cardiovascular Conditions. *J Am Coll Cardiol* [Internet] 2016 [cited 2016 Dec 19];68(19):2073–83. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109716351579>
 80. Burgess S, Harshfield E. Mendelian randomization to assess causal effects of blood lipids on coronary heart disease: lessons from the past and applications to the future. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* [Internet] 2016 [cited 2017 Jan 18];23(2):124–30. Available from:
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=01266029-201604000-00007>
 81. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Response. *J Am Coll Cardiol* [Internet] 2013 [cited 2017 Jan 18];62(20):1908–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055748>
 82. Briel M, Ferreira-Gonzalez I, You JJ, et al. Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *BMJ* [Internet] 2009 [cited 2016 Nov 3];338(feb16 1):b92–b92. Available from:
<http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.b92>
 83. Sarwar N, Sarwar N. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2007;115(4):450–8.
 84. AIM-HIGH Investigators, Boden WE, Probstfield JL, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med* [Internet] 2011 [cited 2017 Jan 18];365(24):2255–67. Available from:
<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1107579>
 85. Saha SA, Arora RR. Fibrates in the prevention of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus – A pooled meta-analysis of randomized placebo-controlled clinical trials. *Int J Cardiol* [Internet] 2010 [cited 2016 Dec

- 9];141(2):157–66. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527308013806>
86. Rosenblit PD. Do Persons with Diabetes Benefit from Combination Statin and Fibrate Therapy? *Curr Cardiol Rep* [Internet] 2012 [cited 2016 Dec 16];14(1):112–24. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11886-011-0237-7>
 87. Millá Núñez-Corté J, Pedro-Botet J, Brea-Hernando Angel, et al. Consenso de expertos sobre propuestas para la mejora del manejo de la dislipemia aterogénica Use of Expert Consensus to Improve Atherogenic Dyslipidemia Management. *Rev Española Cardiol* 2014;67(1):36–44.
 88. Consenso sobre tratamiento farmacológico de la dislipidemia aterogénica con terapia combinada estatina-fenofibrato. 2016.
 89. Anderson, Anderson K. AN UPDATED CORONARY RISK PROFILE. *Circulation* 1990;82(4):393–393.
 90. D’Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, et al. General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care: The Framingham Heart Study. *Circulation* [Internet] 2008 [cited 2016 Dec 20];117(6):743–53. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.699579>
 91. Marrugat J, Solanas P, D’Agostino R, et al. Estimación del riesgo coronario en España mediante la ecuación de Framingham calibrada. *Rev Española Cardiol* 2003;56(3):253–61.
 92. Aranceta J, Aranceta J. Tables of coronary risk evaluation adapted to the Spanish population: the DORICA study. *Med Clin (Barc)* 2004;123(18):686–91.
 93. Predicting cardiovascular risk in England and Wales: prospective derivation and validation of QRISK2.
 94. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. *J Am Coll Cardiol* [Internet] 2014 [cited 2016 Nov 4];63(25):2889–934. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109713060282>
 95. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* [Internet] 2003 [cited 2016 Jun 15];24(11):987–1003. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788299>
 96. ADAPTACIÓN ESPAÑOLA DE LAS GUÍAS EUROPEAS DE 2016 SOBRE PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA PRÁCTICA CLÍNICA. *Rev Esp Salud Pública* [Internet] 2016 [cited 2017 Jan 23];90(24):1–24. Available from: www.msc.es/resp
 97. Perk J, De Backer G, Gohlke H, et al. “European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012)” The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by *Eur Heart J* 2012;33(17).
 98. Jellinger PS, Handelsman Y, Bell DSH, et al. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY GUIDELINES FOR MANAGEMENT OF DYSLIPIDEMIA AND PREVENTION OF ATHEROSCLEROSIS. *Endocr Pract* [Internet] 2017 [cited 2017 Feb 8];(aop):EP171764.GL. Available from:
<http://journals.aace.com/doi/10.4158/EP171764.GL>
 99. Maiques Galán A, Brotons Cuixart C, Banegas Banegas JR, et al.

- Recomendaciones preventivas cardiovasculares. PAPPS 2016. Atención Primaria [Internet] 2016 [cited 2016 Nov 4];48:4–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0212656716301858>
100. Hayes AJ, Leal J, Gray AM, Holman RR, Clarke PM. UKPDS Outcomes Model 2: a new version of a model to simulate lifetime health outcomes of patients with type 2 diabetes mellitus using data from the 30 year United Kingdom Prospective Diabetes Study: UKPDS 82. *Diabetologia* [Internet] 2013 [cited 2016 Dec 20];56(9):1925–33. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-013-2940-y>
 101. van Dieren S, Beulens JWJ, Kengne AP, et al. Prediction models for the risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes: a systematic review. *Heart* [Internet] 2012 [cited 2016 Dec 16];98(5):360–9. Available from: <http://heart.bmj.com/lookup/doi/10.1136/heartjnl-2011-300734>
 102. van Holten TC, Waanders LF, de Groot PG, et al. Circulating Biomarkers for Predicting Cardiovascular Disease Risk; a Systematic Review and Comprehensive Overview of Meta-Analyses. *PLoS One* [Internet] 2013 [cited 2016 Nov 3];8(4):e62080. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0062080>
 103. Eschwège E, Eschwège E. The dysmetabolic syndrome, insulin resistance and increased cardiovascular (CV) morbidity and mortality in type 2 diabetes: aetiological factors in the development of CV complications. *Diabetes Metab* [Internet] 2003 [cited 2016 Nov 3];29(4):6S19-6S27. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1262363603727840>
 104. Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De Pergola G. C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. *Int J Obes* [Internet] 2001 [cited 2016 Nov 3];25(10):1416–20. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.ijo.0801719>
 105. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* (London, England) [Internet] 2010 [cited 2017 May 2];375(9709):132–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673609617177>
 106. IL6R Genetics Consortium Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Butterworth AS, et al. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. *Lancet* (London, England) [Internet] 2012 [cited 2017 May 2];379(9822):1205–13. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673611619314>
 107. Kordalewska M, Markuszewski MJ. Metabolomics in cardiovascular diseases. *J Pharm Biomed Anal* [Internet] 2015 [cited 2017 Jan 27];113:121–36. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073170851500254X>
 108. Mora S, Szklo M, Otvos JD, et al. LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* [Internet] 2007 [cited 2017 Feb 8];192(1):211–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915006002590>
 109. Gaillard T, Osei K. Ethnic differences in serum lipids and lipoproteins in overweight/obese African-American and white American women with pre-diabetes: significance of NMR-derived lipoprotein particle concentrations and sizes. *BMJ Open Diabetes Res Care* [Internet] 2016 [cited 2017 Feb 8];4(1):e000246. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27547417>
110. Lorenz MW, Price JF, Robertson C, et al. Carotid intima-media thickness progression and risk of vascular events in people with diabetes: results from the PROG-IMT collaboration. *Diabetes Care* [Internet] 2015 [cited 2016 Jun 21];38(10):1921–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26180107>
 111. Selvin E, Lazo M, Chen Y, et al. Diabetes Mellitus, Prediabetes, and Incidence of Subclinical Myocardial DamageCLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation* 2014;130(16).
 112. Sherwood MW, Kristin Newby L. High-Sensitivity Troponin Assays: Evidence, Indications, and Reasonable Use. *J Am Heart Assoc* 2014;3(1).
 113. Vasile VC, Jaffe AS. Natriuretic Peptides and Analytical Barriers. *Clin Chem* 2016;63(1).
 114. Zhao G, Huang L, Song M, Song Y. Baseline serum uric acid level as a predictor of cardiovascular disease related mortality and all-cause mortality: A meta-analysis of prospective studies. *Atherosclerosis* [Internet] 2013 [cited 2017 Feb 8];231(1):61–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24125412>
 115. Capuano V, Marchese F, Capuano R, et al. Hyperuricemia as an independent risk factor for major cardiovascular events. *J Cardiovasc Med* [Internet] 2016 [cited 2017 Feb 8];18(3):1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28129213>
 116. Sunderland N, Skroblin P, Barwari T, et al. MicroRNA Biomarkers and Platelet Reactivity. *Circ Res* [Internet] 2017 [cited 2017 Feb 8];120(2):418–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104774>
 117. Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNA Control of High-Density Lipoprotein Metabolism and Function. *Circ Res* [Internet] 2014 [cited 2017 Feb 8];114(1):183–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385511>
 118. Aboyans, Aboyans. Correction. *Circulation* [Internet] 2013 [cited 2016 Nov 7];127(1):e264–e264. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIR.0b013e3182806008>
 119. Yao ST. Haemodynamic studies in peripheral arterial disease. *Br J Surg* [Internet] 1970 [cited 2016 Nov 7];57(10):761–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.1800571016>
 120. Lahoz C, Vicente I, Taboada M, Laguna F, Mostaza JM. Índice tobillo-brazo y riesgo cardiovascular estimado mediante la función SCORE en sujetos no diabéticos en prevención primaria. *Clínica e Investig en Arterioscler* [Internet] 2006 [cited 2016 Nov 7];18(2):45–50. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0214916806736555>
 121. Newman, Newman A. ANKLE-ARM INDEX AS A MARKER OF ATHEROSCLEROSIS IN THE CARDIOVASCULAR HEALTH STUDY. *Circulation* 1993;88(3):837–45.
 122. Nam Su Chung S, Seung Hwan Han SC, Sang Hyun Lim, et al. Factors Affecting the Validity of Ankle-Brachial Index in the Diagnosis of Peripheral Arterial Obstructive Disease. *Angiology* [Internet] 2010 [cited 2016 Nov 7];61(4):392–6. Available from: <http://ang.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0003319709348295>
 123. Clairotte C, Retout S, Potier L, Roussel R, Escoubet B. Automated Ankle-Brachial Pressure Index Measurement by Clinical Staff for Peripheral Arterial Disease Diagnosis in Nondiabetic and Diabetic Patients. *Diabetes Care* [Internet] 2009 [cited 2016 Nov 7];32(7):1231–6. Available from:

- <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc08-2230>
124. Agatston, Agatston A. QUANTIFICATION OF CORONARY-ARTERY CALCIUM USING ULTRAFAST COMPUTED-TOMOGRAPHY. *J Am Coll Cardiol* 1990;15(4):827–32.
 125. Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk. *Circulation* [Internet] 2014 [cited 2016 Nov 8];129(25 suppl 2):S49–73. Available from: <http://circ.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/01.cir.0000437741.48606.98>
 126. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, et al. 2010 ACCF/AHA Guideline for Assessment of Cardiovascular Risk in Asymptomatic Adults: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* [Internet] 2010 [cited 2016 Jul 5];122(25):e584–636. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIR.0b013e3182051b4c>
 127. Budoff MJ, Achenbach S, Blumenthal RS, et al. Assessment of Coronary Artery Disease by Cardiac Computed Tomography. *Circulation* [Internet] 2006 [cited 2016 Nov 8];114(16):1761–91. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.178458>
 128. Polonsky TS, Polonsky T. Coronary Artery Calcium Score and Risk Classification for Coronary Heart Disease Prediction. *JAMA* [Internet] 2010 [cited 2016 Nov 8];303(16):1610. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2010.461>
 129. Hendel RC, Patel MR, Kramer CM, et al. ACCF/ACR/SCCT/SCMR/ASNC/NASCI/SCAI/SIR 2006 Appropriateness Criteria for Cardiac Computed Tomography and Cardiac Magnetic Resonance Imaging *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1606–13. *J Am Coll Cardiol* [Internet] 2006 [cited 2016 Nov 8];48(7):1475–97. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109706017955>
 130. Kramer CK, Zinman B, Gross JL, et al. Coronary artery calcium score prediction of all cause mortality and cardiovascular events in people with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *BMJ* [Internet] 2013 [cited 2017 Jan 24];346(mar25 1):f1654–f1654. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.f1654>
 131. Silverman MG, Blaha MJ, Budoff MJ, et al. Potential Implications of Coronary Artery Calcium Testing for Guiding Aspirin Use Among Asymptomatic Individuals With Diabetes. *Diabetes Care* 2012;35(3).
 132. Yapei Y, Xiaoyan R, Sha Z, et al. Clinical Significance of Arterial Stiffness and Thickness Biomarkers in Type 2 Diabetes Mellitus: An Up-To-Date Meta-Analysis. *Med Sci Monit* [Internet] 2015 [cited 2016 Jun 14];21:2467–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26295503>
 133. Touboul P-J, Hennerici MG, Meairs S, et al. Mannheim Carotid Intima-Media Thickness and Plaque Consensus (2004–2006–2011). *Cerebrovasc Dis* [Internet] 2012 [cited 2017 Jan 31];34(4):290–6. Available from: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000343145>
 134. Stein JH, Tattersall MC. Carotid Intima-Media Thickness and Cardiovascular Disease Risk Prediction. *J Am Coll Cardiol* [Internet] 2014 [cited 2017 Jan 31];63(21):2301–2. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109714011528>
 135. de Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, et al. Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation* [Internet] 2004

- [cited 2016 Jun 21];109(23 Suppl 1):III33-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15198964>
136. Bots ML, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and lower extremity arterial atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb [Internet]* 1994 [cited 2016 Jun 21];14(12):1885–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7981175>
 137. Amato M, Montorsi P, Ravani A, et al. Carotid intima-media thickness by B-mode ultrasound as surrogate of coronary atherosclerosis: correlation with quantitative coronary angiography and coronary intravascular ultrasound findings. *Eur Heart J [Internet]* 2007 [cited 2016 Jun 21];28(17):2094–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597051>
 138. Junyent M, Zambón D, Gilabert R, Núñez I, Cofán M, Ros E. Carotid atherosclerosis and vascular age in the assessment of coronary heart disease risk beyond the Framingham Risk Score. *Atherosclerosis* 2008;196(2):803–9.
 139. Grau M, Subirana I, Agis D, et al. Grosor íntima-media carotídeo en población española: valores de referencia y asociación con los factores de riesgo cardiovascular. *Rev Española Cardiol [Internet]* 2012 [cited 2015 Oct 10];65(12):1086–93. Available from: <http://www.revespcardiol.org/es/grosor-intima-media-carotideo-poblacion-espanola/articulo/90165278/>
 140. Bots, Bots M. Cross-sectionally assessed carotid intima-media thickness relates to long-term risk of stroke, coronary heart disease and death as estimated by available risk functions. *J Intern Med* 1999;245(3):269–76.
 141. Lorenz M, Lorenz MW. Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Stroke* 2006;37(1):87–92.
 142. Chambless, Chambless LE. 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;146(6):483–94.
 143. 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 [Internet]* 2007 [cited 2016 Jun 21];115(4):459–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17242284>
 144. Lorenz, Lorenz M. Carotid intima-media thickness progression to predict cardiovascular events in the general population (the PROG-IMT collaborative project): a meta-analysis of individual participant data (vol 379, pg 2053, 2012). *Lancet* 2012;380(9840):474–474.
 145. Plichart M, Celermajer DS, Zureik M, et al. Carotid intima-media thickness in plaque-free site, carotid plaques and coronary heart disease risk prediction in older adults. The Three-City Study. *Atherosclerosis [Internet]* 2011 [cited 2017 Feb 1];219(2):917–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915011009300>
 146. Yeboah J, McClelland RL, Polonsky TS, et al. Comparison of Novel Risk Markers for Improvement in Cardiovascular Risk Assessment in Intermediate-Risk Individuals. *JAMA [Internet]* 2012 [cited 2017 Feb 1];308(8):788. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22910756>
 147. Den Ruijter HM, Peters SAE, Anderson TJ, et al. Common Carotid Intima-Media Thickness Measurements in Cardiovascular Risk Prediction. *JAMA [Internet]* 2012 [cited 2017 Feb 6];308(8):796. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22910757>
 148. Brohall G, Odén A, Fagerberg B. Carotid artery intima-media thickness in

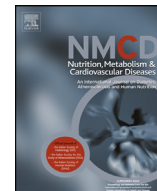
- patients with Type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance: a systematic review. *Diabet Med* [Internet] 2006 [cited 2015 Oct 10];23(6):609–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16759301>
149. Robertson CM, Gerry F, Fowkes R, Price JF. Carotid intima-media thickness and the prediction of vascular events. *Vasc Med* [Internet] 2012 [cited 2017 Jan 31];17(4):239–48. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1358863X12445103>
 150. Okayama KI, Mita T, Gosho M, et al. Carotid intima-media thickness progression predicts cardiovascular events in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet] 2013 [cited 2016 Jun 14];101(3):286–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23835494>
 151. Roman MJ, Naqvi TZ, Gardin JM, et al. American society of echocardiography report. Clinical application of noninvasive vascular ultrasound in cardiovascular risk stratification: a report from the American Society of Echocardiography and the Society for Vascular Medicine and Biology. *Vasc Med* [Internet] 2006 [cited 2016 Jun 21];11(3):201–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17288128>
 152. Gepner AD, Young R, Delaney JA, et al. Comparison of Coronary Artery Calcium Presence, Carotid Plaque Presence, and Carotid Intima-Media Thickness for Cardiovascular Disease Prediction in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Imaging* [Internet] 2015 [cited 2017 Jan 31];8(1):e002262–e002262. Available from: <http://circimaging.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCIMAGING.114.002262>
 153. Polak JF, Pencina MJ, Pencina KM, O'Donnell CJ, Wolf PA, D'Agostino RB. Carotid-Wall Intima-Media Thickness and Cardiovascular Events. *N Engl J Med* [Internet] 2011 [cited 2017 Feb 6];365(3):213–21. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1012592>
 154. Spence JD. Carotid plaque measurement is superior to IMT. *Atherosclerosis* [Internet] 2012 [cited 2017 Feb 6];220(1):34–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803357>
 155. Nambi V, Pedroza C, Kao LS. Carotid intima-media thickness and cardiovascular events. *Lancet (London, England)* [Internet] 2012 [cited 2016 Jun 14];379(9831):2028–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541276>
 156. Johnsen SH, Mathiesen EB, Joakimsen O, et al. Carotid Atherosclerosis Is a Stronger Predictor of Myocardial Infarction in Women Than in Men: A 6-Year Follow-Up Study of 6226 Persons: The Tromso Study. *Stroke* [Internet] 2007 [cited 2016 Jun 16];38(11):2873–80. Available from: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/STROKEAHA.107.487264>
 157. Njølstad I, Mathiesen EB, Schirmer H, Thelle DS. The Tromsø study 1974–2016: 40 years of cardiovascular research. *Scand Cardiovasc J* [Internet] 2016 [cited 2017 Feb 15];50(5–6):276–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27650831>
 158. Polak JF, Szklo M, Kronmal RA, et al. The Value of Carotid Artery Plaque and Intima-Media Thickness for Incident Cardiovascular Disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* [Internet] 2013 [cited 2017 Feb 15];2(2):e000087–e000087. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23568342>
 159. Wannarong T, Parraga G, Buchanan D, et al. Progression of Carotid Plaque

