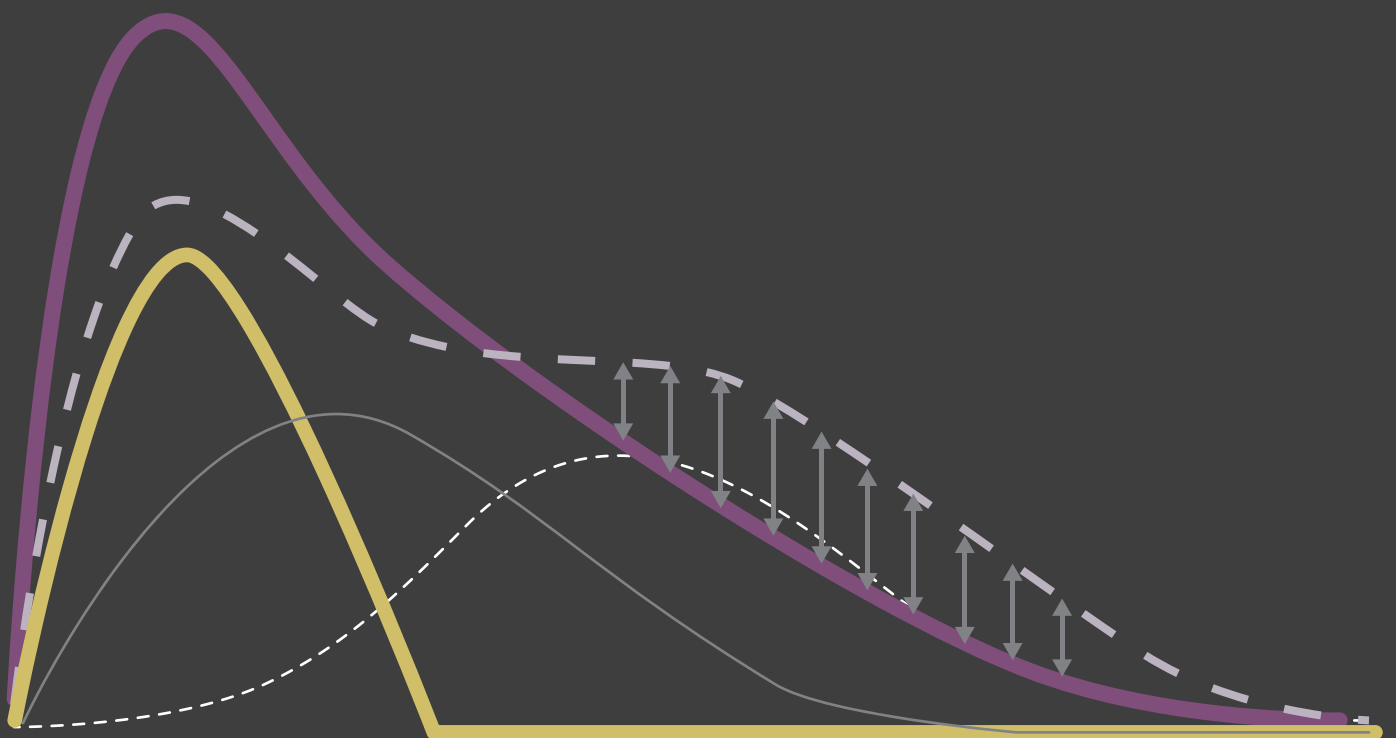


Diabetis mellitus tipus 1 i rigidesa arterial: avaluació no invasiva i mecanismes fisiopatològics implicats

Gemma Llauradó Cabot



UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

UAB

"... i el que compta és l'esforç de cada dia
compartit tenaçment amb els qui creuen
que cada gesta eixampla l'esperança,
que cap dia no es perd per als qui lluiten".

Miquel Martí i Pol

A l'Herminia i el Guillem, els meus pares

Índex

1. Agraïments.....	9
2. Abreviacions	13
3. Presentació de la tesis.....	17
4. Antecedents i justificació.....	21
4.1. Diabetis mellitus i malaltia cardiovascular.....	23
4.1.1. Epidemiologia de la malaltia cardiovascular.....	23
4.1.2. Factors de risc cardiovascular.....	24
4.2. Rigidesa arterial.....	36
4.2.1. Rigidesa arterial: Principis bàsics d'hemodinàmica.....	37
4.2.2. Rigidesa arterial: Mecanismes fisiopatològics.....	39
4.2.3. Rigidesa arterial: Aspectes metodològics.....	42
4.2.4. Rigidesa arterial: Aplicacions clíniques.....	49
4.2.5. Rigidesa arterial i diabetis mellitus tipus 1.....	53
4.3. Relació entre la rigidesa arterial i la inflamació sistèmica de baix grau i la disfunció endotelial.....	55
4.4. Justificació.....	57
5. Hipòtesis.....	59
6. Objectius.....	63
7. Mètodes.....	67
7.1. Disseny de l'estudi.....	69
7.2. Subjectes. Criteris d'inclusió i exclusió.....	69
7.3. Aspectes ètics.....	70
7.4. Avaluacions dels grups d'estudi.....	70
7.5. Anàlisi estadística.....	75
8. Resultats.....	79
8.1. Article 1: Llauradó G, Ceperuelo-Mallafre V, Vilardell C, Simó R, Freixenet N, Vendrell J, González-Clemente JM. Arterial stiffness is increased in patients with type 1 diabetes without cardiovascular disease. A potential role of low-grade inflammation. Diabetes Care 2012; 35(5): 1083-9.....	81

8.2. Article 2: Llauradó G, González-Clemente JM, Maymó-Masip E, Subías D, Vendrell J, Chacón MR. Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: relationship with cardiovascular risk factors, a case-control study. PLoS One 2012; 7(8): e43919.....	91
8.3. Article 3: Llauradó G, Ceperuelo-Mallafré V, Vilardell C, Simó R, Albert L, Berlanga E, Vendrell J, González-Clemente JM. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. Diabetes Metab 2013 May 2 (DOI: 10.1016/j.diabet.2013.03.006.....	101
9. Discussió.....	111
10. Conclusions.....	125
11. Bibliografia.....	129
12. Annexes.....	151
12.1. Annex 1: Llauradó G, Simó R, Villaplana M, Berlanga E, Vendrell J, González-Clemente JM. Can augmentation index substitute aortic pulse wave velocity in the assessment of central arterial stiffness in type 1 diabetes? Acta Diabetol 2012;49(Suppl 1):S253-7.....	155
12.2. Annex 2: Llauradó G, Ceperuelo-Mallafré V, Vilardell C, Simó R, Gil P, Cano A, Vendrell J, González-Clemente JM. Skin accumulation of advanced glycation end products is associated with arterial stiffness in type 1 diabetes: a case-control study. En revisió.....	163

1. Agraïments

1. Agraïments

Al Dr. José Miguel González Clemente, director d'aquest projecte, per haver confiat en mi per portar a terme aquest treball, per haver compartit amb mi el seu coneixement i rigor científic, per transmetre'm el seu interès per la recerca i per ser un exemple d'esforç i superació personal.

A la Dra. Carme Vilardell, per haver estat codirectora d'aquest projecte, la meva resident gran i amiga. Per la seva ajuda i suport incondicionals, per tots els seus consells durant aquest temps i per la seva grandiosa bondat i generositat.

Al Dr. Rafael Simó, codirector d'aquest projecte, per la seva ajuda, les seves aportacions i la seva revisió crítica d'aquest treball.