- Volume Predicts Cardiovascular Events. *Stroke* [Internet] 2013 [cited 2015 Oct 10];44(7):1859–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23735956>
160. Huibers A, de Borst GJ, Bulbulia R, Pan H, Halliday A, ACST-1 collaborative group. Plaque Echolucency and the Risk of Ischaemic Stroke in Patients with Asymptomatic Carotid Stenosis Within the First Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST-1). *Eur J Vasc Endovasc Surg* [Internet] 2016 [cited 2017 Feb 6];51(5):616–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26725253>
 161. Nonin S, Iwata S, Sugioka K, et al. Plaque surface irregularity and calcification length within carotid plaque predict secondary events in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* [Internet] 2017 [cited 2017 Feb 14];256:29–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27998824>
 162. Katakami N, Kaneto H, Osonoi T, et al. Usefulness of lipoprotein ratios in assessing carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* [Internet] 2011 [cited 2017 Feb 6];214(2):442–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915010008890>
 163. Lau K-K, Wong Y-K, Chan Y-H, et al. Prognostic implications of surrogate markers of atherosclerosis in low to intermediate risk patients with Type 2 Diabetes. *Cardiovasc Diabetol* [Internet] 2012 [cited 2017 Feb 6];11(1):101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22900680>
 164. Bernard S, Sérusclat A, Targe F, 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* [Internet] 2005 [cited 2017 Feb 6];28(5):1158–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855582>
 165. Vigili de Kreutzenberg S, Fadini GP, Guzzinati S, et al. Carotid Plaque Calcification Predicts Future Cardiovascular Events in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2015;38(10).
 166. Alonso N, Traveset A, Rubinat E, et al. Type 2 diabetes-associated carotid plaque burden is increased in patients with retinopathy compared to those without retinopathy. 2012;
 167. Perkins, Perkins G. Serum tumor markers. *Am Fam Physician* 2003;68(6):1075–82.
 168. Wagenknecht LE, D'Agostino RB, Haffner SM, Savage PJ, Rewers M. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and carotid wall thickness: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* [Internet] 1998 [cited 2017 Feb 15];21(11):1812–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9802726>
 169. Temelkova-Kurktschiev TS, Koehler C, Leonhardt W, Schaper F. Increased intimal-medial thickness in newly detected type 2 diabetes: Risk factors. *Diabetes Care*; Feb 1999;22(2).
 170. Frost D, Fröhlich B, Beischer W. Subklinische Arteriosklerose bei neudiagnostiziertem Typ-2-Diabetes mellitus: Erfassung mit hochauflösendem Ultraschall durch Messung der Intima-Media-Dicke an der Arteria carotis communis und der Arteria femoralis communis. *DMW - Dtsch Medizinische Wochenschrift* [Internet] 2000 [cited 2017 Feb 15];125(21):648–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874902>
 171. Sigurdardottir, Vilborg, Fagerberg, Bjorn, Hulthe. Preclinical Atherosclerosis and Inflammation in 61-Year-Old Men With. *Johannes Diabetes Care* 2004;27(4).

172. Son J-W, Jang E-H, Kim M-K, et al. Diabetic retinopathy is associated with subclinical atherosclerosis in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet] 2011 [cited 2016 Jun 14];91(2):253–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21129801>
173. Gu W, Huang Y, Zhang Y, et al. Adolescents and young adults with newly diagnosed Type 2 diabetes demonstrate greater carotid intima-media thickness than those with Type 1 diabetes. *Diabet Med* [Internet] 2014 [cited 2016 Jun 16];31(1):84–91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/dme.12335>
174. Li L-X, Wu X, Lu J-X, et al. Comparison of carotid and lower limb atherosclerotic lesions in both previously known and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig* [Internet] 2014 [cited 2016 Jun 14];5(6):734–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25422776>
175. Mostaza JM, Lahoz C, Salinero-Fort MA, et al. Carotid atherosclerosis severity in relation to glycemic status: A cross-sectional population study. *Atherosclerosis* 2015;242(2):377–82.
176. Villegas-Rodríguez ME, Uribarri J, Solorio-Meza SE, et al. The AGE-RAGE Axis and Its Relationship to Markers of Cardiovascular Disease in Newly Diagnosed Diabetic Patients. *PLoS One* [Internet] 2016 [cited 2017 Feb 14];11(7):e0159175. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27434539>
177. Peters SAE, Huxley RR, Woodward M. Diabetes as risk factor for incident coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of 64 cohorts including 858,507 individuals and 28,203 coronary events. *Diabetologia* [Internet] 2014 [cited 2017 Apr 12];57(8):1542–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24859435>
178. Backholer K, Peters SAE, Bots SH, Peeters A, Huxley RR, Woodward M. Sex differences in the relationship between socioeconomic status and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J Epidemiol Community Health* [Internet] 2016 [cited 2017 Apr 12];jech-2016-207890. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27974445>
179. Conthe Gutiérrez P, Lobos Bejarano JM, González Juanatey JR, et al. [Different approach in high-cardiovascular-risk women, compared to men: a multidisciplinary study-Spain]. *Med Clin (Barc)* [Internet] 2003 [cited 2017 Apr 12];120(12):451–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12689551>
180. Franch-Nadal J, Mata-Cases M, Vinagre I, et al. Differences in the Cardiometabolic Control in Type 2 Diabetes according to Gender and the Presence of Cardiovascular Disease: Results from the eControl Study. *Int J Endocrinol* [Internet] 2014 [cited 2017 Apr 12];2014:1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25328520>
181. Tonstad S, Rosvold EO, Furu K, Skurtveit S. Undertreatment and overtreatment with statins: the Oslo Health Study 2000-2001. *J Intern Med* [Internet] 2004 [cited 2017 Apr 12];255(4):494–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15049884>
182. Persell SD, Baker DW. Aspirin Use Among Adults With Diabetes. *Arch Intern Med* [Internet] 2004 [cited 2017 Apr 12];164(22):2492. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596642>
183. Huxley RR, Woodward M. Cigarette smoking as a risk factor for coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of

- prospective cohort studies. *Lancet* [Internet] 2011 [cited 2017 Apr 12];378(9799):1297–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839503>
184. Donahue RP, Dorn JM, Stranges S, Swanson M, Hovey K, Trevisan M. Impaired fasting glucose and recurrent cardiovascular disease among survivors of a first acute myocardial infarction: Evidence of a sex difference? The Western New York experience. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet] 2011 [cited 2017 Apr 12];21(7):504–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227262>
 185. Kramer CK, Zinman B, Gross JL, et al. Coronary artery calcium score prediction of all cause mortality and cardiovascular events in people with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2013;346.
 186. Zweig BM, Sheth M, Simpson S, Al-Mallah MH. Association of abdominal aortic calcium with coronary artery calcium and obstructive coronary artery disease: a pilot study. *Int J Cardiovasc Imaging* [Internet] 2012 [cited 2017 May 2];28(2):399–404. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10554-011-9818-1>
 187. Wong ND, Lopez VA, Allison M, et al. Abdominal aortic calcium and multi-site atherosclerosis: The Multiethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* [Internet] 2011 [cited 2017 May 2];214(2):436–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915010007392>
 188. Hirata A, Kishida K, Hiuge-Shimizu A, Nakatsuji H, Funahashi T, Shimomura I. Qualitative score of systemic arteriosclerosis by vascular ultrasonography as a predictor of coronary artery disease in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* [Internet] 2011 [cited 2017 May 2];219(2):623–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915011008471>
 189. Sisó-Almirall A, Gilabert Solé R, Bru Saumell C, et al. [Feasibility of hand-held-ultrasonography in the screening of abdominal aortic aneurysms and abdominal aortic atherosclerosis]. *Med Clin (Barc)* [Internet] 2013 [cited 2017 May 2];141(10):417–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025775313003205>
 190. Elam M, Lovato L, Ginsberg H. The ACCORD-Lipid study: implications for treatment of dyslipidemia in Type 2 diabetes mellitus. *Clin Lipidol* [Internet] 2011 [cited 2017 May 8];6(1):9–20. Available from: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/clp.10.84>
 191. Ascaso JF, Millán J, Hernández-Mijares A, et al. Documento de consenso sobre el manejo de la dislipemia aterogénica de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. *Clínica e Investig en Arterioscler* [Internet] 2017 [cited 2017 Mar 16];29(2):86–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28185675>
 192. Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, et al. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis* [Internet] 2017 [cited 2017 Mar 22];58(1):50–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940230>
 193. Fernández Fernández I. [Research in primary care?]. *Aten primaria* [Internet] 2003 [cited 2017 Mar 1];31(5):281–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12681141>

8. ANEXOS: ARTÍCULOS



Prevalence by sex of preclinical carotid atherosclerosis in newly diagnosed type 2 diabetes

M. Catalan^a, Z. Herreras^a, M. Pinyol^a, A. Sala-Vila^{b,c}, A.J. Amor^c, E. de Groot^d,
R. Gilabert^e, E. Ros^{b,c}, E. Ortega^{b,c,*}

^a Consorcio de Atención Primaria del Eixample (CAPSE), Grup Transversal de Recerca en Atenció Primària, IDIBAPS, Barcelona, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain¹

^c Endocrinology and Nutrition Service, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^d Department of Vascular Medicine and Cardiovascular Imaging, Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

^e Vascular Unit, Centre de Diagnòstic per l'Imatge, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Received 4 December 2014; received in revised form 26 March 2015; accepted 26 April 2015
Available online 7 May 2015

KEYWORDS

Diabetes;
Carotid ultrasound;
Atherosclerosis;
Plaque;
Intima-media
thickness

Abstract *Background and aims:* There is clinical trial evidence that only early, intensive risk factor control can reduce cardiovascular disease (CVD) morbidity and mortality in type 2 diabetes (T2DM). However, there is little information regarding preclinical atherosclerosis at diabetes diagnosis. We assessed carotid atherosclerosis in new-onset T2DM and control individuals without prior CVD.

Methods and results: In a cross-sectional case–control study, we determined intima-media thickness (IMT) and plaque (IMT ≥ 1.5 mm) by ultrasound at all carotid sites in new-onset T2DM patients and controls. We assessed 106 T2DM patients, median age 62 years, 46% women, 19% smokers, 54% with hypertension, and 41% with dyslipidemia and 99 non-diabetic subjects matched by age, sex, and cardiovascular risk factors. Compared to controls, T2DM patients had higher common carotid artery (CCA)-IMT (median 0.725 vs. 0.801 mm, $p = 0.01$), bulb-IMT (0.976 vs. 1.028 mm, $p = 0.12$), and internal carotid artery (ICA)-IMT (0.727 vs. 0.802 mm, $p = 0.04$). The prevalence of total plaque (60% vs. 72%, $p = 0.06$), ICA plaque (20% vs. 42%, $p < 0.01$), and harboring ≥ 3 plaques (16% vs. 35% $p < 0.01$) was also higher in T2DM. Plaque score (sum of maximum plaque heights) was also higher ($p < 0.01$) in T2DM. Diabetic women showed more advanced carotid atherosclerosis than diabetic men when they were compared with their respective non-diabetic counterparts.

Conclusions: There is a high prevalence of preclinical atherosclerosis (carotid plaque presence and burden) in new-onset T2DM subjects, especially in women. Early, still reversible, preclinical atherosclerosis may explain in part why early intervention is effective to prevent CVD in this patient population.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Based on clinical trial evidence, it has been suggested that only early intervention can prevent cardiovascular disease

(CVD) morbidity and mortality in patients with type 2 diabetes (T2DM) [1–3]. Intensive glucose control at advanced disease stages may not necessarily improve cardiovascular outcomes and may even be detrimental [4].

* Corresponding author. Endocrinology and Nutrition Service, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

E-mail address: eortega1@clinic.ub.es (E. Ortega).

¹ <http://www.ciberobn.es>.

Whether this differential impact on CVD is due to the different drugs used for glycemic control, rates of hypoglycemia [5] or glucose variability [6], preexisting CVD [4,7], or diabetic neuropathy, is still a matter of debate [8].

These findings may also imply that atherosclerosis at diabetes diagnosis is at an early, still modifiable disease stage in which intensive glycemic control may modify its natural history and thus be worth pursuing [1]. However, sparse information is available regarding atherosclerosis prevalence and its characteristics when diabetes is diagnosed. Furthermore, although CVD prevention is one of the major goals of treatment in T2DM, risk assessment tools, mostly based on traditional cardiovascular risk factors (CVRF), lack adequate specificity to identify individuals with diabetes at higher risk. Therefore, non-invasive testing for preclinical vascular disease, such as carotid ultrasound or coronary artery calcium by computerized tomography, have been recommended to better define cardiovascular risk in selected groups of individuals, including those at intermediate risk or with T2DM [9,10].

This clinical study aimed to improve knowledge on the natural history of CVD in subjects with new-onset T2DM by investigating whether carotid intima-media thickness (IMT) and plaque differed in new-onset T2DM free of CVD compared with non-diabetic controls. Furthermore, given the evidence that diabetes is a stronger risk factor for CVD in women [11], we investigated whether potential differences in preclinical atherosclerosis were similar in men and women at this early diabetes stage when they were compared with their respective non-diabetic counterparts.

Methods

The DIABIMCAP Study (Carotid Atherosclerosis in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Individuals, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01898572) is an observational study aiming to investigate preclinical carotid atherosclerosis in this population. Briefly, participants are evaluated twice, at baseline and after 18 months of follow-up, during which they are followed and treated by their primary care physicians according to current clinical practice guidelines in Spain. Here we report cross-sectional data at baseline. Primary care teams from 3 primary care centers in Barcelona were invited to identify patients with new-onset T2DM between January 2012 and June 2013. Individuals meeting inclusion criteria and willing to participate were enrolled after signing an informed consent to a protocol approved by the institutional review board. The study protocol was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. Subjects from our Public Health System with clinical (lack of autoimmune diabetes or anti-glutamic acid decarboxylase negativity in suspicious cases) and laboratory (fasting glucose and/or HbA1c, 1999 WHO criteria) evidence of type 2 diabetes were identified. They were considered new-onset T2DM and included in the study if they were diagnosed within the previous year of our recruiting period. In each patient an earlier diagnosis of T2DM was ruled out on the basis of the personal clinical history and after careful review of electronic clinical and

laboratory (fasting glucose and HbA1c levels) records available at primary care centers since the year 2001. Because diabetic patients usually have a high prevalence of CVRF, new-onset T2DM were matched to non-diabetic controls for age (± 5 years) and sex as the main determinants of atherosclerosis, but also for traditional CVRF, namely treated hypertension and dyslipidemia, and current smoking habit. Exclusion criteria for both new-onset T2DM and control individuals were: prior history of CVD, cancer, chronic renal failure (serum creatinine > 1.5 mg/dl) or chronic liver disease, congestive heart failure (NYHA Class III-IV), history of alcohol or drug abuse or dependence, major psychiatric illness, debilitating chronic illness, or short life expectancy.

Clinical and laboratory determinations

Participants were invited to attend a first visit at their primary health care center for physical examination and ascertainment of inclusion and exclusion criteria. Age, sex, smoking habits (current vs. nonsmoker), first-degree family history of diabetes and CVD, and personal history and treatment for hypertension and dyslipidemia were recorded. Weight, height and waist circumferences were measured by using standard methods. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Percentage body fat was calculated by a validated equation based on BMI, sex, and age, as previously described [12]. Blood pressure was measured using a blood pressure monitor (Omron HEM-7223-E; Hoofddorp, The Netherlands) after a few minutes at supine position on the day when carotid ultrasound study was performed. A fasting blood and spot first morning urine samples were collected and biochemical measurements were analyzed in a single laboratory (Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clinic, Barcelona) using standardized assays to measure glucose, glycosylated haemoglobin (HbA1c), the lipid profile (including total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol by the Friedewald formula, and triglycerides), alanine transaminase, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transpeptidase, uric acid, high sensitivity C-reactive protein (CRP), white blood cell count, insulin, c-peptide, creatinine, and the albumin-to-creatinine ratio. The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD-4) Study equation was used to estimate glomerular filtration rate. The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMAIR) index was calculated as fasting serum insulin (mU/ml) $\times$ fasting plasma glucose (mmol/l)/22.5.

Carotid ultrasound

In a second visit, bilateral carotid artery B-mode ultrasound imaging to evaluate intima-media thickness (IMT) and plaque presence was performed according to a standardized protocol, as previously described [13]. Briefly, within 1–3 months of clinical diagnosis, all new-onset T2DM patients underwent sonographic assessment with an Acuson X300 ultrasound system (Siemens) equipped

with a VF 10-5 linear transducer (frequency range 5–10 MHz). Control individuals were also identified and assessed with the same protocol during the same time-frame. The same certified sonographer performed all examinations. IMTs at the common carotid artery (CCA), bulb, and internal carotid artery (ICA) were measured off-line by semiautomatic software. IMT-mean and IMT-maximum from each segment was recorded. Plaques were explored by using B-mode and color Doppler and defined as a focal wall thickening encroaching into the arterial lumen by at least 50% of the surrounding IMT value or with thickness of at least 1.5 mm as measured from the media adventitia interference to the intima-lumen surface [14]. Plaque scores (sum of maximum heights of all plaques) were recorded for all study subjects. For more detailed description, see [Supplemental Materials](#).

Statistical analyses

Data are presented as medians and 25th and 75th percentiles, mean $\pm$ SD, or n (%), as appropriate. Non-normally distributed variables were log transformed to reduce skewness. Between-group differences in clinical, anthropometric, and laboratory variables were evaluated by the chi-squared test for categorical variables, Mann–Whitney test for continuous non-normally distributed variables, or unpaired student's t-test for continuous normally distributed variables. Although by study design there were no group differences in age and sex, carotid atherosclerosis outcomes (dependent variables) were adjusted for age and sex due to its marked effect on atherosclerosis. To this aim linear regression and logistic binary regression models were built with age, sex, and GROUP as explanatory variables for IMT and plaque outcomes, respectively. To test whether group differences were modified by sex, we introduced the interaction term GROUP $\times$ SEX in these models. Age-and-sex adjusted odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) for plaque outcomes were computed by using binary logistic regression. Finally, to investigate whether group differences in preclinical atherosclerosis between new-onset T2DM patients and non-diabetic individuals could be explained by clinical and metabolic differences already present at the time of diabetes diagnosis, stepwise multiple regression models were adjusted (in addition to age, sex, hypertension, dyslipidemia, and smoking) for those variables that were different between groups, i.e., BMI, waist circumference, atherogenic dyslipidemia (HDL-cholesterol and triglycerides), LDL-cholesterol, systolic blood pressure, CRP, leukocyte count, HOMA-IR, and HbA1c.

No information on plaque prevalence in new-onset T2DM was available at the time of study design. Sample size was therefore estimated based on expected differences in CCA-IMT between individuals with and without T2DM [15]. We anticipated a mean CCA-IMT group difference of 0.12 mm (SD 0.24). A sample size of 95 subjects per group was estimated to provide 85% statistical power, assuming a 20% dropout rate. Analyses were performed

with SAS software, v.9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina).

Results

Subject's characteristics

Per study design, new-onset T2DM and control groups did not differ by age, sex, smoking status, or prevalence of hypertension or dyslipidemia. However, new-onset T2DM patients had higher BMI, body fat, waist circumference, and prevalence of overweight and obesity. Total and LDL-cholesterol were similar between groups and mean systolic blood pressure was on average 5 mmHg higher in new-onset T2DM. As expected, diabetes-related variables (fasting glucose, HbA1c, HOMA-IR) and most laboratory variables associated with obesity or increased abdominal fat, such as triglycerides, HDL-cholesterol, and markers of chronic inflammation (leukocyte count and CRP) were also different between groups (Table 1).

Intima-media thickness and sex differences

Carotid IMT values for diabetic and control individuals are shown in Tables 2 and 3. All values were significantly higher in new-onset T2DM compared to controls, with the exception of BULB-mean and BULB-max ($p = 0.13$ and $p = 0.10$, respectively) (Table 2). We tested whether between group differences in IMT were similar in men and women and found that differences in CCA-IMT and BULB-IMT between new-onset T2DM and controls were larger (significant SEX $\times$ GROUP interactions) for women than for men (Table 3). Although this trend was also observed for ICA-IMT measurements, interactions terms did not reach statistical significance. While IMT measurements were higher in non-diabetic men compared with non-diabetic women ($p < 0.01$ all), no sex differences ($p > 0.4$ all) were found for these variables within the diabetic group (Table 3).

Carotid plaque and sex differences

Carotid plaque prevalence was associated with age (OR [95% IC] for a 5 year increment 1.40 [1.15–1.71], $p = 0.009$) and male sex (age-adjusted OR 1.80 [0.99–3.29], $p = 0.05$). Therefore, age and sex were included as covariates in statistical analyses. Carotid plaques tended to be more prevalent (72% vs. 60%, $p = 0.06$) in new-onset T2DM compared to controls, and this difference was driven by a higher prevalence of plaques at the ICA segment ($p < 0.01$), but not at the CCA or bulb. Carotid plaque burden was higher in new-onset T2DM patients compared with controls, as the former had more often ≥ 3 plaques (age-adjusted OR 2.86 [1.45–5.62]) or at least one plaque with ≥ 2.5 mm height (OR 2.44 [1.25–4.75]), and also had a higher total carotid and ICA plaque score (sum of plaque heights) (Table 4). None of the participants had carotid stenosis $>50\%$.

Table 1 Subjects' characteristics.

	Control (n = 99)	New-onset diabetes (n = 106)	p value
<i>Variables used to match groups</i>			
Female sex	46 (47)	49 (46)	0.9727
Age (years)	63 (55–67)	62 (55–66)	0.7889
Smoking (current/past/never), (%)	20/30/50	20/31/49	0.9601
Dyslipidemia	37 (37)	43 (41)	0.6396
Hypertension	54 (55)	57 (54)	0.9117
<i>General clinical and laboratory characteristics</i>			
Systolic BP (mm Hg)	127 ± 16	132 ± 17	0.0406
Diastolic BP (mm Hg)	81 ± 9	82 ± 10	0.2055
Body mass index (kg/m ²)	27.3 (25.1–31.2)	30.2 (27–33.8)	<0.0001
BMI < 25/25–30 />30 kg/m ² , (%)	24/45/31	7/41/52	0.0004
Body fat, (%)	36.1 ± 8.7	39.3 ± 7.5	0.0042
Waist circumference (cm)	97.5 ± 12.2	104.5 ± 12.8	0.0001
Total cholesterol (mg/dl)	210 ± 35	200 ± 41	0.0726
HDL-cholesterol (mg/dl)	56 (48–67)	48 (41–55)	<0.0001
LDL-cholesterol (mg/dl)	130 ± 31	122 ± 33	0.0788
Triglycerides (mg/dl)	103 (76–132)	131 (89–172)	<0.0001
Leukocyte count (10 ⁹ /L)	6.3 (5.4–7.1)	6.8 (5.9–8.7)	0.0116
C-reactive protein (mg/dl)	0.19 (0.11–0.35)	0.35 (0.16–0.65)	0.0002
<i>Diabetes related clinical and laboratory characteristics</i>			
Hemoglobin A _{1c} (%)	5.6 (5.5–5.9)	6.7 (6.4–7.3)	<0.0001
Hemoglobin A _{1c} (mmol/mol; IFCC)	38 (37–41)	50 (46–56)	<0.0001
Fasting glucose (mg/dl)	98 (91–105)	133 (120–150)	<0.0001
Insulin (mU/L)	10.9 (7.7–18.3)	15.3 (11–24.3)	0.0002
C-peptide (ng/mL)	2.1 (1.5–3)	2.6 (2–3.8)	<0.0001
HOMA-IR (mU/L × mmol/L)/ 22.5	2.6 (1.8–4.7)	5.1 (3.4–8.4)	<0.0001
Serum creatinine (mg/dL)	0.85 ± 0.15	0.84 ± 0.16	0.7545
MDRD4, ml/min	83 ± 13	84 ± 16	0.8439
UACR ≥ 30 mg/gr	8 (8)	11 (11)	0.5129

Data are shown as n (percentage), median (Q1–Q3), or mean ± standard deviation.

P-values for group comparisons are reported.

BP: blood pressure; BMI: Body Mass Index; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; HOMA-IR homeostasis model assessment of insulin resistance; MDRD: Modification of Diet in Renal Disease Study equation; UACR: urine albumin to creatinine ratio.

We also explored whether the new-onset T2DM vs. control differences in carotid plaque were similar in men and women. Subgroup analyses by sex showed that new-onset T2DM women had higher prevalence of carotid plaque (OR [95% IC], 3.02 [1.22–7.48]), ≥3 carotid plaques (4.62 [1.36–15.65]), and ICA plaque (5.47 [1.91–15.66]) than women without diabetes, while no differences in

plaque prevalence between men with and without diabetes were observed. Also, the overall prevalence of total plaques (p = 0.01) and CCA plaques (p = 0.02) was higher in non-diabetic men compared with non-diabetic women, while no sex differences were found within the new-onset T2DM group (Fig. 1).

Factors explaining group (new-onset T2DM vs. control) differences in carotid atherosclerosis (supplementary table)

Factors contributing to differences in atherosclerosis between individuals with and without diabetes were investigated (see methods). In multiple linear (for IMT) or logistic (for plaque variables) regression models, we found that HbA_{1c}, and triglycerides and/or HDL-cholesterol were the variables (among those that were different between groups) associated with carotid atherosclerosis. Specifically (Model 4 Supplementary Table), age, HbA_{1c}, sex, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol; age, sex, and triglycerides; and age, hypertension, and triglycerides were associated with CCA, BULB, and ICA-IMT, respectively. Age (OR 1.09 [1.04–1.13] for a 1 year increment), HDL-cholesterol (0.96 [0.94–0.98] for a 1 mg/dl increment), and HbA_{1c} (1.36 [1.00–1.86] for a 1% increment), and age (1.09 [1.03–1.15]), HDLc (0.96 [0.93–0.99]), HbA_{1c} (1.27 [1.00–1.62]), and triglycerides (1.01 [1.001–1.013] for a 1 mg/dl increment) were associated with carotid plaque and ≥3 plaques, respectively. The variable group (new-onset T2DM vs. control) was not associated with outcome variables when it was added into this full-adjusted model (Model 4 Supplementary Table).

Discussion

In this study patients with a new diagnosis of T2DM and without clinical CVD had more advanced preclinical carotid atherosclerosis than non-diabetic subjects even after controlling for traditional CVRF, such as age, sex, hypertension, dyslipidemia, and smoking. The duration of the prediabetic state and undiagnosed diabetes and the metabolic abnormalities associated with untreated hyperglycemia and insulin resistance might be responsible in part for these differences. Indeed, HbA_{1c} and, particularly, variables defining atherogenic dyslipidemia (HDL-cholesterol, triglycerides, or both), but not BMI, inflammatory markers, or HOMA-IR, were associated with preclinical atherosclerosis in regression analyses.

To the best of our knowledge, previous information regarding carotid plaque prevalence in new-onset T2DM was limited to a single study [16], in which moderate-to-severe plaque was found in approximately 30% of newly diagnosed 61 year-old diabetic Swedish men. In 2013, while our study was ongoing, prevalence of carotid plaque was reported to be higher in a large cohort of Chinese patients with new-onset T2DM than in non-diabetic individuals, ranging from 31% to 73% in individuals aged 50 to ≥70 years [17]. More information is available regarding IMT and IMT progression at and after T2DM diagnosis,

Table 2 Carotid intima-media thickness (IMT) by group (control vs. new-onset diabetes).

	Control (n = 99)		New-onset diabetes (n = 106)		p-value ^a
	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	
CCA-mean	0.725	0.671–0.825	0.801	0.686–0.872	0.0127
CCA-max	0.808	0.765–0.936	0.907	0.762–0.983	0.0266
BULB-mean	0.976	0.845–1.148	1.028	0.882–1.249	0.1353
BULB-max	1.193	0.989–1.431	1.261	1.086–1.529	0.1003
ICA-mean	0.727	0.643–0.880	0.802	0.632–1.037	0.0354
ICA-max	0.876	0.775–1.093	1.011	0.777–1.348	0.0080

Data are shown as median (Q1–Q3).

CCA, common carotid artery; ICA, internal carotid artery; mean-values: IMT mean of mean right IMT and mean left IMT carotid (CCA, BULB, or ICA) segment; max-values: IMT mean of the maximum right and maximum left IMT (CCA, BULB, or ICA) segment.

^a P-values for age-and-sex-adjusted group comparisons.

respectively [15,16,18]. Studies have shown that IMT values (mainly at CCA) were larger in new-onset T2DM patients compared with non-diabetic individuals [15,16,18]. We assessed IMT at different carotid sites and, to ascertain whether differences between new-onset T2DM and non-diabetic subjects were due to a higher prevalence of classical risk factors (which is usually the case for diabetic population), we not only matched cases and controls for age and sex [15,16,18], but also for additional factors associated with preclinical carotid atherosclerosis, i.e., hypertension, dyslipidemia, and smoking.

New-onset T2DM is not a benign condition. Significant morbidity is already present at clinical diagnosis, which has been estimated to be delayed at least 4–7 years after diabetes onset [19], with nearly one-half of diabetic patients being unaware of their condition [20]. Indeed, a recent report of the large SOUL-D cohort of newly diagnosed T2DM patients from different ethnic backgrounds shows that microvascular complications are not rare at this stage (26–37% with at least one complication) [21]. At this moment in the natural history of T2DM, microvascular

evaluation is not based on detection of clinical events: renal failure (for diabetic kidney damage), loss of vision (for diabetic retinopathy), or presence of foot ulceration (for diabetic neuropathy). Rather, we precisely evaluate microvascular complications by repeated determinations to detect subtler alterations: urine albumin-to-creatinine ratio, digital two-field photography of retina, and vibration perception threshold or monofilament examination [22]. We have chosen this approach because both prognosis and the intensity of treatment are determined by these findings. In the SOUL-D study prevalent CVD ranged from 5% to 13% depending on ethnic background, but vascular imaging to detect atherosclerosis, the precursor of clinical disease, was not performed [21].

Albeit CVD is the leading cause of morbidity and mortality in T2DM and prevention is more efficacious at early stages of the disease [1–4], using imaging techniques to evaluate preclinical atherosclerosis in order to tailor intervention to findings is not customary in this high-risk group. Moreover, it is still common clinical practice to rely mainly on the duration of the disease to decide whether patients should be on an intensive multifactorial treatment strategy, even though at this stage prevention of CVD by intensive therapy is questionable [4]. It is possible that a CVD prevention strategy based on age, CVRF, and image biomarkers, particularly carotid ultrasound, could be useful to better identify individuals at higher risk [23]. Although more research is necessary to identify features of so-called vulnerable plaques prone to rupture (such as thin cap fibroatheroma, large lipid core, and neo-vascularization), information on carotid plaque presence and burden is useful in the identification of individuals at risk of future CVD [23,24]. In our study approximately one third of new-onset T2DM patients were free of carotid plaque, one third had 1–2 plaques, and one third had ≥ 3 plaques. Thus, fully two-thirds of new-onset T2DM patients are candidates to intensified treatment directed at CVD risk reduction. On the other hand, IMT measurements were systematically lower in controls and only 16% of them had ≥ 3 carotid plaques, indicating a younger vascular age compared with new-onset T2DM. Plaque

Table 3 Carotid intima-media thickness by group (control vs. new-onset diabetes) and sex.

	Women (n = 95)		Men (n = 110)	
	Control (n = 46)	New-onset diabetes (n = 49)	Control (n = 53)	New-onset diabetes (n = 57)
CCA-mean	0.701 (0.644–0.783) ^a	0.799 (0.663–0.853)	0.771 (0.698–0.883)	0.807 (0.703–0.896)
CCA-max	0.785 (0.712–0.855) ^a	0.904 (0.758–0.959)	0.846 (0.796–0.982)	0.913 (0.775–1.010)
BULB-mean	0.883 (0.758–1.107) ^b	0.981 (0.855–1.153)	1.065 (0.938–1.200)	1.052 (0.908–1.265)
BULB-max	1.103 (0.956–1.310) ^b	1.233 (1.075–1.523)	1.324 (1.065–1.514)	1.291 (1.104–1.533)
ICA-mean	0.696 (0.603–0.767) ^b	0.779 (0.637–1.037)	0.788 (0.673–0.919)	0.832 (0.629–1.022)
ICA-max	0.811 (0.725–0.980) ^a	0.998 (0.783–1.321)	0.927 (0.824–1.187)	1.014 (0.777–1.368)

Data are shown as median (Q1–Q3).

p-values for age-adjusted SEX $\times$ GROUP interactions for CCA-mean, CCA-max, BULB-mean, BULB-max, ICA-mean, and ICA-max were 0.0277, 0.0165, 0.0425, 0.0366, 0.2398, and 0.1847, respectively.

CCA, common carotid artery; ICA, internal carotid artery; mean-values: IMT mean of mean right IMT and mean left IMT carotid (CCA, BULB, or ICA) segment; max-values: IMT mean of the maximum right and maximum left IMT (CCA, BULB, or ICA) segment.

^ap < 0.01 and ^bp < 0.05 for age-adjusted differences between women with and without diabetes. No differences (p > 0.3) found between men with and without diabetes.

Table 4 Carotid plaque prevalence.

	Control (n = 99)	New-onset diabetes (n = 106)	p value
Carotid plaque	59 (60)	76 (72)	0.0583
Common carotid plaque	13 (13)	23 (22)	0.1093
Bulb carotid plaque	52 (53)	61 (58)	0.4561
Internal carotid plaque	20 (20)	44 (42)	0.0011
≥3 carotid plaques	16 (16)	37 (35)	0.0023
Plaque height ≥ 2.5 mm	17 (17)	35 (33)	0.0093
Plaque score (mm)	3.43 (1.73–5.16)	5.59 (3.25–7.46)	0.0003
Internal carotid plaque score (mm)	2.02 (1.73–2.75)	2.56 (1.95–4.67)	0.0243

Data are shown as n (percentage) and median (Q1–Q3). P-values for age-and-sex-adjusted group differences are reported. CCA, common carotid artery; ICA, internal carotid artery; Plaque score (sum of heights of all plaques).

prevalence was marginally lower ($p = 0.06$) in controls, but it was still high (60%), probably because, by definition of the cohort to match CVRF with the disease group, they had a high cardiovascular risk profile [25,26] (Table 1).

Male sex is a well-established cardiovascular risk factor and lifelong risk for CVD is higher in men than in women [27]. We [28] and others [29] have shown increased IMT and plaque prevalence in non-diabetic men compared to non-diabetic women. Diabetes, however, has a different impact on CVD according to sex. Compared to non-diabetic populations, diabetes increases CVD risk by 3–4 times in women but only twice in men [30,31]. Several studies have compared IMT measurements or plaque prevalence between men and women with diabetes. However, little information is available regarding preclinical atherosclerosis differences when women and men with diabetes are compared with their non-diabetic counterparts. Our results show that, similarly to what has been reported for clinical outcomes, even at this early disease stage women with diabetes disclose worse preclinical atherosclerosis

than non-diabetic women, with ORs of 3–4 for several carotid outcomes. Moreover, preclinical atherosclerosis in women with new-onset T2DM was similar to that observed in men with new-onset T2DM, indicating that the protective effect of sex on CVD may already be lost when T2DM is diagnosed in women.

In conclusion, as determined by carotid ultrasound, preclinical atherosclerosis, the soil for cardiovascular events, is already present in a significant proportion of newly diagnosed individuals with T2DM, even after controlling for traditional CVRF. At this early stage, HbA1c and diabetic dyslipidemia explain, at least in part, between-group differences in preclinical atherosclerosis. We suggest that, similarly to how new-onset T2DM patients with microvascular complications are managed, a differential approach to diabetes management and cardiovascular prevention should be implemented at diabetes presentation with the aim of improving prognosis and preventing clinical CVD. Finally, analogous to what is known for clinical CVD risk, new-onset T2DM women show preclinical atherosclerosis of a degree that is similar to that found in diabetic men, but is worse in comparison to their respective non-diabetic counterparts.

Acknowledgments

This study was funded (PI11/01723) by the Spanish Ministry of Health (ISCIII) & FEDER. AS-V was supported by post-doctoral contract FIS CP12/03299. None of the funding sources played a role in the design, collection, analysis or interpretation of the data or in the decision to submit the manuscript for publication. This work would not have been possible without the help (physicians, nurses, and administrative personal) of the three primary care centres (CAPSE, CAP Borrell, Casanovas, and Les Corts) involved in the study. CIBERobn is an initiative of ISCIII, Spain.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2015.04.009>.

References

- [1] 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;359:1577–89.
- [2] Moritz T, Duckworth W, Abairra C. Veterans affairs diabetes trial—corrections. *N Engl J Med* 2009;361:1024–5.
- [3] Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;358:2560–72.
- [4] Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff Jr DC, Bigger JT, Buse JB, et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;358:2545–59.
- [5] Hanefeld M, Duetting E, Bramlage P. Cardiac implications of hypoglycaemia in patients with diabetes – a systematic review. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:135.
- [6] Ceriello A, Novials A, Ortega E, Pujadas G, La Sala L, Testa R, et al. Hyperglycemia following recovery from hypoglycemia worsens endothelial damage and thrombosis activation in type 1 diabetes

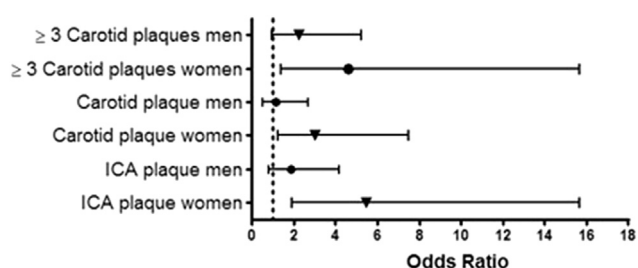


Figure 1 Carotid plaque in patients with new-onset T2DM (vs. controls) by sex. Age-adjusted odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95%CI) for the probability of presenting different carotid plaque variables in patients with new-onset T2DM (vs. without diabetes) separate by sex. ≥3 carotid plaques OR (95% CI) 2.26 (0.97–5.25) and 4.62 (1.36–15.65); total carotid plaque 1.15 (0.49–2.69) and 3.02 (1.22–7.48); and ICA (internal carotid) plaque 1.85 (0.82–4.17) and 5.47 (1.91–15.66), for men and women, respectively. p-values for age-adjusted SEX × GROUP interactions were $p = 0.34$, $p = 0.13$, and $p = 0.11$ for reported ≥3 carotid plaques, total carotid plaque, and ICA plaque, respectively.