Al Dr. Joan Vendrell, per, tot i no ser-ho, haver-se convertit en el quart director d'aquesta tesi, per les seves dosis d'optimisme i per haver confiat en mi i haver-me donat l'oportunitat de començar noves etapes professionals.

A tots els pacients i voluntaris que van participar en aquest projecte, sense els quals aquest treball no hagués estat possible.

A tots els membres del Servei d'Endocrinologia i Nutrició del l'Hospital de Sabadell, als presents i també als que en algun moment o altre en van formar part en el passat, perquè de tots i cadascun d'ells n'he après i tots m'han fet créixer com a professional i com a persona durant tots aquests anys.

A la Rocío Pareja, per la seva ajuda tècnica en la realització de les extraccions i processament de les mostres i per totes les hores de feina que hem compartit durant tot aquest temps.

A la Núria Freixenet, per la seva amistat, els seus consells i suport i per ser tot un exemple de fortalesa.

A tots els membres del grup de recerca de l'Hospital Joan XXIII de Tarragona per la seva ajuda en les determinacions de laboratori, especialment a la Vicky, la Cristina, la Mati, l'Elsa, l'Elena i la Vero, per haver col·laborat en algun moment d'aquest procés. Al Lluís i la Míriam, pels seus viatges al Taulí per recollir mostres i per la seva acollida des de que he arribat.

A la resta de membres de la Secció d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Joan XXIII de Tarragona per la seva gran rebuda i per haver-me facilitat la integració des de la meva arribada.

1. Agraïments

Als membres del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Germans Trias i Pujol i als membres de la Unitat d'Endocrinologia i Nutrició i del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Dos de Maig, per haver comptat amb mi i haver-me facilitat compaginar l'assistència clínica als seus respectius centres amb els viatges al Taulí que m'han permès la finalització d'aquest projecte.

Al Stephen Kelly, per la seva ajuda en les correccions a l'anglès de tots els articles que formen part d'aquest treball, i a la Neus Cotonat, per la seva ajuda amb el meu francès rovellat.

Al Sr. Joan Carles Oliva, de la Fundació Parc Taulí, per la seva ajuda en l'anàlisi estadístic d'aquest treball.

A les meves nenes del Taulí: Sol, Lluï, Sonia, Marta, Cande i M^a Àngels. Per estar allà, en els bons i en els mals moments, durant tots aquests anys i per totes les coses que hem pogut compartir durant el dia a dia de la residència. Us trobo molt a faltar!

A l'Àlex i la Lara, per la vostra ajuda en el disseny gràfic d'aquest treball, de forma totalment desinteressada i per la vostra amistat. Encantada de tenir-vos com a veïns i poder fer vermuts de barri!

A la Rosa, el Ruben, la Raquel, el Josep i el Martí, per compartir alegries i decepcions, dinars, berenars, sopars, concerts i càlids vespres verds, per ser sempre allà, inclús quan ens falla la tecnologia!

I per últim i més important, als meus pares pel seu suport incondicional i la seva paciència durant tots aquests anys. Per deixar-me ser qui sóc, simplement gràcies!

2. Abreviaciones

2. Abreviacions

CACTI: *Coronary Arterial Calcification in Type 1 Diabetes*

DCCT: *Diabetes Control and Complications Trial*

DM: diabetis mellitus

DM1: diabetis mellitus tipus 1

DM2: diabetis mellitus tipus 2

ECG: electrocardiograma

EDIC: *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*

eGDR: taxa estimada d'eliminació de glucosa

ET-1: endotelina-1

FMD: *flow-mediated dilatation*

FvW: factor de von Willebrand

HbA1c: hemoglobina glicosilada

HTA: hipertensió arterial

IA: índex d'augment

IC95%: interval de confiança del 95%

ICAM-1: molècula d'adhesió intercel·lular 1

IL-6: interleucina 6

IMC: índex de massa corporal

Índex RH-PAT: índex d'hiperèmia reactiva mesurat mitjançant tonometria arterial perifèrica

IRC: insuficiència renal crònica

ISBG: inflamació sistèmica de baix grau

MEC: matriu extracel·lular

MMPs: metal·loproteases de la matriu

ON: òxid nítric

PA: pressió arterial

PAD: pressió arterial diastòlica

PAS: pressió arterial sistòlica

PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen-1

PCR: proteïna C reactiva

2. Abreviacions

PCRus: proteïna C reactiva ultrasensible

PGAs: productes de glicació avançada

Pittsburgh EDC: *Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications*

PP: pressió del pols

PPc: pressió del pols central

PSc: pressió sistòlica central

RA: rigidesa arterial

sCD163: forma soluble del CD163

sR1TNF α : receptor soluble tipus 1 del factor de necrosi tumoral alfa

sR2TNF α : receptor soluble tipus 2 del factor de necrosi tumoral alfa

sTWEAK: forma soluble del TWEAK

t-PA: activador tissular del plasminogen

TNF α : factor de necrosi tumoral alfa

TWEAK: *tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*

VCAM-1: molècula d'adhesió cel·lular vascular 1

VOP: velocitat de l'ona del pols

VOPa: velocitat de l'ona del pols aòrtica

3. Presentació

3. Presentació de la tesi

Aquesta tesi es presenta en forma de compendi de publicacions segons la normativa vigent de la Comissió d'Estudis de Postgrau de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Es centra en l'estudi de la rigidesa arterial com a signe d'arteriosclerosi preclínica en la diabetis mellitus tipus 1 i en concret, en l'estudi dels mecanismes fisiopatològics implicats en el seu increment. Els resultats obtinguts en població amb diabetis mellitus tipus 1 es comparen amb els obtinguts en un grup de controls sans. El seu nucli principal correspon a tres articles que han estat acceptats per publicació en revistes internacionals. A més a més, d'aquest treball n'han derivat dos articles més, que s'adjunten en l'apartat d'annexes.

Part del projecte ha estat finançat per l'Associació Catalana de Diabetis (Ajuts en Recerca Gonçal Lloveras i Vallès 2008), la Fundació Marató de TV3 (Projecte N^o 081410), el *Fondo de Investigación Sanitaria* (PS09/01360), *Instituto de Salud Carlos III*, i per la Beca Taulí Recerca – Ajuts a la Iniciació en Recerca 2010 de la Fundació Parc Taulí (N^o 2011517). La doctoranda també ha rebut el recolzament del *Instituto de Salud Carlos III* mitjançant un contracte Rio Hortega (subprograma estatal de formació).

4. Antecedents i justificació

4. Antecedents i justificació

4.1. Diabetis mellitus tipus 1 i malaltia cardiovascular

4.1.1. Epidemiologia de la malaltia cardiovascular

La diabetis mellitus tipus 1 (DM1) representa entre el 5-10% dels casos de diabetis mellitus (DM). Es caracteritza fonamentalment per un dèficit d'insulina com a conseqüència d'una destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques. Es presenta habitualment en la infància o l'adolescència, podent-se diagnosticar també durant l'edat adulta. La DM1 s'associa al desenvolupament de complicacions cròniques, tant micro com macroangiopàtiques, que condicionen una elevada morbi-mortalitat. La incidència de DM1 s'ha incrementat en els últims anys, amb un augment del 2 al 4% per any a nivell mundial. Aquesta incidència pot variar en funció de la zona geogràfica, l'edat, el sexe i la història familiar, existint també factors ambientals que incrementen el seu risc (1).