- and in healthy controls. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014;24:116–23.
- [7] Reaven PD, Moritz TE, Schwenke DC, Anderson RJ, Ciriuri M, Detrano R, et al. Intensive glucose-lowering therapy reduces cardiovascular disease events in veterans affairs diabetes trial participants with lower calcified coronary atherosclerosis. *Diabetes* 2009;58:2642–8.
 - [8] Del PS. Megatrials in type 2 diabetes. From excitement to frustration? *Diabetologia* 2009;52:1219–26.
 - [9] Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:e50–103.
 - [10] Naghavi M, Falk E, Hecht HS, Jamieson MJ, Kaul S, Berman D, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient—part III: executive summary of the Screening for Heart Attack Prevention and Education (SHAPE) task force report. *Am J Cardiol* 2006;98:2H–15H.
 - [11] Roche MM, Wang PP. Sex differences in all-cause and cardiovascular mortality, hospitalization for individuals with and without diabetes, and patients with diabetes diagnosed early and late. *Diabetes Care* 2013;36:2582–90.
 - [12] Gomez-Ambrosi J, Silva C, Catalan V, Rodriguez A, Galofre JC, Escalada J, et al. Clinical usefulness of a new equation for estimating body fat. *Diabetes Care* 2012;35:383–8.
 - [13] Junyent M, Cofán M, Núñez I, Gilabert R, Zambón D, Ros E. Influence of HDL cholesterol on preclinical carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1107–13.
 - [14] 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;23:75–80.
 - [15] Wagenknecht LE, Zaccaro D, Espeland MA, Karter AJ, O'Leary DH, Haffner SM. Diabetes and progression of carotid atherosclerosis: the insulin resistance atherosclerosis study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1035–41.
 - [16] Sigurdardottir V, Fagerberg B, Hulthe J. Preclinical atherosclerosis and inflammation in 61-year-old men with newly diagnosed diabetes and established diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:880–4.
 - [17] Li LX, Zhao CC, Ren Y, Tu YF, Lu JX, Wu X, et al. Prevalence and clinical characteristics of carotid atherosclerosis in newly diagnosed patients with ketosis-onset diabetes: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:18.
 - [18] 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;22:333–8.
 - [19] Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knuiman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4–7 yr before clinical diagnosis. *Diabetes Care* 1992;15:815–9.
 - [20] 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;55:88–93.
 - [21] Winkley K, Thomas SM, Sivaprasad S, Chamley M, Stahl D, Ismail K, et al. The clinical characteristics at diagnosis of type 2 diabetes in a multi-ethnic population: the South London Diabetes cohort (SOUL-D). *Diabetologia* 2013;56:1272–81.
 - [22] American Diabetes Association. Standard of medical care in diabetes – 2015. *Diabetes Care* 2015;38(Suppl. 1):S1–94.
 - [23] Nambi V, Chambless L, Folsom AR, He M, Hu Y, Mosley T, et al. Carotid intima-media thickness and presence or absence of plaque improves prediction of coronary heart disease risk: the ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) study. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1600–7.
 - [24] Johnsen SH, Mathiesen EB, Joakimsen O, Stensland E, Wilsgaard T, Lochen ML, et al. Carotid atherosclerosis is a stronger predictor of myocardial infarction in women than in men: a 6-year follow-up study of 6226 persons: the Tromso Study. *Stroke* 2007;38:2873–80.
 - [25] López-Cancio E, Dorado L, Millán M, Reverté S, Suñol A, Massuet A, et al. The Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis (AsIA) study: prevalence and risk factors. *Atherosclerosis* 2012;221:221–5.
 - [26] Betriu A, Martinez-Alonso M, Arcidiacono MV, Cannata-Andia J, Pascual J, Valdivielso JM, et al. Prevalence of subclinical atherosclerosis and associated risk factors in chronic kidney disease: the NEFRONA study. *Nephrol Dial Transpl Off Publ Eur Dial Transpl Assoc Eur Ren Assoc* 2014;29:1415–22.
 - [27] Mosca L, Barrett-Connor E, Wenger NK. Sex/gender differences in cardiovascular disease prevention: what a difference a decade makes. *Circulation* 2011;124:2145–54.
 - [28] Junyent M, Zambon D, Gilabert R, Nunez I, Cofan M, Ros E. Carotid atherosclerosis and vascular age in the assessment of coronary heart disease risk beyond the Framingham Risk Score. *Atherosclerosis* 2008;196:803–9.
 - [29] Kozakova M, Palombo C, Morizzo C, Nolan JJ, Konrad T, Dekker JM, et al. Gender-specific differences in carotid intima-media thickness and its progression over three years: a multicenter European study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23:151–8.
 - [30] Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ* 2006;332:73–8.
 - [31] 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;375:2215–22.



Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in newly-diagnosed type 2 diabetes and their association with preclinical carotid atherosclerosis

Antonio J. Amor ^a, Marta Catalan ^b, Antonio Pérez ^{c,d}, Zoe Herreras ^b, Montserrat Pinyol ^b, Aleix Sala-Vila ^{a,e}, Montserrat Cofán ^{a,e}, Rosa Gilabert ^f, Emilio Ros ^{a,e}, Emilio Ortega ^{a,e,*}

^a Endocrinology and Nutrition Service, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^b Consorcio de Atención Primaria del Eixample (CAPSE), Grup Transversal de Recerca en Atenció Primària, IDIBAPS, Barcelona, Spain

^c Endocrinology and Nutrition Department, Biomedical Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB Sant Pau, Barcelona, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red "Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas" (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain

^f Vascular Unit, Centre de Diagnòstic per l'Imatge, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 October 2015

Received in revised form

15 January 2016

Accepted 12 February 2016

Available online 17 February 2016

Keywords:

Diabetes

Carotid ultrasound

Preclinical atherosclerosis

Nuclear magnetic resonance spectroscopy

Lipoproteins

ABSTRACT

Background and Aims: Atherogenic dyslipidemia is common in type 2 diabetes (T2DM) and predicts cardiovascular disease, but information on the association of its components with atherosclerosis is scarce. We aimed to assess differences in the lipoprotein profile in newly-diagnosed T2DM and matched control individuals and their associations with preclinical carotid atherosclerosis.

Methods: In a case-control study, we evaluated lipoprotein profiles by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and determined carotid intima-media thickness (IMT) and plaque presence (IMT ≥ 1.5 mm) by B-mode ultrasonography.

Results: We assessed 96 T2DM patients (median age 63 years, 44% women, 19% smokers, 54% hypertension, 38% dyslipidemia) and 90 non-diabetic controls matched for age, sex, and cardiovascular risk factors. In T2DM VLDL-particles (mainly large and enriched in cholesterol and triglycerides) were increased, and large HDL-particles (enriched in triglycerides and depleted in cholesterol) were reduced ($p < 0.05$; all comparisons). Regarding associations with preclinical atherosclerosis, VLDL triglyceride content (odds ratio [OR], 8.975; 95% confidence interval [CI], 2.330–34.576), total number of VLDL particles (OR, 2.713; CI, 1.601–4.598) and VLDL size (OR, 2.044; CI, 1.320–3.166), and the ratio cholesterol/triglycerides in HDL (OR, 0.638; CI, 0.477–0.852) were associated with plaque burden (≥ 3 plaques) independently of confounders, including conventional lipid levels.

Conclusion: NMR-assessed advanced lipoprotein profile identifies lipid abnormalities associated with newly-diagnosed T2DM and preclinical atherosclerosis that are not captured by the traditional lipid profile. At this early stage of diabetes, NMR lipoproteins could be useful to identify candidates for a more comprehensive cardiovascular risk prevention strategy.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM), a well-established cardiovascular risk (CVR) factor, is associated with a 2–4 fold risk of fatal and non-fatal cardiovascular events compared to non-diabetic individuals [1,2], but the increased risk is distributed heterogeneously

among patients with T2DM. Preclinical atherosclerosis, evaluated by non-invasive vascular ultrasonography, has been shown to be already present at very early stages of the disease and could be used to identify patients with T2DM at a higher risk of clinical events [3–5]. In a recent study, we reported an increase prevalence of preclinical carotid atherosclerosis in a cohort of newly-diagnosed T2DM patients compared with matched control subjects, and HbA1c and levels of some of the atherogenic dyslipidemia components (triglycerides and HDL-cholesterol) explained in part these differences [6].

* Corresponding author. Endocrinology and Nutrition Service, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

E-mail address: eortega1@clinic.ub.es (E. Ortega).

Atherogenic dyslipidemia (high triglycerides and low HDL-cholesterol) is believed to be an important factor underlying the increased CVR of T2DM [7,8]. However, the conventional approach to quantify triglyceride, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol does not capture many of the profound lipoprotein abnormalities that may predispose to endothelial damage and onset and progression of atherosclerosis [7,8]. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy simultaneously quantifies the number, size and composition of lipoprotein particles and can provide a better understanding of quantitative and qualitative modifications in each lipoprotein [9,10]. Information regarding differences in NMR-assessed lipoprotein profile between newly-diagnosed T2DM and non-diabetic subjects and, particularly, their association with pre-clinical atherosclerosis at this early stage of T2DM is scarce. Therefore, after describing a higher prevalence of preclinical carotid atherosclerosis in newly diagnosed T2DM compared to control individuals [6], we aimed to investigate whether a detailed NMR lipoprotein profile was able to capture differences between cases and controls and identify specific lipoprotein profile features associated with carotid atherosclerosis.

2. Material and methods

2.1. Study design and subjects

The DIABIMCAP Study (Carotid Atherosclerosis in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Individuals, [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01898572) Identifier: NCT01898572) is an observational study aiming to investigate preclinical carotid atherosclerosis in this population that has been fully described [6]. Physicians from 3 primary care centers in Barcelona were invited to identify patients with a new diagnosis of T2DM between January 2012 and June 2013. Individuals meeting inclusion criteria and willing to participate (5 individuals refused the invitation) were enrolled after signing an informed consent to a protocol approved by the institutional review board. The study protocol was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. Subjects from our affiliated primary care centers with clinical (lack of autoimmune diabetes or anti-glutamic acid decarboxylase negativity in suspicious cases, 3 subjects were excluded for this reason) and laboratory (fasting glucose and/or HbA1c, 1999 WHO criteria) evidence of type 2 diabetes were identified. They were considered newly-diagnosed T2DM and included in the study if they were diagnosed within the previous year of our recruiting period. For every patient, an earlier diagnosis of T2DM was ruled out on the basis of the personal clinical history and after careful review of electronic clinical and laboratory (fasting glucose and HbA1c levels) records available at primary care centers since the year 2001 (2 subjects were not included in the study for this reason). A non-diabetic control group, matched for age (± 5 years), sex, smoking habit, and treated hypertension and dyslipidemia was also studied. Patients were evaluated at baseline and after 18 months of follow-up while they were treated according to current clinical practice guidelines in Spain. In the present study, we report cross-sectional data at baseline.

2.2. Clinical and laboratory determinations

Participants were invited to attend a single examination visit at their primary health care center. Age, sex, smoking habits (current vs. non-smoker), family history of diabetes and cardiovascular disease, and personal history of treated hypertension and dyslipidemia (mainly statins, one control treated with n-3 fatty acids, and 4 T2DM patients treated with fibrates) were recorded. Height, weight and waist circumference were measured and body mass index (BMI) was calculated. Percentage of body fat was estimated

using a validated equation based on BMI, sex and age [11]. Blood pressure was measured using a blood pressure monitor (Omron HEM-7223-E; Hoofddorp, The Netherlands) after a few minutes in the supine position. After at least 10–12 h of overnight fasting and without any concurrent stress the day before (minor illness, strenuous exercise, etc.) blood and a first morning urine spot samples were collected and analyzed in a single laboratory (Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clinic, Barcelona). Any patient has any diseases or was taking any medication with known effect on lipid metabolism. Standardized assays were used to measure blood glucose, HbA1c, lipid profile (total cholesterol, triglycerides and HDL-cholesterol by direct methods, LDL-cholesterol by the Friedewald formula), serum creatinine, urinary albumin-to-creatinine ratio, and inflammatory markers (white blood cell count and serum high sensitivity C-reactive protein [CRP]). The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD-4) formula was used to estimate glomerular filtration rate. A non-mydiatic fundus camera was used to screen diabetic retinopathy.

2.3. Lipoprotein analysis by NMR spectroscopy (advanced lipoprotein profile)

Lipoprotein analysis of serum samples by 2D diffusion-ordered ^1H NMR spectroscopy (DOSY) was performed as previously described [12]. This protocol evaluates lipid concentrations, size and particle number of three different classes of lipoproteins (very-low density lipoprotein [VLDL], LDL and HDL), as well as the particle number of nine subclasses (large, medium and small VLDL, LDL and HDL). Briefly, 2D ^1H NMR spectra were recorded on a BrukerAvance III 600 spectrometer at 310 K (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). We used the double stimulated echo pulse program with bipolar gradient pulses and a longitudinal eddy-current delay. The relaxation delay was 2 s, the finite impulse decays were collected into 64 K complex data points and 32 scans were acquired for each sample. The gradient pulse strength was increased from 5 to 95% of the maximum strength of 53.5 Gauss cm¹ in 32 steps. The squared gradient pulse strength was linearly distributed.

Of the total sample of newly-diagnosed T2DM patients ($n = 106$) and controls ($n = 99$), satisfactory NMR lipoprotein profiles were available in 96 and 90 subjects, respectively. To determine lipoprotein size, the methyl signal was surface fitted with the numbers of functions so that the nine lipoprotein subclasses could be determined. The mean particle size of every main fraction was derived by averaging the NMR area of each fraction by its associated size. To obtain particle-weighted lipoprotein sizes, each NMR area was divided by its associated volume. Estimates ranges of particle diameter for the subclasses were as follows: large VLDL particles (VLDL-P) >81.9 nm; medium VLDL-P, 55.5–81.9 nm; small VLDL, 38.6–55.5 nm; large LDL particles (LDL-P), 26.5–38.6 nm; medium LDL-P, 22.1–26.5 nm; small LDL 18.9–22.1 nm; large HDL particles (HDL-P), 11.5–18.9 nm; medium HDL, 9.0–11.5 nm; small HDL, 7.8–9.0 nm. The particle numbers of each main lipoprotein fraction were calculated by dividing the lipid volume by the particle volume of a given class. The lipid volumes were determined by using common conversion factors to convert concentration units obtained from the partial least-squares models into volume units. The relative areas of the lipoprotein components used to decompose the 2D spectra were used to derive the particle numbers of the nine lipoprotein subclasses. Lipoprotein analysis was performed at Biosfer Teslab (Reus, Spain).

2.4. Carotid B-mode ultrasound imaging

Bilateral carotid artery B-mode ultrasound imaging to evaluate IMT and plaque presence was performed according to a

Table 1
Characteristics of study subjects.

	Control (n = 90)	Newly-diagnosed T2DM (n = 96)	p-value
Clinical characteristics			
Women	40 (44)	42 (44)	0.924
Age (years)	63 (56–67)	62 (56–66)	0.898
Current smoking	17 (19)	17 (18)	0.835
Dyslipidemia	34 (38)	41 (43)	0.493
Hypertension	49 (54)	53 (55)	0.917
Systolic BP (mm Hg)	126 ± 15	131 ± 16	0.037
Diastolic BP (mm Hg)	80 ± 9	82 ± 10	0.182
Body mass index (kg/m ²)	27.3 (25.4–31.6)	30.1 (27–33.8)	0.001
Body fat, (%)	36.5 ± 8.4	39.5 ± 7.5	0.011
Waist circumference (cm)	97.5 ± 12.1	104.3 ± 12.6	<0.001
Men (n = 104)	102.4 ± 9.3	106.8 ± 12.3	0.052
Women (n = 82)	92.1 ± 12.6	100.8 ± 12.3	0.002
Conventional lipid profile			
Total cholesterol (mg/dl)	210 ± 36	198 ± 39	0.025
HDL-cholesterol (mg/dl)	56 (49–65)	47 (41–57)	<0.001
LDL-cholesterol (mg/dl) ^a	131 ± 31	121 ± 32	0.032
Triglycerides (mg/dl)	103 (77–134)	126 (89–169)	0.001
Low HDL-cholesterol (sex-specific) ^b	10 (11)	22 (23)	0.033
High triglycerides (>150 mg/dl)	11 (12)	32 (33)	<0.001
Atherogenic dyslipidemia ^c	5 (6)	11 (12)	0.152
Other laboratory characteristics			
Hemoglobin A _{1c} (%)	5.6 (5.5–5.9)	6.7 (6.3–7.1)	<0.001
Fasting glucose (mg/dl)	100 (92–105)	132 (119–144)	<0.001
Leukocyte count (10 ⁹ /L)	6.2 (5.4–7.2)	6.8 (5.7–8.7)	0.019
C-reactive protein (mg/dl)	0.19 (0.11–0.35)	0.34 (0.16–0.63)	0.002
Preclinical carotid atherosclerosis			
Plaque presence	56 (62)	68 (71)	0.213
Presence of ≥3 plaques	16 (18)	32 (33)	0.015

Data are shown as n (percentage), median (Q1–Q3), or mean ± standard deviation.

P-values for group comparisons are reported.

BP: blood pressure; BMI: Body Mass Index; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; MDRD: Modification of Diet in Renal Disease Study equation; T2DM:

Type 2 diabetes mellitus; UACR: urine albumin to creatinine ratio.

^a LDL-cholesterol was not available in 3 patients with fasting triglycerides >400 mg/dL (limitation of Friedewald formula).

^b HDL-cholesterol <45 mg/dL in women and <40 mg/dL in men.

^c HDL-cholesterol <45/40 mg/dl depending on sex and triglycerides >150 mg/dl.

standardized protocol, as described [13,14]. Briefly, patients underwent sonographic assessment with an Acuson X300 ultrasound system (Siemens) equipped with a VF 10-5 linear transducer (frequency range 5–10 MHz). The same certified sonographer performed all examinations. IMT at the common carotid artery (CCA) was measured off-line by semiautomatic software. IMT-mean and IMT-maximum from each segment were recorded. Plaques were explored by using B-mode and color Doppler and defined as focal wall thickenings encroaching into the arterial lumen by at least 50% of the surrounding IMT value or with thickness of at least 1.5 mm, as measured from the media adventitia interphase to the intima-lumen surface [15]. For a detailed description of the technique, please see [Supplemental material](#).

2.5. Statistical analyses

Data are expressed as median and 25th and 75th percentiles, mean ± standard deviation (SD), and n (percentage, %), unless otherwise stated. Normal distribution of continuous variables was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. Non-normally distributed variables were log transformed to reduce skewness. Between-group (newly-diagnosed T2DM versus controls) differences in clinical, anthropometric, laboratory and NMR-assessed variables were evaluated by the chi-square test for categorical variables, Mann-Whitney test for non-normally distributed variables, or unpaired student's *t*-test for continuous normally distributed variables. Differences in advanced lipoprotein profile between groups were further adjusted for the confounders age, sex, anthropometric variables, use of lipid-lowering drugs, and markers of inflammation.

Spearman correlation analyses were used to assess relationships between NMR-assessed lipoproteins and CCA-IMT, anthropometric variables (BMI, waist circumference and body fat [%]), HbA_{1c}, and inflammatory markers. Differences in NMR-assessed lipoproteins by plaque status, either evaluated as a three level (none, 1–2, or ≥3 carotid plaques) or a dichotomous variable (none versus any plaque or none/1–2 versus ≥3 plaques) were evaluated by the Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, or unpaired student's *t*-tests, as appropriate. To assess independent relationships between NMR-lipoproteins and measures of preclinical carotid atherosclerosis (dependent variable), we constructed multivariate models (stepwise linear regression for CCA-IMT and stepwise logistic regression models for plaque variables; *p* for entry <0.15) adjusted for GROUP (newly-diagnosed T2DM versus control), known factors associated with atherosclerosis (age, sex, BMI, smoking habit, presence of hypertension or dyslipidemia, and systolic blood pressure) as well as measures of the conventional lipid profile (LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides). We also performed a sensitivity analyses in the subgroup of individuals not taking hypolipidemic drugs and, when evaluating associations with preclinical atherosclerosis outcomes, we further adjusted the regression models for statin treatment. Accordingly, for each subject we calculated a statin score, an estimation of lifetime exposure to cholesterol-lowering treatment, as the product of the duration of treatment in years by the average dose received of statins standardized to simvastatin.

No information on plaque prevalence or the association of NMR lipoprotein abnormalities with preclinical atherosclerosis in newly-diagnosed T2DM was available at the time of study design. We, therefore, decided to calculate sample size based on expected differences in CCA-IMT between individuals with and without T2DM

Table 2
NMR-assessed advanced lipoprotein profile in control and newly-diagnosed T2DM groups.

NMR-assessed variable	Control (n = 90)	Newly-diagnosed T2DM (n = 96)	p	p ^a	p ^b
VLDL-P number (nmol/L)					
Total	53.7 (33.1–76.1)	68.2 (41.2–94.8)	0.002	0.047	0.085
Large	1.0 (0.5–2.4)	1.9 (0.9–3.2)	0.001	0.011	0.028
Medium	7.1 (3.3–12.9)	8.8 (5.5–16.4)	0.019	0.096	0.156
Small	44.6 (28.7–62.0)	54.2 (34.4–75.5)	0.002	0.045	0.081
Ratio Large/Total	0.022 (0.015–0.034)	0.029 (0.021–0.040)	0.005	0.027	0.057
VLDL-P composition (mg/dL)					
VLDL-C	13.7 (5.8–23.5)	17.0 (8.4–29.9)	0.027	0.058	0.095
VLDL-TG	66.7 (40.0–101.1)	84.6 (50.9–126.8)	0.006	0.037	0.071
Ratio VLDL-C/VLDL-TG	0.19 (0.13–0.24)	0.19 (0.15–0.24)	0.499	0.137	0.186
VLDL-P size (nm)	39.9 ± 1.3	40.4 ± 1.3	0.016	0.112	0.205
LDL-P number (nmol/L)					
Total	1674.2 ± 348.9	1524.1 ± 399.0	0.007	0.026	0.031
Large	200.4 (136.4–249.2)	150.6 (109.6–227.7)	0.028	0.308	0.465
Medium	642.2 (518.6–730.6)	554.8 (406.3–698.1)	0.006	0.015	0.024
Small	804.6 (638.9–959.6)	725.7 (597.0–875.7)	0.053	0.106	0.099
Ratio Small/Total	0.50 (0.42–0.56)	0.54 (0.43–0.59)	0.128	0.672	0.815
LDL-P composition (mg/dL)					
LDL-C (mg/dL)	193.6 ± 45.9	172.0 ± 54.4	0.004	0.017	0.027
LDL-TG (mg/dL)	12.28 (9.34–15.28)	13.51 (11.09–17.78)	0.212	0.196	0.216
Ratio LDL-C/LDL-TG	9.58 (7.84–11.15)	7.58 (6.08–10.08)	<0.001	0.003	0.005
LDL-P size (nm)	19.9 ± 0.3	19.9 ± 0.3	0.279	0.464	0.626
HDL-P number (μmol/L)					
Total	28.6 ± 6.6	28.7 ± 6.9	0.909	0.922	0.893
Large	1.5 (0.8–2.4)	0.9 (0.3–1.5)	<0.001	0.009	0.013
Medium	8.24 (5.80–11.23)	6.32 (4.32–9.54)	0.001	0.085	0.114
Small	19.2 (13.3–24.1)	21.9 (17.3–26.4)	0.022	0.098	0.135
Ratio Large/Total	0.050 (0.029–0.088)	0.032 (0.010–0.052)	<0.001	0.009	0.012
HDL-P composition (mg/dL)					
HDL-C (mg/dL)	54.5 (46.7–64.3)	46.1 (38.8–54.6)	<0.001	0.001	0.003
HDL-TG (mg/dL)	10.5 (8.8–12.6)	11.6 (9.7–14.7)	0.011	0.034	0.053
Ratio HDL-C/HDL-TG	5.2 (4.2–6.2)	4.0 (3.2–5.2)	<0.001	<0.001	<0.001
Ratio HDL-C/HDL-P	1.88 (1.72–2.24)	1.69 (1.52–1.89)	<0.001	<0.001	<0.001
HDL-P size (nm)	8.2 (8.0–8.4)	8.0 (7.9–8.2)	0.001	0.007	0.012
Atherogenic Ratios					
Ratio LDL-C/HDL-C	3.56 (2.73–4.24)	3.32 (2.58–4.66)	0.922	0.943	0.924
Ratio (VLDL-C + LDL-C)/HDL-C	3.97 (2.89–4.75)	3.76 (2.89–5.29)	0.431	0.481	0.516
Ratio LDL-P/HDL-P	57.5 (50.2–68.8)	50.9 (39.4–67.5)	0.014	0.116	0.146
Ratio (VLDL-P + LDL-P)/HDL-P	59.7 (52.5–70.8)	52.9 (41.8–70.9)	0.027	0.179	0.212

Data are shown as median (Q1–Q3) or mean ± standard deviation.

HDL: high-density lipoprotein; HDL-C: cholesterol content in HDL; HDL-P: HDL particles; HDL-TG: triglyceride content in HDL; LDL low-density lipoprotein; LDL-C: cholesterol content in LDL; LDL-P: LDL particles; LDL-TG: triglyceride content in LDL; NMR: nuclear magnetic resonance; T2DM: type 2 diabetes mellitus; VLDL: very low-density lipoprotein; VLDL-C: cholesterol content in VLDL; VLDL-P: VLDL particles; VLDL-TG: triglyceride content in VLDL.

^a p-value adjusted for age, sex, lipid-lowering medications and BMI (similar results for waist circumference or body fat [%]).

^b p-value adjusted for age, sex, lipid-lowering medications, BMI and leukocyte count (similar results for C-reactive protein).

[16]. We anticipated a mean CCA-IMT group difference of 0.12 mm (SD 0.24). A sample size of 170 subjects (85 per group) was estimated to provide 85% statistical power, assuming a 10% dropout rate. The two-side significance level was set at $p < 0.05$. All analyses were performed using the SPSS 20.0 statistical package (Chicago, IL) and SAS software, v.9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina).

3. Results

3.1. Subjects' characteristics

Table 1 shows subjects' characteristics by study group. Per study design, there were no differences in age, sex, smoking status, or prevalence of treated dyslipidemia or hypertension. Total and LDL-cholesterol were lower, and systolic blood pressure and triglycerides were higher in newly-diagnosed T2DM compared with control subjects, respectively. In the subgroup of participants not taking lipid-lowering drugs ($n = 56/55$ controls/newly-diagnosed T2DM), levels of total cholesterol (208 ± 34 vs. 207 ± 35 mg/dL) and LDL-cholesterol (130 ± 27 vs. 128 ± 28 mg/dL) were similar ($p > 0.7$), while the differences in triglycerides and HDL-cholesterol persisted. As expected, anthropometric variables, diabetes-related

variables, and markers of chronic inflammation differed between groups (Table 1).

3.2. NMR lipoprotein profile in newly-diagnosed T2DM and control groups

The NMR lipoprotein profile of the study population is shown in Table 2. Compared to control subjects, newly-diagnosed T2DM patients had a greater number of total VLDL-P (and subclasses), fewer large and medium LDL-P and fewer large and medium HDL-P subclasses. Moreover, patients with newly-diagnosed T2DM had larger VLDL-P, smaller HDL-P, and triglyceride enriched LDL-P and HDL-P (lower ratio LDL-C/LDL-TG and HDL-C/HDL-TG, respectively). Interestingly, in subjects not taking lipid-lowering drugs (data not shown), the between-group differences in VLDL and HDL profiles remained, as well as the decrease in LDL-C/LDL-TG ratio in newly-diagnosed T2DM ($9.7 [7.9–10.9]$ vs. $7.7 [6.5–10.2]$, $p = 0.016$).

We evaluated whether differences in the NMR lipoprotein profile remained after adjustment for age, sex, lipid-lowering drugs, anthropometric variables (such as BMI, body fat, or waist circumference) and other confounding factors. BMI (or body fat or waist circumference) was higher in newly-diagnosed T2DM (Table 1), and

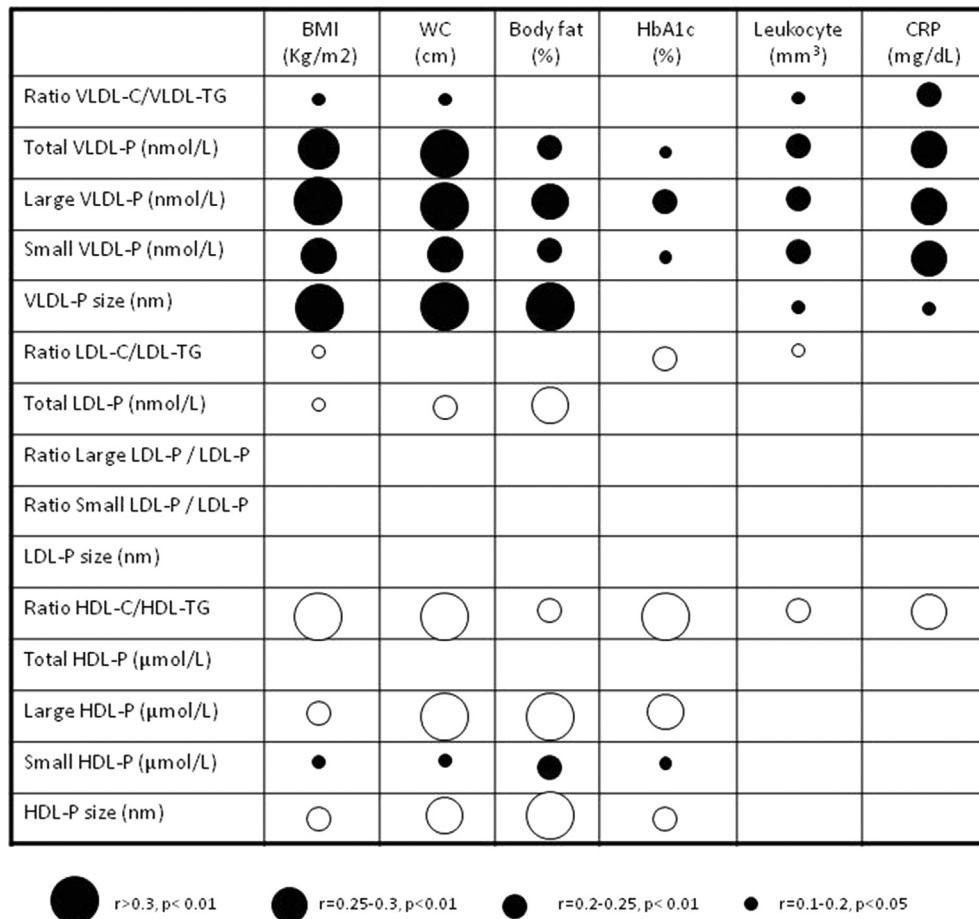


Fig. 1. Associations between NMR-assessed advanced lipoprotein profile and anthropometric, glycemic and inflammation-related variables. Solid and open circles indicate positive and negative relationships, respectively. BMI: body mass index; CRP: C-reactive protein; HDL: high-density lipoprotein; HDL-C: cholesterol content in HDL; HDL-P: HDL particles; HDL-TG: triglyceride content in HDL; LDL: low-density lipoprotein; LDL-C: cholesterol content in LDL; LDL-P: LDL particles; LDL-TG: triglyceride content in LDL; NMR: nuclear magnetic resonance; T2DM: type 2 diabetes mellitus; VLDL: very low-density lipoprotein; VLDL-C: cholesterol content in VLDL; VLDL-P: VLDL particles; VLDL-TG: triglyceride content in VLDL; WC: waist circumference.

both BMI and markers of inflammation were associated with the NMR-assessed lipoprotein profile (Fig. 1). As shown in Table 2, some of the differences between groups were attenuated after adjustment, but the major disparities in VLDL-P and HDL still remained.

3.3. Associations between advanced lipoprotein profile and common carotid IMT

Mean CCA-IMT in the entire cohort (newly-diagnosed T2DM and controls) was weakly associated with some of the NMR lipoprotein profile parameters (Supplementary information). We tested whether these associations were similar in men and women and found some statistically meaningful interactions ($p = 0.02-0.15$) between VLDL and HDL variables and sex in their age-adjusted association with CCA-IMT. After exploring these interactions we found a direct association of CCA-IMT with the number of VLDL-P and an inverse association with HDL-P size and large and medium HDL-P subclasses only in women. We found no age-and-sex adjusted interactions ($p = 0.2-0.8$) between lipoprotein profile parameters and the variable GROUP (control vs. newly-diagnosed T2DM) in their association with CCA-IMT.

3.4. Associations between advanced lipoprotein profile and carotid plaque

The relationship between NMR-assessed lipoprotein profile and

carotid plaque presence is represented in Fig. 2 and Supplementary material. VLDL-P lipid content (cholesterol and triglycerides, $p < 0.05$), total VLDL-P number ($p = 0.003$) (and in particular large compared with non-large subclasses), and VLDL-P size ($p = 0.016$) increased linearly with carotid plaque number (Fig. 2). HDL-P cholesterol content and the proportion of cholesterol transported by HDL-P (ratio HDL-C/HDL-TG) decreased with increasing carotid plaque number ($p < 0.05$, both). Furthermore, although the total amount of HDL-P was similar between carotid plaque groups ($p = 0.321$), there were a lower proportion of large HDL-P ($p = 0.010$) and a trend ($p = 0.077$) to lower HDL-P size in subjects with more carotid plaques (Fig. 2). Finally, we observed a progressive increased in the atherogenic profile (ratio LDL-C/HDL-C, median [Q1–Q3]) with increasing carotid plaque number (none: 3.33 [2.59–4.45], 1 or 2: 3.39 [2.67–4.16], and ≥ 3 plaques: 3.87 [3.03–5.27], respectively, $p = 0.032$). No differences for other LDL related variables were found. We found no significant interactions between lipoprotein variables and sex or GROUP in their association with carotid plaque burden (none/1–2 vs. ≥ 3 carotid plaques).