La malaltia cardiovascular constitueix la major causa de morbi-mortalitat en la DM1. El risc relatiu de malaltia cardiovascular en la DM1 és 10 vegades superior respecte el de la població no diabètica (2; 3), especialment en dones, sent inclús superior al de la diabetis mellitus tipus 2 (DM2) (4). La incidència de malaltia coronària és d'aproximadament 1-2% per any, sent la primera causa de mortalitat (5; 6). Abans dels 55 anys d'edat, un 35% de totes les morts en persones amb DM1 haurien estat per malaltia cardiovascular (especialment per malaltia coronària), xifres que contrasten amb les de la població sense DM (8% pels homes i 4% per les dones) (4). Els resultats del seguiment a 12 anys de l'estudi *Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications (EDC)* van indicar que la incidència d'episodis majors per malaltia arterial coronària era del 0,98% per any en joves amb DM1 (edat entre 28-38 anys i durada entre 20-30 anys) (7). Altres estudis epidemiològics mostren que les taxes d'episodis cardiovasculars majors en persones amb DM1 serien superiors al 1% anual a partir dels 45 anys i superiors a un 3% anual a partir dels 55 anys (8). De fet, la DM1 s'associa a un marcat increment de mortalitat, amb ràtios de mortalitat estandarditzades per malaltia arterial coronària de 11,8 i 44,8 per homes i dones entre 20-29 anys respectivament i de 8,0 i 41,6 per homes i dones entre 30-39 anys respectivament (9). Per altra banda, tot i que la nefropatia s'ha associat amb el risc cardiovascular en la DM1 (10) i que ha disminuït la seva prevalença en els últims anys,

això no s'ha traduït en un descens de la morbiditat o mortalitat per malaltia coronària en la DM1 (7).

Estudis clínics i epidemiològics han posat en relleu aspectes específics que caracteritzen el procés arterioscleròtic en la DM1 en relació a les diferències de gènere, l'edat d'inici i la gravetat de la malaltia. En primer lloc, el risc de mortalitat per malaltia arterial coronària és comparable en homes i dones amb DM1, reflectint la pèrdua de la protecció per sexe present en les dones premenopàusiques (8-11). Les dones amb DM1 presenten entre 9 i 29 vegades més possibilitats de morir per malaltia cardiovascular respecte les dones sense DM; mentre que el risc en homes es troba incrementat entre 4 i 9 vegades (4; 9), desapareixent les diferències existents en la població general entre ambdós sexes (12). En segon lloc, el procés arterioscleròtic s'inicia de forma més precoç en comparació amb la població general (13). En nens amb DM1 ja s'objectiva un increment del gruix de la íntima-mèdia, tant a nivell aòrtic com carotídi, respecte la població general (14; 15). Per últim, la malaltia cardiovascular acostuma a ser més greu en el moment del diagnòstic, probablement pel fet que s'inicia més precoçment i es desenvolupa de forma asimptomàtica (16).

4.1.2. Factors de risc cardiovascular

4.1.2.1. Factors de risc cardiovascular clàssics i no clàssics

L'afectació arterioscleròtica subjacent associada a la DM és més precoç, difusa i presenta un pitjor pronòstic respecte a la població general (10). Des de fa temps, es coneixen una sèrie de factors de risc, anomenats factors de risc cardiovascular clàssics, que prediuen el desenvolupament de la malaltia cardiovascular (Taula 1). De totes maneres, la capacitat de predicció d'episodis cardiovasculars per aquests factors és molt limitada, tant en població general com en població amb DM (17-19). Per aquest motiu, en els últims anys s'han descrit una sèrie de nous factors de risc cardiovascular, que es coneixen com a "no clàssics o emergents"; alguns d'ells apareixen de forma resumida en la Taula 1. Tot i l'aparició d'aquests nous factors no clàssics, la nostra capacitat de predicció d'episodis cardiovasculars, tant en població general com en població amb DM, segueix sent extremadament limitada a nivell individual. A continuació, es realitzarà una breu revisió dels factors de risc cardiovascular clàssics i

ens centrarem en els no clàssics que s'han estudiat en el present treball: la inflamació sistèmica de baix grau (ISBG) i la disfunció endotelial.

Taula 1. Factors de risc cardiovascular

Clàssics	No clàssics
Dieta, sedentarisme	Estat protrombòtic i alteració de la fibrinòlisi
Tabaquisme	Estrès oxidatiu
Obesitat	Disfunció endotelial
Hipertensió arterial	Inflamació sistèmica de baix grau
Dislipèmia	Resistència a la insulina
Hiperoglucèmia	Productes de glicació avançada

4.1.2.2. Factors de risc cardiovascular clàssics

Dieta, activitat física i tabac

La dieta és un dels factors modificables i està associada a la resta de factors de risc cardiovascular. Les recomanacions dietètiques per prevenir tant la DM com la malaltia cardiovascular inclouen una reducció del consum de greixos saturats i un augment del consum de fibra (20). Diversos estudis han objectivat que el consum de fibra s'associa a una reducció de la mortalitat cardiovascular en els individus amb DM1 (21; 22).

L'exercici físic aporta efectes beneficiosos sobre la salut i el risc cardiovascular. En la DM1, l'increment de l'activitat física ha demostrat ser beneficiosa pel que fa al perfil cardiovascular, associant-se a una millora del control metabòlic, del control del pes, de les xifres de pressió arterial (PA) i del perfil lipídic (23; 24). En l'*EURODIAB Prospective Complications Study* es va objectivar una associació inversa entre el grau d'activitat física i la incidència de malaltia cardiovascular (tot i que només en dones), així com una associació inversa marginal entre l'activitat física i la mortalitat en tots dos sexes (25). En l'estudi *FinnDiane*, l'exercici físic es va associar també de forma inversa a l'increment del risc cardiovascular (26).

El consum de tabac també és un conegut factor associat a l'increment del risc cardiovascular tant en població general com en la DM. En l'estudi *Coronary Arterial Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI)* es va objectivar una associació entre el consum

de tabac i la presència de calcificacions coronàries en un grup de persones amb DM1 (27).

Obesitat i síndrome metabòlica

Diversos estudis epidemiològics han demostrat que l'obesitat és un factor de risc establert per malaltia cardiovascular, fet que no és sorprenent, donada la freqüent associació de l'obesitat amb la hipertensió arterial (HTA), la dislipèmia i la resistència a la insulina. En un tall transversal de l'*EURODIAB Prospective Complications Study*, les dones amb DM1 i major índex de massa corporal (IMC) i els homes amb major índex cintura-maluc presentaven una prevalença major de malaltia cardiovascular (28). En l'estudi *CACTI*, la presència d'obesitat també es va associar a la presència i progressió de calci arterial coronari, de forma independent de la resta de factors de risc cardiovascular (29).

A més a més, s'ha descrit que la síndrome metabòlica estaria present en un 8-40% de les persones amb DM1, depenent de la població estudiada i de la definició de síndrome metabòlica emprada (30-33). L'increment del risc cardiovascular en aquest cas (individus amb DM1 i síndrome metabòlica) vindria definit per la conjunció dels diversos factors de risc (obesitat, dislipèmia i HTA) (31). La síndrome metabòlica s'ha associat a un augment de prevalença d'ictus, arteriopatia perifèrica i retinopatia greu (32), així com a un increment del risc d'episodis cardiovasculars dues vegades superior (utilitzant la definició de la *World Health Organization*) (34).