We further evaluated whether the prior univariate associations (Supplementary Table and Fig. 2) persisted after multivariate adjustment (Table 3). In the whole group, an increase in triglyceride content of VLDL-P, greater number of VLDL-P (and large VLDL-P subclasses) and higher VLDL-P size were associated with a higher odds of carotid plaque presence (yes/no) and existence of ≥ 3

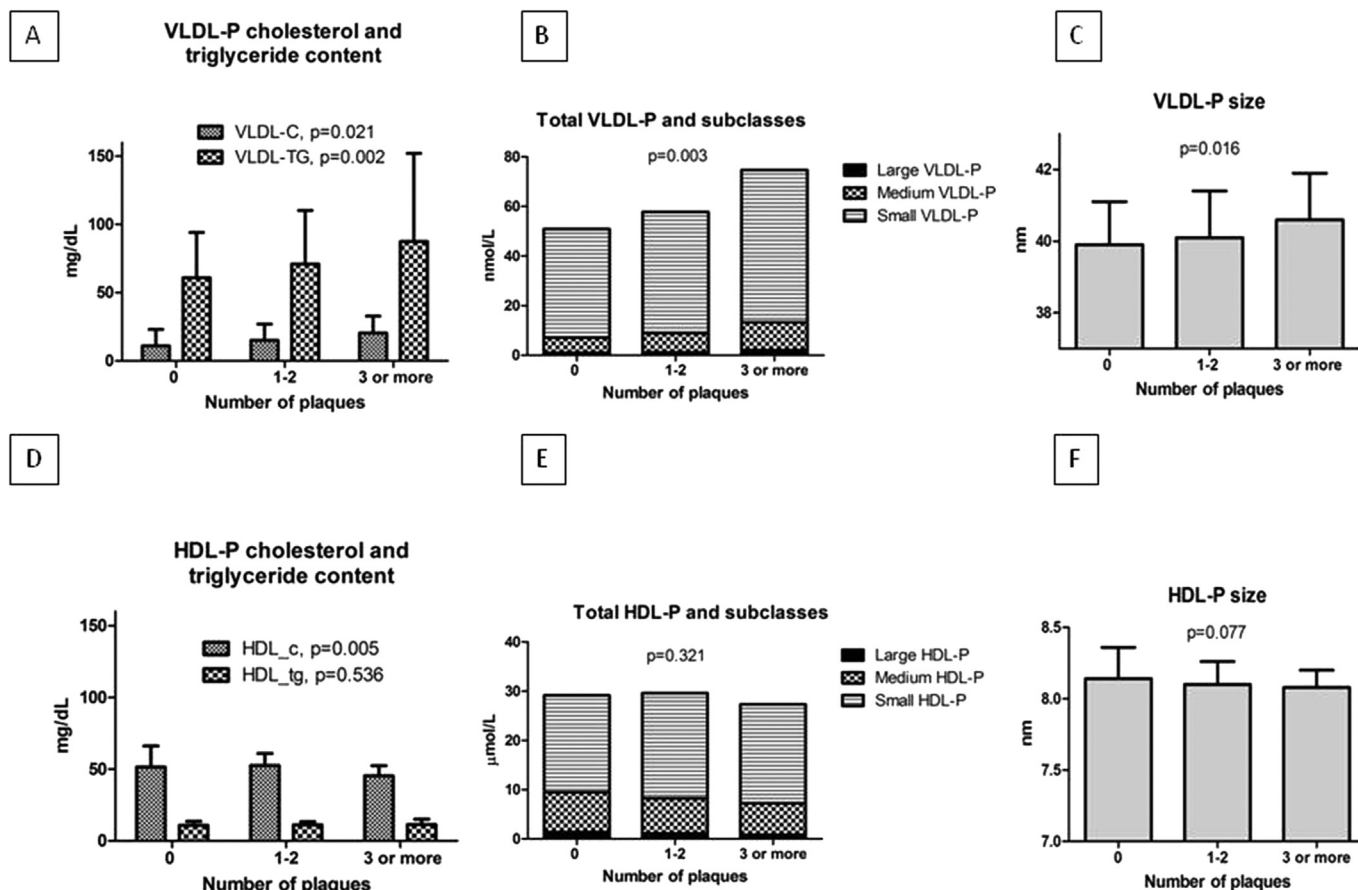


Fig. 2. VLDL and HDL lipid content, lipoprotein subclasses, and size according to carotid plaque status. P-values (Kruskal-Wallis) for differences among the three categories (none [$n = 62$]; 1–2 [$n = 76$]; ≥ 3 carotid plaques [$n = 48$]) are shown. HDL: high-density lipoprotein; HDL-C: content of cholesterol in HDL; HDL-P: HDL particles; HDL-TG: content in triglycerides in HDL; VLDL: very low-density lipoprotein; VLDL-C: content of cholesterol in VLDL; VLDL-P: VLDL particles; VLDL-TG: content in triglycerides in VLDL. A: Ratio VLDL-C/VLDL-TG (0.18 [0.13–0.24], 0.20 [0.13–0.24], 0.20 [0.15–0.24], $p = 0.694$, and, D: ratio HDL-C/HDL-TG (4.86 [3.72–6.09], 4.75 [3.91–5.99], 4.22 [2.86–5.07], $p = 0.014$). Total (and subtractions) lipoprotein number (B and E). p-value for total lipoprotein number is shown. B: Ratio Large VLDL-P/VLDL-P (0.022 [0.016–0.032], 0.028 [0.018–0.035] and 0.031 [0.021–0.044], $p = 0.009$); E: Ratio Large HDL-P/HDL-P (0.048 [0.024–0.090], 0.039 [0.014–0.069] and 0.032 [0.010–0.055], $p = 0.026$). Lipoprotein size (C and F). C: VLDL size was 39.9 ± 1.2 , 40.1 ± 1.3 , and 40.6 ± 1.3 nm in subjects with no, 1–2, and ≥ 3 carotid plaques, respectively. F: HDL size was 8.14 (8.02–8.36), 8.10 (7.94–8.26), and 8.08 (7.96–8.20) nm in subjects with no, 1–2, and ≥ 3 carotid plaques, respectively.

carotid plaques. Conversely, HDL-P cholesterol (vs. triglyceride) content was inversely associated with carotid plaque burden.

4. Discussion

In a group of newly-diagnosed T2DM individuals with near-normal HDL-cholesterol and triglyceride concentrations compared with a matched control group, NMR evaluation of lipoproteins identifies additional atherogenic abnormalities (particle number, size and lipid composition of VLDL and HDL) beyond the conventional lipid profile. These lipoprotein abnormalities are associated with preclinical carotid atherosclerosis in both T2DM patients and control subjects. Our results contribute to understanding the atherogenic lipoprotein abnormalities of T2DM and their relation with cardiovascular disease risk.

NMR spectroscopy is useful for the study of diabetic dyslipidemia [7,8]. The traditional assessment of the lipid alterations of atherogenic dyslipidemia, i.e., measurements of LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, and triglycerides, or even LDL-cholesterol size determination by gel electrophoresis, does not allow the identification of the main lipid abnormality, increased blood concentrations of abnormal VLDL secondary to hepatic VLDL overproduction [17]. Our results concur with findings in non-Mediterranean subjects showing an increased amount of VLDL (both total and

subclasses) particles in T2DM [18–20], pointing out the importance of this lipoprotein as a marker of diabetic dyslipidemia. Alterations of HDL are also a key component of this syndrome. Although we have observed a similar amount of total HDL-P in controls and newly-diagnosed T2DM, the latter disclosed a lower amount of large antiatherogenic particles, as previously described [18,19]. Furthermore, we found triacylglycerol-enriched HDL particles in newly-diagnosed T2DM that are prone to hepatic lipase catabolism and exhibit impaired antioxidant activity [21]. Finally, even though we could not identify the third key component of diabetic dyslipidemia, i.e., increased number of total and small LDL particles, we still found triacylglycerol-enriched LDL (proportional to cholesterol) in newly-diagnosed T2DM compared to controls. The recent diagnosis of diabetes, good glycemic control (average HbA1c of 6.7%), low prevalence of atherogenic dyslipidemia (defined as the combination of conventional low HDL-cholesterol and high triglycerides), and high proportion of subjects on statin treatment, a drug that predominantly acts on LDL, might explain in part our LDL findings.

While the pathophysiology of atherogenic dyslipidemia is not fully understood, hepatic insulin resistance is believed to play a crucial role [7,8]. In fact, a NMR lipoprotein score from the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) population was closely associated with glucose disposal rate obtained during

Table 3

Associations between NMR-assessed advanced lipoprotein profile and preclinical carotid atherosclerosis: multiple regression analysis.

Carotid plaque variables		
Plaque presence (yes/no)	OR 95%CI	p
VLDL-TG (mg/dL)	1.767 (1.003–3.105)	0.0478
VLDL-C (mg/dL)	1.610 (0.944–2.747)	0.0804
VLDL-P (nmol/L)	1.560 (0.937–2.598)	0.0874
Large VLDL-P (nmol/L)	6.156 (1.699–22.300)	0.0056
VLDL size (nm)	1.416 (0.964–2.082)	0.0763
Ratio Large VLDL-P/Total VLDL-P	1.739 (1.160–2.608)	0.0075
≥3 plaques (yes/no)	OR 95%CI	p
VLDL-TG (mg/dL)	8.975 (2.330–34.576)	<0.001
VLDL-P (nmol/L)	2.713 (1.601–4.598)	<0.001
Large VLDL-P (nmol/L)	2.772 (1.531–5.018)	<0.001
Ratio Large VLDL-P/Total VLDL-P	1.723 (1.145–2.592)	0.0090
VLDL size (nm)	2.044 (1.320–3.166)	0.0014
HDL-C (mg/dL)	0.625 (0.368–1.063)	0.0829
Ratio HDL-C/HDL-TG	0.638 (0.477–0.852)	0.0024
Ratio LDL-C/HDL-C	1.462 (1.014–2.107)	0.0417
Ratio (VLDL-C + LDL-C)/HDL-C	1.548 (1.037–2.310)	0.0326

Stepwise logistic regression models for plaque outcomes adjusted for: age, sex, body mass index, GROUP (newly-diagnosed diabetes vs. control), presence of hypertension or dyslipidemia, smoking status, systolic blood pressure, statin score, and conventional lipid profile (LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides). Standardized odds ratio and 95% confidence interval are shown.

Value of significance level for entry $p < 0.15$.

HDL: high-density lipoprotein; HDL-C: cholesterol content in HDL; HDL-P: HDL particles; HDL-TG: triglyceride content in HDL; NMR: nuclear magnetic resonance; VLDL: very low-density lipoprotein; VLDL-C: cholesterol content in VLDL; VLDL-P: VLDL particles; VLDL-TG: triglyceride content in VLDL.

hyperinsulinemic-euglycemic clamp [22], a gold standard measurement of whole body insulin action. We did not measure insulin action, but we adjusted NMR lipoprotein profiles for obesity (Table 2), the main determinant of insulin action in humans, and for markers of chronic inflammation (closely associated with insulin resistance), and found marginal attenuation (for VLDL) or no effect modification (for HDL) in the main differences in the advanced lipid profile between newly-diagnosed T2DM and controls.

The relationship between NMR lipoprotein profiles and preclinical carotid atherosclerosis has been previously evaluated in few studies [23–28]. Most of them have focused on common carotid IMT, however, and little information is available on associations with carotid plaque [27,28]. Furthermore, whereas the association between LDL [24,25] and HDL composition [26–28] and preclinical atherosclerosis is well established, to the best of our knowledge no data are available on VLDL characteristics, even though total amount of VLDL-P and large VLDL-P were independent predictors of cardiovascular events in a cohort or 27,673 women followed during 11 years [29]. VLDL particle amounts and features was the NMR-assessed lipid variable more closely associated with preclinical atherosclerosis in our population. VLDL triglyceride content, total and individual subclasses of VLDL-P (in particular the proportion of large VLDL-P), and VLDL-P size were associated with carotid plaque even after adjustment for confounders (Table 3). Therefore, in addition to being the marker of atherogenic dyslipidemia, VLDL-P could also be involved in the genesis of atherosclerosis [30]. Although the role of triglycerides as a cardiovascular risk factor is a matter of debate [31], newer genetic data indicate a potential causal role of triglyceride-rich lipoproteins in cardiovascular events [32,33]. Furthermore, in our study HDL-cholesterol, the HDL-cholesterol/HDL-triglyceride ratio, HDL-P size ($p = 0.077$), and larger HDL-P were inversely associated with carotid plaque. However, after adjusting for risk factors and statin treatment (Table 3), only HDL lipid content remained inversely associated with carotid plaque burden. Indeed, triglyceride HDL-P content (expressed as the ratio HDL-cholesterol/HDL-triglyceride,

a marker not assessed in previous studies) [26,28], was strongly associated with all measurements of atherosclerosis in our cohort, indicating that this triacylglycerol-enriched lipoprotein might play a role in atherosclerosis [21].

Atherogenic dyslipidemia might have a different role in atherosclerosis in men and women, and this could help explain sex differences in cardiovascular disease outcomes [1,34]. Compared to non-diabetic populations, T2DM increases cardiovascular disease risk by 3–4 times in women but only twice in men [1,34]. Although men and women were evaluated in previous studies [23–28], a differential sex effect of NMR-lipoprotein profile on preclinical atherosclerosis or cardiovascular events has not been investigated. We found that the lack of association between IMT and NMR-lipoprotein profile was driven in part by a differential association of several of these variables with IMT in men and women. Indeed, we found that in women VLDL and HDL variables were directly and inversely associated with IMT, respectively, while no associations were observed for men. No such sex differences were observed when we analyzed associations with carotid plaque.

Our case-control study has strengths and limitations. Among the strengths, the study was performed in a homogeneous group of T2DM patients (early stage and no cardiovascular disease) with lower potential for confounding. No prior studies have evaluated the relationships between image biomarkers of CVD, such as carotid atheroma plaque, and one of its most important determinants, i.e., atherogenic dyslipidemia, at a diabetes disease stage when CVD prevention is likely by intensive glucose control. Most previous studies addressing the associations of NMR lipoproteins with preclinical atherosclerosis focused on IMT [22–25], while we have evaluated carotid plaque, a better independent predictor of cardiovascular events [35,36]. Furthermore, we have accounted for most clinical variables influencing preclinical atherosclerosis, including standard cardiovascular risk factors and statin treatment. Limitations should also be acknowledged. Due to the cross-sectional design, a causal relationship between disturbances of NMR-assessed lipoproteins and IMT or carotid plaque cannot be established. Longitudinal studies with greater sample size are needed to confirm the central role of triglyceride-rich lipoproteins in the development and/or progression of preclinical atherosclerosis at the early stages of T2DM. Moreover, the high proportion (close to 40%) of patients on lipid-lowering drugs in the two study groups could have influenced in part our results. However, a sensitivity analysis performed in subjects without lipid lowering drugs provided similar results. Finally, as indicated in Table 1, according to HbA1c and fasting glucose concentrations some of our controls (18 out of 90) had prediabetes. Nevertheless, we decided to keep them merged in the same non-diabetic group to respect our study design (based on diabetic vs. non-diabetic individuals), our small sample size and, most importantly, because conventional and NMR lipid parameters were similar between prediabetic and non-prediabetic controls ($p > 0.2$, all), even though different patterns of lipid profiles have been described across glucose tolerance categories and ethnicities [37].

In summary, our study in a group of newly-diagnosed T2DM and matched non-diabetic individuals shows significant quantitative and qualitative between-group differences in NMR advanced lipoprotein profile and associations between triglyceride-enriched HDL-P and several VLDL-P variables with preclinical carotid atherosclerosis (in particular carotid plaque), highlighting the importance of triglyceride-rich lipoproteins in the pathophysiology of atherosclerosis. At this early stage of the disease, a combination of specific biomarkers of vascular wall imaging and atherogenic dyslipidemia, a main determinant of cardiovascular risk in diabetes, may be useful to identify individuals who should be targeted for intensive cardiovascular risk prevention strategies. Finally,

although the clinical utility of this NMR-assessed advanced lipoprotein profile has to be fully elucidated in prospective studies, as suggested by some scientific societies [38,39], this tool might be increasingly used in the near future for predicting cardiovascular disease and as lipid target.

Sources of funding

This work has been funded by the project PI11/01723, integrated in the Plan Nacional I+D+I and co-funded by ISCIII-Subdirección General de Evaluación and European Regional Development Fund (ERDF): “a way to build Europe”. AS-V was supported by post-doctoral contract FIS CP12/03299.

Disclosures

None.

Acknowledgements

This work would not have been possible without the generosity of our participants and the help (physicians, nurses, and administrative personal) of the three primary care centres (CAPSE, CAP Borrell, Casanovas, and Les Corts) involved in the study. CIBEROBN is an initiative of ISCIII, Spain. We thank <http://biosferteslab.com/en/> for expert advice and lipoprotein analysis in our samples.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.02.014>.

References

- [1] Emerging Risk Factors Collaboration, N. Sarwar, P. Gao, et al., Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies, *Lancet* 375 (2010) 2215–2222.
- [2] Emerging Risk Factors Collaboration, S.R.K. Seshasai, S. Kaptoge, et al., Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death, *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 829–841.
- [3] T.S. Temelkova-Kurktschiev, C. Koehler, W. Leonhardt, F. Schaper, E. Henkel, G. Siegert, M. Hanefeld, Increased intimal-medial thickness in newly detected type 2 diabetes: risk factors, *Diabetes Care* 22 (1999) 333–338.
- [4] V. Sigurdardottir, B. Fagerberg, J. Hulthe, Preclinical atherosclerosis and inflammation in 61-year-old men with newly diagnosed diabetes and established diabetes, *Diabetes Care* 27 (2004) 880–884.
- [5] L.-X. Li, C.-C. Zhao, Y. Ren, Y.-F. Tu, J.-X. Lu, X. Wu, W.X. Zhang, J.A. Zhu, M.F. Li, L.B. Yu, Y.Q. Bao, W.P. Jia, Prevalence and clinical characteristics of carotid atherosclerosis in newly diagnosed patients with ketosis-onset diabetes: a cross-sectional study, *Cardiovasc. Diabetol.* 12 (2013) 18.
- [6] M. Catalan, Z. Herreras, M. Pinyol, A. Sala-Vila, A.J. Amor, E. de Groot, R. Gilabert, E. Ros, E. Ortega, Prevalence by sex of preclinical carotid atherosclerosis in newly diagnosed type 2 diabetes, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 25 (2015) 742–748.
- [7] M.-R. Taskinen, J. Borén, New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes, *Atherosclerosis* 239 (2015) 483–495.
- [8] B. Vergés, Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia* 58 (2015) 886–899.
- [9] D.S. Moin, A. Rohatgi, Clinical applications of advanced lipoprotein testing in diabetes mellitus, *Clin. Lipidol.* 6 (2011) 371–387.
- [10] R. Mallol, M.A. Rodríguez, J. Brezmes, L. Masana, X. Correig, Human serum/plasma lipoprotein analysis by NMR: application to the study of diabetic dyslipidemia, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 70 (2013) 1–24.
- [11] J. Gómez-Ambrosi, C. Silva, V. Catalán, A. Rodríguez, J.C. Galofré, J. Escalada, V. Valentí, F. Rotellar, S. Romero, B. Ramírez, J. Salvador, G. Frühbeck, Clinical usefulness of a new equation for estimating body fat, *Diabetes Care* 35 (2012) 383–388.
- [12] R. Mallol, N. Amigó, M.A. Rodríguez, M. Heras, M. Vinaixa, N. Plana, E. Rock, J. Ribalta, O. Yanes, L. Masana, X. Correig, Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 737–746.
- [13] M. Junyent, M. Cofán, I. Núñez, R. Gilabert, D. Zambón, E. Ros, Influence of HDL cholesterol on preclinical carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 1107–1113.
- [14] A. Sala-Vila, M. Cofán, A. Pérez-Heras, I. Núñez, R. Gilabert, M. Junyent, R. Mateo-Gallego, A. Cenarro, F. Civeira, E. Ros, Fatty acids in serum phospholipids and carotid intima-media thickness in Spanish subjects with primary dyslipidemia, *Am. J. Clin. Nutr.* 92 (2010) 186–193.
- [15] P.-J. Touboul, M.G. Hennerici, S. Meairs, 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. Basel Switz.* 23 (2007) 75–80.
- [16] L.E. Wagenknecht, D. Zaccaro, M.A. Espeland, A.J. Karter, D.H. O’Leary, S.M. Haffner, Diabetes and progression of carotid atherosclerosis: the insulin resistance atherosclerosis study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1035–1041.
- [17] M. Adiels, S.-O. Olofsson, M.-R. Taskinen, J. Borén, Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) 1225–1236.
- [18] W.T. Garvey, S. Kwon, D. Zheng, S. Shaughnessy, P. Wallace, A. Hutto, K. Pugh, A.J. Jenkins, R.L. Klein, Y. Liao, Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance, *Diabetes* 52 (2003) 453–462.
- [19] A. Festa, K. Williams, A.J.G. Hanley, J.D. Otvos, D.C. Goff, L.E. Wagenknecht, S.M. Haffner, Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in pre-diabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study, *Circulation* 111 (2005) 3465–3472.
- [20] J. Wang, A. Stancáková, P. Soininen, A.J. Kangas, J. Paananen, J. Kuusisto, M. Ala-Korpela, M. Laakso, Lipoprotein subclass profiles in individuals with varying degrees of glucose tolerance: a population-based study of 9399 Finnish men, *J. Intern. Med.* 272 (2012) 562–572.
- [21] E. Nobécourt, S. Jacqueminet, B. Hansel, S. Chantepie, A. Grimaldi, M.J. Chapman, A. Kontush, Defective antioxidant activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia, *Diabetologia* 48 (2005) 529–538.
- [22] I. Shalaurava, M.A. Connelly, W.T. Garvey, J.D. Otvos, Lipoprotein insulin resistance index: a lipoprotein particle-derived measure of insulin resistance, *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 12 (2014) 422–429.
- [23] A. Sekikawa, H. Ueshima, K. Sutton-Tyrrell, T. Kadowaki, A. El-Saed, T. Okamura, T. Takamiya, Y. Ueno, R.W. Evans, Y. Nakamura, D. Edmundowicz, A. Kashiwagi, H. Maegawa, L.H. Kuller, Intima-media thickness of the carotid artery and the distribution of lipoprotein subclasses in men aged 40 to 49 years between whites in the United States and the Japanese in Japan for the ERA JUMP study, *Metabolism* 57 (2008) 177–182.
- [24] S. Mora, M. Szklo, J.D. Otvos, P. Greenland, B.M. Psaty, D.C. Goff, D.H. O’Leary, M.F. Saad, M.Y. Tsai, A.R. Sharrett, LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), *Atherosclerosis* 192 (2007) 211–217.
- [25] J.D. Otvos, S. Mora, I. Shalaurava, P. Greenland, R.H. Mackey, D.C. Goff, Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number, *J. Clin. Lipidol.* 5 (2011) 105–113.
- [26] R.H. Mackey, P. Greenland, D.C. Goff, D. Lloyd-Jones, C.T. Sibley, S. Mora, High-density lipoprotein cholesterol and particle concentrations, carotid atherosclerosis, and coronary events: MESA (multi-ethnic study of atherosclerosis), *J. Am. Coll. Cardiol.* 60 (2012) 508–516.
- [27] Y. Qi, J. Fan, J. Liu, W. Wang, M. Wang, J. Sun, J. Liu, W. Xie, F. Zhao, Y. Li, D. Zhao, Cholesterol-overloaded HDL particles are independently associated with progression of carotid atherosclerosis in a cardiovascular disease-free population: a community-based cohort study, *J. Am. Coll. Cardiol.* 65 (2015) 355–363.
- [28] M. Zaid, A. Fujiyoshi, K. Miura, et al., High-density lipoprotein particle concentration and subclinical atherosclerosis of the carotid arteries in Japanese men, *Atherosclerosis* 239 (2015) 444–450.
- [29] S. Mora, J.D. Otvos, N. Rifai, R.S. Rosenson, J.E. Buring, P.M. Ridker, Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women, *Circulation* 119 (2009) 931–939.
- [30] L. Wu, K.G. Parhofer, Diabetic dyslipidemia, *Metabolism* 63 (2014) 1469–1479.
- [31] Emerging Risk Factors Collaboration, E. Di Angelantonio, N. Sarwar, P. Perry, S. Kaptoge, K.K. Ray, A. Thompson, A.M. Wood, S. Lewington, N. Sattar, C.J. Packard, R. Collins, S.G. Thompson, J. Danesh, Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease, *JAMA* 302 (2009) 1993–2000.
- [32] TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project, National Heart, Lung, and Blood Institute, J. Crosby, G.M. Peloso, et al., Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease, *N. Engl. J. Med.* 371 (2014) 22–31.
- [33] A.B. Jørgensen, R. Frikke-Schmidt, B.G. Nordestgaard, A. Tybjaerg-Hansen, Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease, *N. Engl. J. Med.* 371 (2014) 32–41.
- [34] R. Huxley, F. Barzi, M. Woodward, Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies, *BMJ* 332 (2006) 73–78.
- [35] J.D. Spence, Ultrasound measurement of carotid plaque as a surrogate outcome for coronary artery disease, *Am. J. Cardiol.* 89 (2002) 10B–15B discussion 15B – 16B.
- [36] R.D. Brook, R.L. Bard, S. Patel, M. Rubenfire, N.S. Clarke, E.A. Kazerooni,