Per altra banda, el tractament intensiu amb insulina s'associa a un increment de pes que s'acompanyaria de la presència de components de la síndrome metabòlica (35). Tot i això, en el *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)* es va observar que, tot i que l'increment de pes associat al tractament intensiu s'associava a un increment dels components de la síndrome metabòlica, aquest fet no es traduïa en un major risc cardiovascular (36). Per tant, en aquest cas semblaria que els beneficis d'un millor control glucèmic compensarien els riscos associats a l'increment de pes (36).

Hipertensió arterial

La prevalença d'HTA és aproximadament el doble en persones amb DM en comparació amb la població general; podent presentar HTA primària o bé secundària a

malaltia renal (37). La prevalença d'HTA en un tall transversal incloent 3.250 individus amb DM1 en l'*EURODIAB Prospective Complications Study* va ser del 24% (38). El risc per malaltia cardiovascular incrementa substancialment quan la DM i la HTA coexisteixen (39). Els valors elevats tant de pressió arterial sistòlica (PAS) com pressió arterial diastòlica (PAD) s'han associat a un increment del risc de malaltia arterial coronària i de mortalitat cardiovascular en els individus amb DM1 (40).

Dislipèmia

Les alteracions en el perfil lipídic acostumen a ser menys aparents en les persones amb DM1, ja que les concentracions de colesterol LDL solen ser similars i les de colesterol HDL poden ser fins i tot més elevades respecte la població general. No obstant, els individus amb DM1 presenten anormalitats qualitatives com la presència de partícules de colesterol LDL més denses, petites i aterogèniques que afavoririen l'aparició de complicacions cardiovasculars (41). Diversos estudis demostren que les concentracions de lípids aterogènics prediuen de forma independent la malaltia cardiovascular en la DM1 (42; 43).

Hiperoglucèmia, hipoglucèmia i complicacions microvasculars

Fins fa relativament poc, no s'havia demostrat cap clara associació entre la hiperoglucèmia i el desenvolupament de les complicacions macroangiopàtiques. En els resultats del seguiment a 8 anys dels individus inclosos en l'*EURODIAB Prospective Complications Study*, l'hemoglobina glicosilada (HbA1c) no es va associar a la presència de malaltia arterial coronària després de l'ajust per la resta de factors de risc cardiovascular (6). Els resultats del seguiment a 10 anys de l'estudi *Pittsburgh EDC* tampoc van observar que el control glucèmic s'associés a la incidència de malaltia arterial coronària (5). Aquests resultats contrasten amb d'altres estudis publicats més recentment.

El resultat més importants provenen de l'estudi *DCCT*. En l'estudi inicial (seguiment mitjà de 6,5 anys), tot i que si que es va demostrar una reducció de les complicacions microvasculars en els individus inclosos en el grup de tractament intensiu, la reducció d'un 41% del risc relatiu de complicacions macrovasculars no va resultar estadísticament significativa (44). No obstant, en el seguiment posterior d'una

4. Antecedents i justificació

part dels participants inicials del DCCT en l'estudi *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)* (seguiment mitjà de 17 anys), es va observar una clara reducció tant de les complicacions micro com macroangiopàtiques associades al tractament intensiu. El grup de tractament intensiu es va associar a una reducció del 42% del risc per qualsevol episodi cardiovascular i del 57% del risc d'episodis cardiovasculars majors (infart de miocardi, ictus o mort per malaltia coronària), tot i haver-se igualat el control glucèmic entre els dos grups després de la finalització del DCCT (45). No obstant, tot i que gran part del benefici seria atribuïble al millor control glucèmic durant el DCCT, el control de la resta de factors de risc (lípidis i PA) també hi hauria contribuït (46).

Altres estudis també han aportat resultats que recolzarien la relació entre la hiperglucèmia i la malaltia cardiovascular en la DM1. Un metaanàlisi publicat l'any 2006, que inclou el resultat de 8 assajos clínics aleatoritzats que avaluen l'efecte del tractament intensiu vs. convencional, amb un total de 1.800 individus amb DM1, va objectivar que la incidència total d'episodis cardiovasculars era del 0,38 (interval de confiança del 95% (IC95% 0,26-0,56) (47). En el seguiment a 20 anys de la cohort inclosa en l'estudi *Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR)* es va observar que un augment de les concentracions d'HbA1c s'associaven a un increment significatiu de mortalitat cardiovascular i mortalitat total (comparant els individus en el quartil més alt vs. el més baix d'HbA1c) (48). Per últim, en el seguiment a 16 anys de la cohort inclosa en l'estudi *Pittsburgh EDC*, tot i que inicialment no s'havia objectivat cap relació entre els valors d'HbA1c i la malaltia arterial coronària, es va observar que un descens d'1% dels valors d'HbA1c s'associava a un descens d'un 23% del risc de malaltia arterial coronària (49). Per tat, tenint en compte l'ús de diferents mesures per avaluar el control glucèmic i amb un seguiment més llarg, la relació entre la glucèmia i el risc cardiovascular en la DM1 hauria quedat ben establerta.

Recentment, s'ha centrat també l'atenció en el paper de la hipoglucèmia en les complicacions macroangiopàtiques. La hipoglucèmia desencadena una sèrie d'efectes fisiològics que tindrien repercussió a nivell cardiovascular. En la hipoglucèmia aguda, s'incrementa la freqüència cardíaca i la pressió arterial sistòlica, augmenta el cabal cardíac i la contractilitat del miocardi, incrementant el grau d'estrès del sistema

cardiovascular (50). La hipoglucèmia s'ha associat a una disminució de la perfusió miocardiaca que podria afavorir la isquèmia (50; 51). A més a més, pot induir canvis del sistema elèctric del cor, incloent l'allargament de l'interval QT (52; 53) i un alentiment de la repolarització, podent causar canvis del segment ST (54). Episodis repetits d'hipoglucèmia s'han associat a marcadors d'arteriosclerosi preclínica en persones amb DM1 (55). No obstant, estudis prospectius no han demostrat que els episodis repetits d'hipoglucèmia (greu) s'associïn a una major incidència d'episodis cardiovasculars (56). Probablement les diferències entre la definició d'hipoglucèmia emprada (inclusió de les hipoglucèmies no greus vs. greus) i els mètodes de registre utilitzats (registre de les hipoglucèmies mitjançant qüestionaris vs. monitorització continua de glucosa) justifiquin aquestes divergències. Probablement facin falta més estudis per aclarir el paper que juga la hipoglucèmia en l'increment de risc cardiovascular de les persones amb DM1.

La presència de complicacions microangiopàtiques també s'ha associat a la malaltia cardiovascular. Tot i que no es poden considerar un factor de risc clàssic, si que es consideren com un factor de risc específic de la DM. Els individus amb DM1 i proteïnúria presenten un increment del risc de mortalitat coronària entre 15 i 37 vegades superior en comparació amb aquells sense proteïnúria, en què el risc estaria entre 3 i 4 vegades més en comparació amb població general (4; 10). En el seguiment a 7 anys dels individus de l'*EURODIAB Prospective Complications Study*, es va observar que la nefropatia s'associava a un augment de risc de malaltia arterial coronària (6) i a mortalitat total (28). Les ràtios de mortalitat total estandarditzades dels individus inclosos en l'estudi *FinnDiane* als 7 anys de seguiment van ser del 2,8, 9,2 i 18,3 vegades superiors per aquells individus amb microalbuminúria, macroalbuminúria i insuficiència renal crònica (IRC) terminal, respectivament (57). La presència de retinopatia diabètica també s'ha associat a un major risc d'episodis i mortalitat cardiovascular. En un metaanàlisi en el què es van incloure 4 estudis amb un total de 4.362 persones amb DM1, els individus amb retinopatia diabètica presentaven una *odds ratio* per episodis cardiovasculars i/o mortalitat total d'un 4,1 (IC95% 1,50-11,18) en comparació amb els individus sense retinopatia (58). Per últim, la presència de neuropatia també s'ha associat a la malaltia cardiovascular. En el seguiment a 7 anys dels individus de l'*EURODIAB Prospective Complications Study*, es va observar que la

neuropatia autonòmica s'associava a un increment de la mortalitat total (28). En un estudi del grup del *Steno Diabetes Center* es va objectivar que la combinació de la disminució de la variabilitat de la freqüència cardíaca i la prolongació del interval QT corregit s'associaven a un increment del risc cardiovascular de forma independent a la resta de factors de risc clàssics (59). No obstant, la relació temporal i causal entre les complicacions microvasculars i la malaltia coronària està encara per resoldre. Recentment s'ha suggerit que ambdues compartirien factors de risc que afavoririen el seu desenvolupament de forma paral·lela. A més a més, tot i haver disminuït la prevalença de les complicacions microvasculars en els últims anys, això no s'ha traduït en un descens de la morbiditat o mortalitat per malaltia coronària en la DM1 (7), i el risc de malaltia cardiovascular continua estant incrementat tot i no presentar complicacions microangiopàtiques.

4.1.2.3. Factors de risc cardiovascular no clàssics

Inflamació sistèmica de baix grau

En els últims anys s'ha demostrat que la ISBG representa un paper important en el desenvolupament de l'aterosclerosi així com en les manifestacions clíniques derivades d'aquestes. Els marcadors d'ISBG es troben augmentats tant en aquells individus amb factors de risc cardiovascular presents sense malaltia cardiovascular establerta com en aquells que ja la presenten (60). Diversos estudis han demostrat que els marcadors d'ISBG són predictors independents d'episodis cardiovasculars (60).

La ISBG també està incrementada en la DM i s'ha associat a l'inici i la progressió de les complicacions cròniques (61). La ISBG s'ha associat a la presència d'un perfil cardiovascular més advers (62), així com a la presència de complicacions micro i macroangiopàtiques en els individus amb DM1 (61). Estudis prospectius han demostrat el valor predictiu de la ISBG en el desenvolupament de complicacions cròniques de la DM (63).

Els mecanismes pels quals podem trobar un augment d'ISBG en la DM són diversos (64). La hiperglucèmia pròpia de la malaltia conduiria a un augment de l'estrès oxidatiu i a una major formació de productes de glicació avançada (PGAs), els quals afavoririen l'alliberació de citocines proinflamatòries, principalment per part dels macròfags, que conduirien a l'estat d'ISBG que caracteritza la malaltia. La resta de

factors de risc associats a la malaltia (com per exemple l'obesitat, la HTA, la dislipèmia i la resistència a la insulina) contribuirien també al seu manteniment (64).

Citocines

Les citocines representen un grup complex de molècules capaces de provocar diferents efectes a nivell cel·lular depenent del tipus de cèl·lula, del moment d'actuació i del context en què estiguin expressades. Aquestes molècules poden compartir els seus receptors i tenen la capacitat d'actuar de forma sinèrgica. Les citocines es classifiquen en funció de la seva acció pro- o antiinflamatòria (65).

La proteïna C-reactiva (PCR) és una proteïna de 118-KDa que se sintetitza a nivell hepàtic en resposta a l'estímul d'altres citocines proinflamatòries (66). La proteïna C reactiva ultrasensible (PCRus) es considera actualment un marcador de risc cardiovascular i s'ha implicat en el desenvolupament i la progressió de l'aterosclerosi, sent actualment la proteïna d'ISBG més estudiada en aquest aspecte. Aquesta proteïna és un predictor independent d'episodis cardiovasculars i de mortalitat cardiovascular (67-69).

Entre les citocines proinflamatòries primàries, la interleucina 6 (IL-6) i el factor de necrosi tumoral alfa (TNF α), són els principals inductors de la síntesi hepàtica de PCRus (70). La IL-6 procedeix principalment del teixit adipós. Circula com a una proteïna glicosilada d'entre 22 i 27kDa (71). Actua sobre la proliferació cel·lular, la permeabilitat de les cèl·lules endotelials i la producció de proteïnes de la matriu extracel·lular (MEC) (65). El TNF α és una altra citocina proinflamatòria que deriva de les cèl·lules endotelials i de múscul llis, així com dels macròfags (60). S'expressa com una proteïna transmembrana de 26kDa. La seva part extracel·lular es pot fragmentar donant lloc a una proteïna soluble biològicament activa de 17kDa (72). La seva funció principal és la regulació de les cèl·lules del sistema immunitari. Es creu que les concentracions plasmàtiques de la forma soluble dels seus receptors (receptors solubles 1 i 2 del TNF α (sR1TNF α i sR2TNF α)) reflectirien l'activació del sistema TNF α millor que no pas la mesura del TNF α pròpiament (73). Tot i que existeixen menys estudis en comparació amb la PCRus, tant la IL-6 com el TNF α també s'han associat a la predicció d'episodis cardiovasculars (74) (75; 76).

TWEAK i CD163

El *tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* (TWEAK) és un membre, descrit més recentment, de la superfamília del TNF α (77). S'expressa inicialment en forma de proteïna transmembrana de tipus II (30kD). No obstant, també el podem trobar en la seva forma soluble (sTWEAK) (18kD), com a resultat de la proteòlisi de TWEAK, actuant com a una citocina. El TWEAK realitza les seves funcions a través de la unió amb el seu receptor, el factor induïble de creixement de fibroblasts 14 (TWEAK-R/Fn14). El TWEAK s'expressa en múltiples teixits a concentracions relativament altes com per exemple el cor, el pulmó, el cervell, l'intestí, el pàncrees, el múscul esquelètic, l'ovari i a nivell vascular, i en concentracions més baixes a nivell de ronyó i fetge. Per contra, l'expressió del seu receptor és habitualment baixa en la majoria de teixits en condicions de normalitat. Presenta múltiples funcions biològiques, incloent l'estimulació del creixement cel·lular i l'angiogènesi, la inducció de la inflamació i, en determinades condicions, l'estimulació de l'apoptosi (77). El TWEAK induïx la producció de citocines proinflamatòries, així com la proliferació i migració de les cèl·lules presents a nivell de la placa d'ateroma i l'increment de l'expressió de metal·loproteases que degraden la MEC (77). No obstant, s'han descrit nivells plasmàtics de sTWEAK disminuïts en persones amb aterosclerosi carotídia (78), malaltia arterial coronària i malaltia arterial perifèrica (79; 80) o en persones amb malalties associades a un augment del risc cardiovascular com la DM2 o la IRC terminal (81). En estudis prospectius les concentracions sèriques de sTWEAK han demostrat ser un predictor independent de mortalitat total en persones amb insuficiència cardíaca crònica d'origen no isquèmic (82). Addicionalment, un descens de les concentracions de sTWEAK s'han associat a la predicció d'episodis cardiovasculars en persones amb IRC (83) i malaltia arterial perifèrica (84). Contràriament, un augment de les concentracions de sTWEAK s'han associat a la predicció de resultats adversos a curt termini (30 dies posteriors) en individus amb infart agut de miocardi amb elevació del ST (85) i amb mortalitat cardiovascular i mortalitat total en persones amb IRC en hemodiàlisi (86).