- T.W. Wakefield, P.K. Henke, K.A. Eagle, A negative carotid plaque area test is superior to other noninvasive atherosclerosis studies for reducing the likelihood of having underlying significant coronary artery disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 656–662.
- [37] L. Zhang, Q. Qiao, J. Tuomilehto, E.D. Janus, T.H. Lam, A. Ramachandran, V. Mohan, C.D. Stehouwer, Y. Dong, T. Nakagami, A. Onat, S. Söderberg, DECODE/DECODA Study Group. Distinct ethnic differences in lipid profiles across glucose categories, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (2010) 1793–1801.
- [38] H.E. Bays, P.H. Jones, W.V. Brown, T.A. Jacobson, National Lipid Association, National lipid association Annual summary of clinical lipidology 2015, *J. Clin. Lipidol.* 8 (2014) S1–S36.
- [39] A.J. Garber, M.J. Abrahamson, J.I. Barzilay, et al., American Association of Clinical Endocrinologists' comprehensive diabetes management algorithm 2013 consensus statement—executive summary, *Endocr. Pract.* 19 (2013) 536–557.

The proportion of total C18:1 *trans*-fatty acids in red blood cell membranes relates to carotid plaque prevalence[☆]

Zoe Herreras^a, Montserrat Cofán^{b,c}, Marta Catalan^a, Carlos Calvo^{b,c}, Montserrat Pinyol^a, Antonio J. Amor^c, Rosa Gilabert^d, Emilio Ros^{b,c}, Aleix Sala-Vila^{b,c,*,1}, Emilio Ortega^{b,c,1}

^aConsorci d'Atenció Primària de Salut Eixample (CAPSE), Grup Transversal de Recerca en Atenció Primària, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

^cLipid Clinic, Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

^dDiagnostic Imaging Centre, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

Received 19 February 2016; received in revised form 10 August 2016; accepted 10 August 2016

Abstract

Consistent evidence supports the pro-atherogenic properties of dietary *trans*-fatty acids (TFAs). However, there are no clinical data on TFA intake and atheroma plaque. We cross sectionally investigated whether the proportion of total C18:1 TFA in red blood cells (RBCs), which mirrors dietary TFA intake, independently relates to carotid plaque prevalence in subjects with new-onset type 2 diabetes mellitus without prior cardiovascular disease ($n=101$, 56% men, mean age 61 years) and age- and sex-matched controls ($n=96$). RBC fatty acid composition was determined by gas chromatography. Plaque (defined as carotid intima-media thickness ≥ 1.5 mm) was sonographically assessed at three bilateral carotid segments. In multivariate models adjusting for group (diabetes or control) and classical cardiovascular risk factors, for each 0.1% increase in RBC total C18:1 TFA isomers, plaque prevalence increased by 53% ($P=.002$). In contrast, for each 0.1% increase in RBC alpha-linolenic acid, the vegetable omega-3 fatty acid, plaque prevalence decreased by 43% ($P<.001$). We conclude that the RBC membrane proportion of total C18:1 TFA, considered a proxy of intake, directly relates to the ultrasound feature that best predicts future cardiovascular events. Our findings support current recommendations to limit TFA intake for cardiovascular health promotion.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Alpha-linolenic acid; Atheroma; Biomarkers; Diet; *trans*-Fat

1. Introduction

A large body of evidence supports the concept that dietary fat is crucial in the cause and prevention of cardiovascular diseases [1,2]. Among the different types of dietary fatty acids, the strongest evidence for an increased risk of coronary heart disease is observed for *trans*-fatty acids (TFAs) [3,4]. The most abundant dietary TFA are the *trans*-isomers of C18:1, supplied by highly processed foods, partially hydrogenated vegetable oils, and ruminant fat [2]. The presumed

cardiovascular protection by TFA naturally present in beef and dairy products [5] is controversial given the overlap from industrial and ruminant sources [6], as actually occurs in the general population [2]. This prompted the European Society of Cardiology to advise refraining from consumption of sources of industrial TFA and limiting intake of TFA from animal origin to <1% of total energy in adults, rather than recommending differential intakes by source [7]. In addition, from June 2015, the US Food and Drug Administration no longer recognizes partially hydrogenated oils as safe [8].

Although the mechanisms underlying the deleterious effects of TFA remain to be completely elucidated, results from experimental studies have consistently shown that consumption of TFA from industrial origin induces an atherogenic state (reviewed in Ref. [5]), contributing to the development of atherosclerotic plaque [9]. The presence of plaques in the arterial tree is the hallmark of cardiovascular disease. Since atherosclerosis is a systemic disease, plaque presence in a particular vascular bed is considered a surrogate marker for advanced disease elsewhere. In this regard, detection of non-coronary (*i.e.*, carotid) atherosclerosis by ultrasound, a widely available, low-cost, noninvasive technique, enhances risk prediction and reclassification over traditional cardiovascular risk factors [10]. Carotid intima-media thickness (IMT) has been widely used as a surrogate marker of future

[☆] Grants, sponsors and funding sources: This work was supported (PI11/01723) by the Spanish Ministry of Health (ISCIII) and FEDER. AS-V holds a Miguel Servet I fellowship from the Ministry of Economy and Competitiveness through the *Instituto de Salud Carlos III* (CP12/03299). The sponsors have no role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

^{*} Corresponding author at: Lipid Clinic, Department of Endocrinology and Nutrition, Villarroel 170, Edifici Helios, despatx 8, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x2276; fax: +34 934537829.

E-mail address: asala@clinic.ub.es (A. Sala-Vila).

¹ These authors contributed to this work equally.

cardiovascular events, but increasing evidence indicates that carotid plaque is a better predictor of cardiovascular disease [11].

A single epidemiologic study reported that habitual intake of TFA is associated with enlarged carotid IMT [12], but clinical data on dietary TFA and carotid plaque are lacking. We hypothesized that enrichment of these fatty acids in circulating lipids [13,14] would relate to an increased carotid plaque prevalence. To address this issue, we measured total C18:1 *trans*-isomers in red blood cell (RBC) membranes and related their proportion to subclinical carotid atherosclerosis in 197 subjects well phenotyped for cardiovascular risk factors.

2. Materials and methods

2.1. Study population

This cross-sectional study uses baseline data from the DIABIMCAP Study (Carotid Atherosclerosis in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Individuals, [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study?term=NCT01898572) Identifier: NCT01898572) [15]. We pooled data from 101 subjects with new-onset type 2 diabetes mellitus [fasting glucose and/or glycosylated hemoglobin (HbA1c), 1999 World Health Organization criteria] and a control population ($n=99$) matched for age (± 5 years), gender, treatment with antihypertensive agents, treatment with cholesterol-lowering agents and smoking habit (Supplementary Fig. 1). The study protocol was approved by the ethics committee of the institution and was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all subjects.

2.2. Clinical and laboratory determinations

Participants were invited to attend a first visit at their primary health care center for physical examination and ascertainment of inclusion and exclusion criteria. Age, sex, smoking habits, first-degree family history of diabetes and cardiovascular disease, and personal history and treatment for hypertension and dyslipidemia were recorded. Weight, height and waist circumferences were measured by using standard methods.

Fasting blood samples and spot first morning urine were collected and biochemical measurements were performed in a single laboratory (Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clinic, Barcelona, Spain) using standardized assays to measure glucose, HbA1c and the lipid profile, including total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol by the Friedewald formula, and triglycerides. To determine the fatty acid profile of RBC membranes, a 100 μ l aliquot of EDTA-collected blood was transferred into an Eppendorf containing 1400 μ l of distilled water. Once cells were hemolyzed, they were spun. The supernatant (containing hemoglobin and serum lipids) was discarded, and the pellet (>99.5% of RBC membranes) was dissolved in 1 ml BF_3 methanol solution and transferred to a screw-cap test tube, which was heated for 10 min at 100°C to hydrolyze and methylate glycerophospholipid fatty acids. The extracts were cooled to 25°C and fatty acid methyl esters were isolated by adding *n*-hexane. An aliquot of the hexane layer was transferred into an automatic injector vial equipped with a 300 μ l volume adapter. Fatty acid methyl esters were separated by gas-chromatography using an Agilent 7890 A Gas Chromatograph (Agilent España, Spain) equipped with a 30 m $\times$ 0.25 μ m $\times$ 0.25 mm SupraWAX-280 capillary column (Teknokroma, Spain), an autosampler, and a flame ionization detector. The amount of each fatty acid is expressed as a percentage of the total identified fatty acids in the sample.

2.3. Carotid ultrasound

In a second visit, bilateral carotid artery ultrasound imaging was performed according to a standardized protocol [15] to evaluate

plaque presence. Main outcome measurement was carotid plaque prevalence, and secondary outcomes were presence of at least one plaque with ≥ 2.5 mm; presence of ≥ 3 plaques; and presence of plaque at internal carotid artery. Briefly, patients underwent sonographic assessment with an Acuson X300 ultrasound system (Siemens, Germany) equipped with a VF 10–5 linear transducer (frequency range 5 to 10 MHz). The same certified sonographer performed all examinations. Consistency (reliability or repeatability) of ultrasound carotid wall measurements was evaluated by comparing results from repeated examinations in 14 subjects performed 3 days apart. Intraclass correlation coefficient ranged from 0.92 to 0.96 for IMT mean (average of right and left) and IMT maximum (maximum value from either right or left) in common, bulb and internal carotid segments. IMT at the common, bulb and internal carotid artery were measured offline by semiautomatic software. Plaques were explored by using B-mode and color Doppler and defined as a focal wall thickening encroaching into the arterial lumen by at least 50% of the surrounding IMT value or with thickness of at least 1.5 mm as measured from the media adventitia interference to the intima-lumen surface [16]. Plaque height was recorded at the more appropriate view, either longitudinal or transversal. Plaque burden (sum of maximum heights of all plaques) was recorded for all study subjects.

2.4. Statistical analyses

We expressed data as mean (standard deviation), medians (interquartile ranges) or frequency (percentage), as appropriate. Chi-square test, Mann–Whitney and *t* test were used for group comparisons, as appropriate. We searched for independent associations between carotid atherosclerosis (dependent variables) and the proportions of total C18:1 *trans*-isomers in RBC membranes (independent variable) by constructing logistic regression models. The models included age, gender, body mass index (BMI), treatment with antihypertensive agents, smoking, and group (new-onset type 2 diabetes or control) as potential confounders. Because many subjects had been treated with hypolipidemic drugs and high-dose statins may induce the plaque regression, we also adjusted for statin treatment. To this end, for each subject, we calculated a statin score, an estimation of lifetime exposure to cholesterol-lowering treatment, as the product of the duration of treatment in years by the average dose received of statin drugs standardized to simvastatin. Finally, the models also included RBC membrane proportions of C18:3n-3 (alpha-linolenic acid, ALA), and C20:5n-3+C22:6n-3, since the proportions of these fatty acids in circulating lipids have been inversely related to carotid plaque prevalence in other populations [17,18].

Normal distribution of data was assessed using graphical methods and the Kolmogorov–Smirnov test. Non-normally distributed variables were transformed to their natural logarithm in regression analyses. Standard diagnostic evaluations on the residuals from the fitted models showed no evidence of failure of the assumption of normality and homogeneity of the residual variance. Statistical significance was set at the $P<0.05$ level in all cases. Analyses were performed using SPSS software, version 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

3. Results

Table 1 displays clinical characteristics, demographic data, treatment regimes and carotid ultrasound variables. By study design, no between-group differences existed in age, sex and conventional cardiovascular risk factors, the variables used to match groups. In contrast, subjects with type 2 diabetes had higher BMI and serum triglycerides, lower HDL cholesterol and higher prevalence of pre-clinical atherosclerosis than controls. RBC membrane fatty acid composition is presented in Table 2. Significant between-group

Table 1

Participant clinical characteristics, treatment regimes and carotid ultrasound variables of the study participants

	All participants (n=197)	New-onset diabetes (n=101)	Control (n=96)	P ^a
Variables used to match groups				
Sex, men n (%)	106 (53.8)	56 (55.4)	50 (52.1)	.636
Age, years	62.0 (55.5–66.0)	62.0 (55.0–66.0)	63.0 (55.3–67.0)	.658
Smoking status (current/past/never)	39/57/98	20/30/50	19/27/48	.934
Dyslipidemia, n (%)	77 (39.1)	42 (41.6)	35 (36.5)	.461
Hypertension, n (%)	106 (53.8)	53 (52.5)	53 (55.2)	.701
Other clinical and laboratory characteristics				
Body mass index, kg/m ²	28.9 (26.3–32.5)	30.4 (27.0–33.8)	27.3 (25.1–31.2)	<.001
Total cholesterol, mg/dl	204±39	199±41	209±35	.064
HDL cholesterol, mg/dl	51 (44–62)	47.0 (41.0–55.0)	56 (49–68)	<.001
LDL cholesterol, mg/dl	125±32	129±31	121±33	.076
Triglycerides, mg/dl	112 (85–150)	132 (89–176)	100 (75–132)	<.001
Statin score	0 (0–26)	0 (0–18)	0 (0–39)	.672
Hemoglobin A1c, %	6.1 (5.6–6.7)	6.7 (6.3–7.4)	5.6 (5.5–5.9)	<.001
UACR ≥30 mg/g, yes	19 (10.0)	11 (11.5)	8 (8.5)	.498
Carotid ultrasound				
Plaque prevalence, yes	132 (67.0)	74 (73.3)	58 (60.4)	.055
≥3 plaques, yes	52 (26.4)	37 (36.6)	15 (15.6)	.003
Plaque ≥2.5 mm, yes	49 (24.9)	33 (32.7)	16 (16.7)	.009
Plaque at internal carotid artery, yes	63 (32.0)	44 (43.6)	19 (19.8)	<.001
Plaque burden, mm ^b	4.10 (1.95–7.11)	5.59 (3.29–7.53)	3.41 (1.73–5.09)	.001

Data are shown as n (percentage), median (Q1–Q3) or mean ± standard deviation.

UACR: urine albumin to creatinine ratio.