El CD163 es considera un nou potencial *scavenger receptor* del TWEAK (87). Prèviament s'havia identificat com a un receptor encarregat de la recaptació dels complexos haptoglobina-hemoglobina i com a potent antioxidant dins del

metabolisme de l'hemoglobina (88). En condicions de normalitat, trobem la seva forma soluble (sCD163), que es genera a partir de la proteòlisi del CD163 localitzat a la membrana de les cèl·lules (89). Actualment, aquest receptor està reconegut com un immunomodulador de la placa d'ateroma, amb propietats antiinflamatòries i antiaterogèniques (90). S'han descrit un augment dels nivells de sCD163 en persones amb aterosclerosi (91; 92) o amb altres malalties que l'afavoreixen com per exemple la DM2 (93).

Disfunció endotelial

Funció i disfunció endotelial

L'endoteli està format per una monocapa cel·lular, biològicament activa, que cobreix la superfície més interna dels vasos sanguinis (94). L'endoteli es considera un òrgan endocrí, paracrí i autocrí, l'alteració del qual representa un esdeveniment crític per a l'inici de l'arteriosclerosi. S'encarrega de regular el to vascular, la permeabilitat, la regulació entre la coagulació i la fibrinòlisi, la composició de la matriu subendotelial, l'adhesió i extravasació de leucòcits i l'activitat inflamatòria de la paret vascular (95). Per dur a terme aquestes funcions produeix una sèrie de components de la MEC, així com una sèrie de mediadors incloent l'òxid nítric (ON), prostanoides, endotelina-1 (ET-1), angiotensina-II, activador tissular del plasminogen (t-PA), inhibidor de l'activador del plasminogen-1 (PAI-1), factor de von Willebrand (FvW), molècules d'adhesió (com la molècula d'adhesió intercel·lular 1 (ICAM-1) i la molècula d'adhesió cel·lular vascular 1 (VCAM-1)) i citocines. La producció d'aquests components s'acostuma a produir com a resposta a determinats estímuls, tant físics com químics (96). En condicions de normalitat, l'endoteli disminueix el to vascular, limita l'adhesió de leucòcits i l'activitat inflamatòria de la paret del vas, manté la permeabilitat vascular a nutrients, hormones i altres macromolècules i als leucòcits, inhibeix l'adhesió i agregació plaquetària, limita l'activació de la cascada de coagulació i regula la fibrinòlisi (95).

El dany a l'endoteli pot causar disfunció endotelial. Es considera que existeix disfunció endotelial quan les seves propietats, ja sigui en estat basal o post-estimulació, es troben alterades. Aquestes alteracions no han d'ocórrer necessàriament de forma simultània i poden diferir en funció de la naturalesa de l'insult, així com dependre de propietats intrínseques de l'endoteli (95). La disfunció

4. Antecedents i justificació

endotelial juga un paper important no només en l'inici de l'aterosclerosi, sinó que també pot contribuir a la progressió de les seves lesions i a l'aparició de complicacions clíniques posteriors.

Mètodes de mesura de la funció endotelial

La disfunció endotelial no es pot mesurar de forma directa en humans. No obstant, es pot estimar de forma indirecta a través de la mesura de la vasodilatació dependent d'endoteli i a través de diversos marcadors sèrics (Taula 2) (95). Estudis prospectius han demostrat que existeix una bona correlació entre l'alteració de la vasodilatació dependent d'endoteli i l'increment dels marcadors sèrics (97).

Taula 2. Mesures de disfunció endotelial (95)

↓ Vasodilatació dependent d'endoteli	disminució de la producció de substàncies vasodilatadores (òxid nítric) o ↑ vasoconstrictors.
↑ Endotelina-1	↑ producció de vasoconstrictors
↑ FvW	↑ activitat protrombòtica i procoagulant
↑ sTrombomodulina	↓ activitat anticoagulant
↑ tPA i PAI-1	↓ activitat profibrinolítica
↑ sE-selectina	↑ adhesió i permeabilitat
↑ ICAM-1	activació de la inflamació
↑ VCAM-1	↑ adhesió i permeabilitat
↑ col·lagen IV	alteració de la síntesis de la MEC

FvW: factor de von Willebrand; tPA: activador tissular del plasminogen; PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen-1; ICAM-1: molècula d'adhesió intercel·lular 1; VCAM-1: molècula d'adhesió cel·lular vascular 1.

La vasodilatació dependent d'endoteli es pot mesurar tant en la circulació coronària com en la perifèrica, mitjançant tècniques invasives i no invasives (98). Pel que fa a la circulació coronària, el *gold standard* és l'angiografia coronària invasiva. Aquesta tècnica permet mesurar el diàmetre de les artèries coronàries abans i després de la infusió de determinats vasodilatadors, com per exemple l'acetilcolina. En presència de disfunció endotelial predominarà la vasoconstricció per sobre de la vasodilatació. Pel que fa a la circulació perifèrica, la tècnica més utilitzada és la mesura ecogràfica dels canvis de diàmetre de l'artèria braquial en resposta a la isquèmia (hiperèmia reactiva), coneguda amb el nom de *Flow-mediated dilatation (FMD)* (99).

Per altra banda, la mesura mitjançant pletismografia arterial perifèrica és una nova tècnica no invasiva que mesura els canvis d'amplitud del pols digital durant la hiperèmia reactiva. En adults, ha demostrat una excel·lent correlació amb mesures coronàries i perifèriques de disfunció endotelial com la *FMD* (100; 101). A més a més s'ha associat a la presència de factors de risc cardiovascular (102; 103) i, recentment, ha demostrat ser un predictor independent d'episodis cardiovasculars (104). Aquesta nova tècnica té l'avantatge de ser tècnicament més senzilla de realitzar que la *FMD*.

Aplicacions clíniques de la disfunció endotelial

- Disfunció endotelial i malaltia cardiovascular

La disfunció endotelial s'ha associat a la presència de múltiples factors de risc cardiovascular com l'edat, el tabaquisme, la DM, la dislipèmia, la HTA o la menopausa (105; 106). També s'ha associat a la predicció d'episodis cardiovasculars en diverses poblacions (107). En un metaanàlisi amb un total de 14 estudis i 5.547 persones (amb factors de risc cardiovascular o malaltia cardiovascular prèvia), es va objectivar que per cada descens d'una desviació estàndard de la *FMD*, augmentava en un 22% el risc de patir un episodi cardiovascular (108). A més a més, cal tenir present que la disfunció endotelial pot ser un procés reversible. Diverses estratègies, tant pel que fa a modificacions de l'estil de vida (exercici físic (109) i abandó del consum de tabac (110)) com a diverses intervencions farmacològiques, especialment en relació a l'ús d'estatines (111) i fàrmacs antihipertensius (112), s'han associat a una millora de la disfunció endotelial. No obstant, les proves sobre si aquesta millora de la disfunció endotelial es tradueix en una reducció de la morbi-mortalitat cardiovascular són encara molt escasses. Actualment, un únic estudi ha avaluat aquest aspecte (113). En aquest estudi es va avaluar la disfunció endotelial, mitjançant la *FMD*, en un grup de dones hipertenses post-menopàusiques tractades amb fàrmacs antihipertensius. Amb un seguiment mitjà de 5,6 anys, es va observar que el subgrup de dones amb una millora de la funció endotelial als 6 mesos de l'inici del tractament presentava una disminució en el nombre d'episodis respecte l'altre subgrup. Per tant, aquest resultat suggereix que una millora de la disfunció endotelial s'associa a un millor pronòstic, tot i que fan falta més estudis que recolzin les dades d'aquest únic treball.

- Disfunció endotelial i DM1

S'ha objectivat que els individus amb DM1 de més de 5-10 anys d'evolució i sense complicacions cròniques prèvies ja presenten un increment dels marcadors de disfunció endotelial en comparació amb la població sana (114). A més a més, la disfunció endotelial s'ha associat al desenvolupament de complicacions tant micro com macroangiopàtiques. Estudis prospectius han demostrat que l'augment de marcadors sèrics de disfunció endotelial està associat a l'aparició i progressió de la nefropatia, així com a la predicció d'episodis cardiovascular (63; 115; 116).

Resistència a la insulina

La resistència a la insulina, tot i ser un factor tradicionalment associat a la DM2 també pot estar present en els individus amb DM1. Aquest concepte es coneix actualment amb el nom de "DM doble". S'ha demostrat que els individus amb DM1 també poden presentar resistència a la insulina mitjançant mesures del consum de glucosa mediat per insulina, a través de tècniques de *clamp* euglucèmic-hiperinsulinèmic (mesura considerada el seu *gold standard*) o mitjançant el càlcul de la taxa estimada d'eliminació de glucosa (*estimated glucose disposal rate - eGDR*) (117). Aquesta fórmula estima la resistència a la insulina tenint en compte tres paràmetres: l'índex cintura-maluc, la presència o no d'HTA i el valor d'HbA1c, i ha estat validada en persones amb DM1 a partir de dades provinents del *clamp* euglucèmic-hiperinsulinèmic (118). La presència de resistència a la insulina en els individus amb DM1 s'ha associat al desenvolupament de complicacions cròniques. En el seguiment a 10 anys dels individus de l'estudi *Pittsburgh EDC*, la resistència a la insulina (eGDR) va ser un dels predictors independents d'episodis cardiovasculars (5). En l'estudi *DCCT*, la resistència a la insulina (eGDR) es va associar a un augment del risc de nefropatia, retinopatia i malaltia cardiovascular (36).

4.2. Rigidesa arterial

En els últims anys, s'han desenvolupat una sèrie de tècniques no invasives per valorar l'arteriosclerosi en fases preclíniques, abans de l'aparició del primer episodi cardiovascular. Aquestes tècniques tenen un gran interès a l'hora de millorar la predicció d'episodis cardiovasculars i comprenen des de les que valoren la disfunció

endotelial (com a fase més inicial de la arteriosclerosi), a les que avaluen la rigidesa arterial (RA) o les que detecten alteracions estructurals més avançades (com per exemple l'estudi del gruix de la íntima-mèdia carotídia o de les calcificacions coronàries). El desenvolupament d'aquests nous mètodes no invasius ens ofereix l'oportunitat d'estudiar el desenvolupament precoç de l'arteriosclerosi en la DM1. Aquestes noves tècniques no invasives, en combinació amb l'estudi d'altres possibles factors de risc no clàssics haurien de permetre millorar, en un futur pròxim, la nostra capacitat de predicció del risc cardiovascular individual en la DM1. En aquest apartat ens centrarem en l'estudi de la RA i dels seus possibles mecanismes fisiopatològics implicats, tema fonamental del present treball.

4.2.1. Rigidesa arterial: Principis bàsics d'hemodinàmica

Principis bàsics d'hemodinàmica

La RA és una de les primeres manifestacions que es poden detectar en relació al procés d'arteriosclerosi, reflectint alteracions tant a nivell estructural com funcional de la paret arterial. Existeixen diversos models per descriure el comportament de l'arbre arterial basats en les característiques de conducció i distensió dels vasos. Actualment, el model més acceptat és el model propagatiu (119). Aquest model descriu l'arbre arterial com un tub visco-elàstic, en el que la distribució de les propietats elàstiques varia al llarg del recorregut, permetent la generació d'una ona anterògrada des del cor que es transmet al llarg del tub i que, a nivell de les seves bifurcacions i en funció del nivell de resistència, genera ones de reflexió (ones retrògrades). La velocitat de propagació de l'ona del pols (ona de pressió) està inversament relacionada amb la distensió del vas (120-122): a menys distensió, més velocitat. Les propietats elàstiques dels vasos varien al llarg de l'arbre arterial, sent més elàstiques a nivell proximal (central) i més rígides a nivell distal (perifèric). Aquest fet produeix un increment de l'amplitud de l'ona del pols, fenomen que és coneix amb el nom de pressió d'amplificació. Aquesta heterogeneïtat ve determinada per l'estructura molecular, cel·lular i histològica de la paret del vas (123; 124). A més a més, la rigidesa dels vasos de calibre mitjà també ve determinada pel to vascular que depèn tant de la funció endotelial com del sistema nerviós simpàtic (125; 126) i l'eix renina-angiotensina-aldosterona (127).

Per tant, en condicions normals, la RA s'incrementa des de la part proximal a la part distal de l'arbre arterial (gradient de rigidesa). Per exemple, trobem que la velocitat de l'ona del pols (VOP) és de 4-5m/s a nivell de l'aorta ascendent, de 5-6m/s a nivell de l'aorta abdominal i de 8-9m/s a nivell d'artèries ilíiaques i femorals (128). Aquest gradient s'inverteix amb l'edat o amb la presència de determinades malalties, com per exemple la DM (129; 130).

L'ona del pols es propaga al llarg de l'arbre arterial generant, a nivell de les petites artèries musculars de resistència i arterioles distals, ones de reflexió (131-133). Aquestes ones de reflexió també contribueixen a l'amplificació de l'ona del pols de forma progressiva: és el que es coneix amb el nom de fenomen d'amplificació. El gradient de rigidesa esmentat prèviament també pot contribuir directament a la generació d'ones de reflexió, exagerant de forma més marcada l'amplificació de l'ona del pols (134). Per aquest motiu, donada l'amplificació de l'ona del pols que es produeix (secundària tant al gradient de rigidesa com a la generació d'ones de reflexió), no és correcte l'ús de la pressió del pols (PP) braquial com a mesura subrogada de la PP central (aòrtica o carotídia), especialment en gent jove (119; 122).