^a P values for comparisons between new-onset type 2 diabetes and controls, obtained by chi-square test, Mann–Whitney and t test, as appropriate.^b Sum of maximum heights of all plaques. Data from n=131/73/58 participants.

differences were limited to *cis*-C16:1n-7 and C20:4n-6, which were higher in type 2 diabetes compared with controls, and ALA, which was higher in controls compared with diabetic individuals. Table 3 displays comparisons regarding C18:1 TFA, ALA and C20:5n-3+C22:6n-3 in RBC of subjects grouped by carotid plaque prevalence. Significant differences were found for ALA when grouping the study population according to having any carotid plaque, having ≥3 plaques and having a plaque at internal carotid artery. For C18:1 TFA, differences were

only observed when the participants were divided by presence or absence of plaque in the carotid artery. Fig. 1 summarizes cross-sectional associations of carotid plaque with RBC total C18:1 TFA and n-3 fatty acids, and conventional cardiovascular risk factors and treatments. After adjusting for potential confounders, the probability of having any (yes/no) carotid plaque increased by 53% for each 0.1% increase in total C18:1 TFA in RBC membranes. In contrast, for each 0.1% increase in RBC ALA, there was a 43% lower probability of having

Table 2

RBC fatty acid composition (% of total fatty acids) of the study participants

Fatty acid	All participants (n=197)	New-onset diabetes (n=101)	Control (n=96)	P ^a
C14:0	2.52 (1.11–4.01)	2.28 (1.06–3.64)	2.59 (1.17–4.56)	.155
C16:0	20.49 (19.87–21.07)	20.55 (19.89–21.20)	20.36 (19.78–20.85)	.124
C18:0	10.74 (9.29–12.56)	10.38 (9.26–12.14)	11.36 (9.43–13.22)	.062
C20:0	0.16 (0.09–0.21)	0.13 (0.08–0.20)	0.17 (0.12–0.22)	.011
C22:0	0.14 (0.10–0.17)	0.13 (0.10–0.17)	0.15 (0.10–0.18)	.302
C24:0	0.30 (0.24–0.41)	0.29 (0.22–0.38)	0.31 (0.25–0.46)	.033
Sum of SFA	34.65 (33.31–37.22)	34.42 (33.25–36.13)	35.44 (33.32–37.68)	.071
<i>cis</i> -C16:1n-7	0.62 (0.52–0.82)	0.67 (0.54–0.94)	0.61 (0.47–0.74)	.009
<i>trans</i> -C16:1n-7	0.25 (0.22–0.27)	0.25 (0.22–0.27)	0.24 (0.21–0.27)	.611
<i>cis</i> -C18:1n-9	16.20 (15.03–17.66)	16.11 (14.90–17.48)	16.31 (15.15–18.16)	.416
Total <i>trans</i> -C18:1	1.18 (1.10–1.30)	1.21 (1.10–1.31)	1.17 (1.09–1.27)	.188
C20:1n-9	0.20 (0.16–0.27)	0.20 (0.15–0.27)	0.21 (0.16–0.27)	.361
C24:1n-9	0.44 (0.34–0.60)	0.43 (0.33–0.57)	0.44 (0.34–0.69)	.344
Sum of MUFA	19.02 (17.76–20.97)	19.09 (17.72–20.76)	18.98 (17.77–21.21)	.704
C18:2n-6	13.51 (11.98–14.87)	13.20 (11.90–14.51)	13.64 (12.11–15.20)	.301
C18:3n-6	0.16 (0.12–0.20)	0.15 (0.12–0.20)	0.17 (0.11–0.21)	.635
C20:2n-6	0.21 (0.18–0.25)	0.21 (0.18–0.24)	0.22 (0.19–0.26)	.133
C20:3n-6	1.74 (1.51–1.95)	1.76 (1.50–1.94)	1.71 (1.52–1.96)	.524
C20:4n-6	18.13 (15.97–20.05)	18.80 (16.23–20.31)	17.64 (15.58–19.83)	.021
C22:4n-6	2.25 (1.95–2.65)	2.30 (2.08–2.73)	2.15 (1.92–2.58)	.011
C22:5n-6	0.47 (0.39–0.59)	0.47 (0.38–0.59)	0.48 (0.39–0.61)	.964
Sum of n-6 PUFA	37.18 (34.05–39.44)	37.23 (34.83–39.40)	37.04 (33.28–39.46)	.365
C18:3n-3	0.13 (0.10–0.20)	0.13 (0.10–0.18)	0.14 (0.11–0.21)	.070
C20:5n-3	0.78 (0.52–1.28)	0.76 (0.49–1.14)	0.79 (0.57–1.31)	.263
C22:5n-3	1.72 (1.53–1.97)	1.74 (1.53–2.01)	1.70 (1.51–1.94)	.341
C22:6n-3	5.82 (5.02–6.99)	5.91 (5.10–7.15)	5.82 (4.93–6.74)	.365
Omega-3 index (C20:5n-3+C22:6n-3)	6.59 (5.63–8.11)	6.48 (5.65–8.31)	6.66 (5.54–8.01)	.672

Data are shown as median (Q1–Q3). SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.

^a P values for comparisons between new-onset type 2 diabetes and controls, obtained by Mann–Whitney test.

Table 3
Proportion of selected RBC fatty acids (% of total fatty acids) of study subjects by carotid plaque prevalence

	Total <i>trans</i> -C18:1	C18:3n-3	Omega-3 index (C20:5n-3+C22:6n-3)
Main outcome (carotid plaque)			
No (n=65)	1.17 (1.09–1.27)	0.15 (0.11–0.35)	6.74 (5.56–8.29)
Yes (n=132)	1.21 (1.10–1.31)	0.13 (0.10–0.17)*	6.51 (5.65–8.05)
Secondary outcomes			
Plaque ≥ 2.5 mm			
No (n=148)	1.18 (1.09–1.29)	0.14 (0.10–0.21)	6.61 (5.73–8.11)
Yes (n=49)	1.21 (1.12–1.31)	0.13 (0.10–0.16)	6.54 (5.32–8.17)
≥ 3 plaques			
No (n=145)	1.18 (1.09–1.29)	0.14 (0.10–0.25)	6.59 (5.65–8.01)
Yes (n=52)	1.19 (1.11–1.36)	0.13 (0.10–0.15)*	6.63 (5.57–8.85)
Plaque at internal carotid artery			
No (n=134)	1.17 (1.09–1.28)	0.14 (0.11–0.22)	6.80 (5.74–8.01)
Yes (n=63)	1.24 (1.12–1.36)*	0.12 (0.10–0.15)*	6.35 (5.40–8.88)

Data are shown as median (Q1–Q3).

* $P < .05$ for comparisons between groups, obtained by Mann–Whitney test.

carotid plaque, while RBC long-chain n-3 fatty acids were unrelated to plaque prevalence. Expectedly, age and male sex significantly related to plaque presence, while type 2 diabetes and smoking showed a trend. ALA showed a trend for lower prevalence of plaque ≥ 2.5 mm (Supplementary Fig. 2), while fully statistical significance was observed for lower prevalence of ≥ 3 plaques (Supplementary Fig. 3) and plaque at internal carotid artery (Supplementary Fig. 4). Increasing C18:1 TFA in RBC showed a trend for increased prevalence of ≥ 3 plaques (Supplementary Fig. 3), while relating significantly to an increased prevalence of plaque at internal carotid artery (Supplementary Fig. 4).

4. Discussion

In this cross-sectional study we investigated associations between the fatty acid composition of RBC membranes and advanced carotid atherosclerosis in patients with a new diagnosis of type 2 diabetes and controls matched for classical cardiovascular risk factors. We found that RBC enrichment in total C18:1 TFA, known to mirror intake of dietary TFA [13], was directly associated with the prevalence of carotid plaque, a surrogate marker of future cardiovascular events. In contrast,

a higher RBC proportion of ALA, the vegetable n-3 fatty acid, mainly supplied by walnuts in Mediterranean populations like the one herein examined, related to lower carotid plaque frequency.

The seminal work of Mensink and Katan [19] reporting the harmful effect of dietary TFA on serum lipoproteins prompted research on the causal role of these fatty acids in cardiovascular disease (reviewed in [6,20,21]). While C16:1n-7 *trans* exists exclusively in ruminant fats, C18:1 *trans*-isomers can be found in both partially hydrogenated oils and ruminant fats. Intake of industrially derived TFA has been consistently linked to a pro-atherogenic state. In contrast, either neutral or modest protective effects have been reported for TFA naturally present in beef and dairy products (reviewed in Ref. [5]), which intake is much lower than that of TFA from industrial origin [2]. This has prompted the recommendation of decreasing intake of TFA from all sources as the best strategy to promote cardiovascular health [7,21].

Short-term randomized clinical trials reported that dietary TFA triggers systemic inflammation, endothelial dysfunction and insulin resistance (reviewed in Ref. [22]). However, whether plaque formation is induced by TFA intake could only be tested by long-term randomized clinical trials, which would be unethical. Therefore, clinical data on dietary TFA and atheroma plaque must rely on epidemiological studies. It is difficult to accurately estimate fatty acid intake using traditional dietary questionnaires, since they are subject to reporting errors and databases are incomplete, in particular those on TFA. Because TFA cannot be endogenously synthesized, adipose tissue and/or circulating TFA are good biomarkers of dietary intake [13,14], yet their predictive value of coronary events remains controversial [13,23–28]. We focused on C18:1 TFA isomers because they are the most abundant TFA in the diet [2] and in blood [13,29]. Given the goal to limit consumption of all dietary TFAs regardless of the origin, instead of examining separately different TFA isomers, we used a chromatographic technique where all C18:1 TFA isomers, including species from both industrial and natural origin, elute into a single peak.

Recognizing that it is difficult to disentangle the individual contribution of C18:1 TFA and ALA on potential atheroma plaque build-up since they actually interplay, we provide novel clinical evidence in line with the deleterious effects of TFA. Our findings concur with those of Merchant and coworkers [12], who reported that intake of TFA, as assessed by food-frequency questionnaires, was associated with the mean IMT of all carotid segments in individuals from different geographical origins. We focused mainly on plaque presence (the hallmark of cardiovascular disease), given the increasing evidence that this variable has higher predictive value for future cardiovascular events than IMT [11]. In this regard, our results add to data from cross-sectional studies reporting that carotid plaque prevalence assessed by ultrasound directly relates to dietary intake of saturated fatty acids (palmitic and stearic acids) [30], and inversely to n-3 fatty acids, either from marine [17,30,31] from or plant origin [18,32]. Consistent with the latter, we found a significant inverse association between the RBC proportion of ALA and carotid plaque prevalence. Given that the main source of this fatty acid in similar populations is walnut consumption [18], this association may not only be attributable to ALA *per se* but also to other salutary bioactive components of the parent food, as occurs in nuts and all edible plant seeds.

Our study has limitations. First, the sample size was relatively small. The reason for a lack of a prespecified sample size is that this is a substudy using baseline data of a prospective study exploring changes of preclinical atherosclerosis in new-onset type 2 diabetes compared to matched controls, and ours was an exploratory study. Second, the sample is ethnically homogeneous and nearly 50% of our study population had type 2 diabetes, a reason why the results cannot be generalized to other populations. Finally, given the cross-sectional

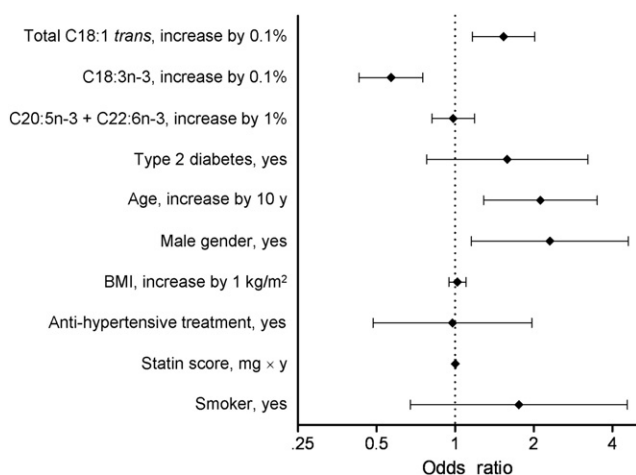


Fig. 1. Independent determinants of carotid plaque prevalence. Data are presented as adjusted point estimates with 95% confidence intervals (CIs) obtained by multiple logistic regression analysis. OR for total C18:1 *trans*: 1.532 (CI: 1.164–2.016; $P=.002$); OR for C18:3n-3: 0.568 (CI: 0.429–0.751; $P<.001$); OR for C20:5n-3+C22:6n-3: 0.983 (CI: 0.814–1.187; $P=.857$).

design of the study, we cannot exclude the possibility of residual confounding. The study also has strengths, such as the use of RBC fatty acid content as an objective and stable biomarker of long-term fatty acid intake and the inclusion of major confounders in multivariable analyses.

In conclusion, we report opposite direction in the association between RBC proportions of ALA (inverse) and total C18:1 TFA (direct) with carotid plaque presence, the ultrasound feature that best predicts future cardiovascular events. The interplay of both fatty acids precludes ascribing the individual contribution of total C18:1 TFA to atherosclerosis. Therefore, reducing TFA intake while increasing consumption of walnuts, a source of salutary bioactive compounds including ALA itself, might be a synergistic approach to delay atheroma plaque formation, thus contributing to cardiovascular risk prevention, the leading cause of mortality worldwide.

Statement of authorship

ASV and EO designed research; ZH, M. Cofán, M. Catalan, CC, MP, A-JA and RG conducted research; ASV analyzed data; ER, ASV and EO wrote the paper; EO had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

Disclosure

ER has received research funding from the California Walnut Commission, Sacramento, CA, USA, and is a nonpaid member of its Scientific Advisory Committee. The other authors report no conflicts.

Acknowledgments

This work would not have been possible without the help of the three primary care centers (CAPSE, CAP Borrell, Casanovas and Les Corts) involved in the study. CIBEROBN is an initiative of ISCIII, Spain.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.08.004>.

References

- [1] Mozaffarian D, Appel LJ, Van Horn L. Components of a cardioprotective diet: new insights. *Circulation* 2011;123:2870–91.
- [2] Michas G, Micha R, Zampelas A. Dietary fats and cardiovascular disease: putting together the pieces of a complicated puzzle. *Atherosclerosis* 2014;234:320–8.
- [3] Skeaff CM, Miller J. Dietary fat and coronary heart disease: summary of evidence from prospective cohort and randomised controlled trials. *Ann Nutr Metab* 2009;55:173–201.
- [4] Chowdhury R, Warnakula S, Kunutsor S, Crowe F, Ward HA, Johnson L, et al. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2014;160:398–406 [Erratum in: *Ann Intern Med* 2014;160:658].
- [5] Ganguly R, Pierce GN. The toxicity of dietary trans fats. *Food Chem Toxicol* 2015;78:170–6.
- [6] Mensink RP, Nestel P. Trans fatty acids and cardiovascular risk markers: does the source matter? *Curr Opin Lipidol* 2009;20:1–2.
- [7] Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al. European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR), ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J* 2012;33:1635–701 [Erratum in: *Eur Heart J* 2012;33:2126].
- [8] <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm451237.htm>. [accessed 09.06.2016].
- [9] Bassett CM, McCullough RS, Edel AL, Maddaford TG, Dibrov E, Blackwood DP, et al. Trans-fatty acids in the diet stimulate atherosclerosis. *Metabolism* 2009;58:1802–8.
- [10] Polak JF, Szklo M, Kronmal RA, Burke GL, Shea S, Zavodni AE, et al. The value of carotid artery plaque and intima-media thickness for incident cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e000087.
- [11] Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis. *Atherosclerosis* 2012;220:128–33.
- [12] Merchant AT, Kelemen LE, de Koning L, Lonn E, Vuksan V, Jacobs R, et al. SHARE and SHARE-AP investigators. Interrelation of saturated fat, trans fat, alcohol intake, and subclinical atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 2008;87:168–74.
- [13] Sun Q, Ma J, Campos H, Hankinson SE, Manson JE, Stampfer MJ, et al. A prospective study of trans fatty acids in erythrocytes and risk of coronary heart disease. *Circulation* 2007;115:1858–65.
- [14] Chajès V, Biessy C, Byrnes G, Deharveng G, Saadatian-Elahi M, Jenab M, et al. Ecological-level associations between highly processed food intakes and plasma phospholipid elaidic acid concentrations: results from a cross-sectional study within the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Nutr Cancer* 2011;63:1235–50.
- [15] Catalan M, Herreras Z, Pinyol M, Sala-Vila A, Amor AJ, de Groot E, et al. Prevalence by sex of preclinical carotid atherosclerosis in newly diagnosed type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2015;25:742–8.
- [16] 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;23:75–80.
- [17] Dai XW, Zhang B, Wang P, Chen CG, Chen YM, Su YX. Erythrocyte membrane n-3 fatty acid levels and carotid atherosclerosis in Chinese men and women. *Atherosclerosis* 2014;232:79–85.
- [18] Sala-Vila A, Cofán M, Núñez I, Gilabert R, Junyent M, Ros E. Carotid and femoral plaque burden is inversely associated with the α -linolenic acid proportion of serum phospholipids in Spanish subjects with primary dyslipidemia. *Atherosclerosis* 2011;214:209–14.
- [19] Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med* 1990;323:439–45.
- [20] Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2006;354:1601–13.
- [21] Lichtenstein AH. Dietary trans fatty acids and cardiovascular disease risk: past and present. *Curr Atheroscler Rep* 2014;16:433.
- [22] Micha R, Mozaffarian D. Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease and diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5:335–44.
- [23] Block RC, Harris WS, Reid KJ, Spertus JA. Omega-6 and trans fatty acids in blood cell membranes: a risk factor for acute coronary syndromes? *Am Heart J* 2008;156:1117–23.
- [24] Lemaitre RN, King IB, Raghunathan TE, Pearce RM, Weinmann S, Knopp RH, et al. Cell membrane trans-fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Circulation* 2002;105:697–701.
- [25] Wang Q, Imamura F, Lemaitre RN, Rimm EB, Wang M, King IB, et al. Plasma phospholipid trans-fatty acids levels, cardiovascular diseases, and total mortality: the Cardiovascular Health Study. *J Am Heart Assoc* 2014;3:e000914.
- [26] Roberts TL, Wood DA, Riemersma RA, Gallagher PJ, Lampe FC. Trans isomers of oleic and linoleic acids in adipose tissue and sudden cardiac death. *Lancet* 1995;345:278–82.
- [27] Lemaitre RN, King IB, Mozaffarian D, Sotoodehnia N, Rea TD, Kuller LH, et al. Plasma phospholipid trans fatty acids, fatal ischemic heart disease, and sudden cardiac death in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2006;114:209–15.
- [28] Kleber ME, Delgado GE, Lorkowski S, März W, von Schacky C. Trans-fatty acids and mortality in patients referred for coronary angiography: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Eur Heart J* 2016;37:1072–8.
- [29] Vesper HW, Kuiper HC, Mirel LB, Johnson CL, Pirkle JL. Levels of plasma trans-fatty acids in non-Hispanic white adults in the United States in 2000 and 2009. *JAMA* 2012;307:562–3.
- [30] Ebbesson SO, Roman MJ, Devereux RB, Kaufman D, Fabsitz RR, Maccluer JW, et al. Consumption of omega-3 fatty acids is not associated with a reduction in carotid atherosclerosis: the Genetics of Coronary Artery Disease in Alaska Natives study. *Atherosclerosis* 2008;199:346–53.
- [31] Yamada T, Strong JP, Ishii T, Ueno T, Koyama M, Wagayama H, et al. Atherosclerosis and omega-3 fatty acids in the populations of a fishing village and a farming village in Japan. *Atherosclerosis* 2000;153:469–81.
- [32] Djousse L, Folsom AR, Province MA, Hunt SC, Ellison RC, National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. Dietary linolenic acid and carotid atherosclerosis: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr* 2003;77:819–25.