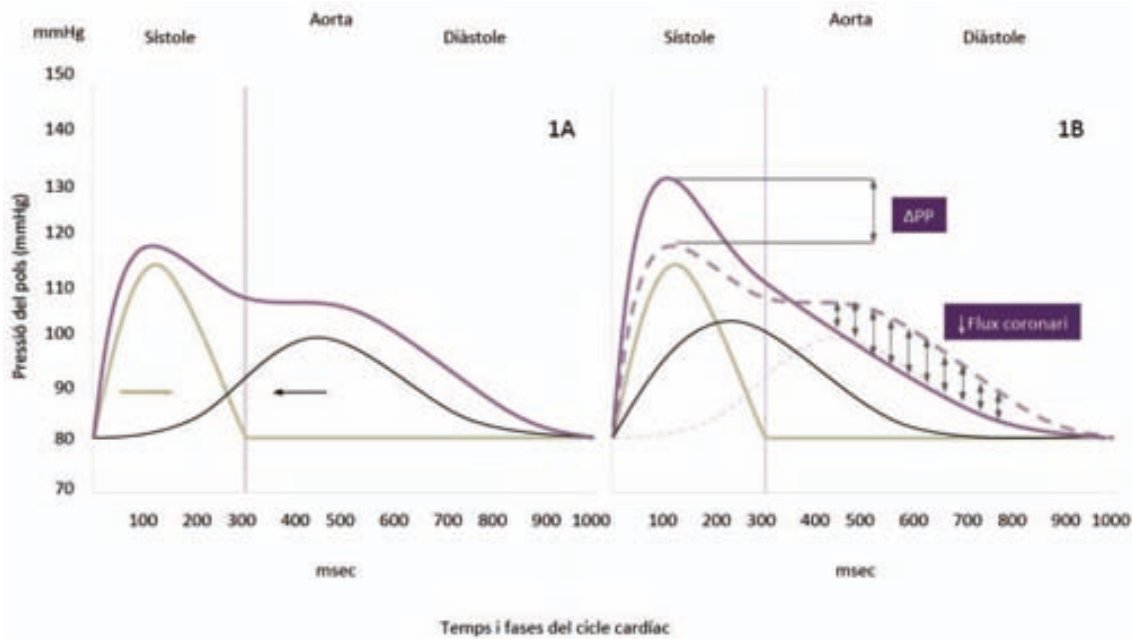
Conseqüències fisiopatològiques

En condicions normals, la pressió que es genera a nivell de l'artèria aorta és la suma de l'ona del pols anterògrada (produïda per la contracció ventricular) i de les ones de reflexió. En absència de RA, les ones de reflexió tornen a l'arrel aòrtica lentament, arribant en diàstole i incrementant la perfusió de les artèries coronàries (Figura 1A). En condicions en què es produeix un augment de la RA, es produirà un augment de la VOP, causant un retorn prematur de les ones de reflexió. Aquest fet generarà una pressió superior a nivell de l'aorta i produirà un increment de la pressió sistòlica central (PSc) i de la pressió del pols central (PPc), amb el conseqüent increment de la sobrecàrrega del ventricle esquerre, augmentant les demandes d'oxigen del miocardi (135) i disminuint la perfusió de les artèries coronàries durant la diàstole (Figura 1B).

La RA s'ha associat a hipertròfia ventricular esquerra (136), conegut factor de risc d'episodis cardiovasculars. L'increment de la PPc i la disminució de la PAD poden ser causa d'isquèmia subendocàrdica. A més a més, aquest increment s'acompanya d'un

T uMs- ír s PsubT r V ólt óóDi bs P F P bsí bís boF A " Dóe ís Píbs -v Ms- ír s Pí ó

2



2

óuTb Kó 72s Pbs ós- í vo ubUAv r s Pí us- sb vo r s Pí D- r s Pí D FóóF De ATT- vo r s Pí

2

2

4zPzP 2002c??g: gD17 2??mD 2c??D 12: l su??Dc?

2 2222aóT- r s Pí PóMs bóóu- s ór sísví i s ór 5bís bDóv s Dóóer s Ae σ 2vDM??

proteïnes es manté habitualment constant gràcies a un procés dinàmic de producció i degradació. El desequilibri en aquest procés, estimulat principalment per la ISBG, conduirà a una sobreproducció de col·lagen i una disminució relativa de la quantitat d'elastina, contribuint a l'aparició de RA (142). Addicionalment als canvis estructurals, la RA es relaciona també amb canvis a nivell de l'endoteli i del to del múscul llis vascular, que condicionaran canvis funcionals implicats també en l'aparició de RA (139).

Components estructurals i funcionals de la rigidesa arterial

La MEC de la paret arterial està composta principalment per col·lagen, elastina, glicoproteïnes i proteoglicans. Les dues primeres aporten integritat estructural i elasticitat a la paret del vas i es troben regulades per les metal·loproteases de la matriu (MMPs) (140). Gràcies a la seva acció col·lagenolítica i elastinolítica, les MMPs degraden la MEC, creant un col·lagen menys efectiu i trencant les molècules d'elastina. Les cèl·lules vasculars i inflammatòries (polimorfonuclears i macròfags) produeixen col·lagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13) i elastases (MMP-7 i serinoproteases) (143). Els inhibidors tissulars de les MMPs contraresten aquesta resposta controlant el remodelat (144).

Les molècules de col·lagen aporten resistència a la tracció que sofreix la paret arterial i, posteriorment a la seva formació, formen ponts d'entrecreuament que les converteixen en no degradables pels enzims hidrolítics (com per exemple les MMPs, entre d'altres) (145). El trencament d'aquestes unions intermoleculares causa la desintegració de la matriu de col·lagen. Per altra banda, degut a la seva baixa taxa de recanvi hidrolític, el col·lagen és particularment susceptible a la glicosilació no enzimàtica. Això afavoreix un increment del contingut de col·lagen, sovint amb una distribució de les seves fibres desorganitzada i disfuncional (140).

Les molècules d'elastina també es troben estabilitzades per ponts d'entrecreuament (140). La disrupció d'aquests lligams comporta la debilitat del conjunt, i predisposa a la mineralització per calci i fòsfor, contribuint a l'aparició de RA (140). A més a més, l'activació de proteases (com les MMPs) generarà la ruptura i el desgast de les molècules d'elastina (143). De manera que, alteracions en la producció

d'elastina i en la seva reparació també contribuïran a la pèrdua d'elasticitat vascular (146).

Sota condicions d'ISBG, les cèl·lules del múscul llis vascular poden expressar marcadors d'osteoblasts i comportar-se com a tals, recaptant fòsfat i produint bioapatita, afavorint la calcificació de la mèdia i disminuint l'elasticitat vascular (147). També és probable que hi hagi diferències entre la paret vascular inflamada i la no inflamada, pel que fa a la composició de proteoglicans i l'estat d'hidratació, que alterarien les propietats biomecàniques dels vasos. Finalment, la inflamació perivascular i la infiltració cel·lular al voltant dels *vasa vasorum* pot contribuir a la isquèmia, promovent el remodelat de la MEC i a l'aparició de RA en última instància (139).

Per altra banda, la RA també està afavorida per l'acumulació de PGAs (148). Els PGAs són el resultat de la glicosilació no enzimàtica a través de la formació irreversible de ponts d'entrecruament entre proteïnes, com per exemple el col·lagen. El col·lagen unit als PGAs és més rígid i menys susceptible a la degradació hidrolítica. Aquest fet condueix a una acumulació de molècules de col·lagen estructuralment alterades (149). De forma similar, les molècules d'elastina també són susceptibles a la unió a PGAs disminuint l'elasticitat de la matriu de la paret arterial (150). Els PGAs, al mateix temps, també poden afectar a la funció endotelial a través de l'increment en la generació de substàncies oxidants i la disminució de la producció d'ON (151). A través del seu receptor (RPGA), pertanyent a la superfamília de les immunoglobulines, els PGAs estimulen la resposta inflamatòria incrementant la formació de radicals lliures i la producció de citocines proinflamatòries, factors de creixement i molècules d'adhesió vascular (140).

A part dels canvis estructurals, senyals originades en les cèl·lules endotelials i del to vascular del múscul llis condicionen la RA (140). La causa de la disfunció endotelial s'atribueix a un desequilibri entre la producció d'ON i de substàncies vasoconstrictores com per exemple l'ET-1 (139; 152). En aquest sentit, la disminució de la biodisponibilitat d'ON (153) i l'augment de l'expressió d'inhibidors de l'ON sintasa s'han relacionat amb l'aparició de RA (154).

4.2.3. Rigidesa arterial: Aspectes metodològics

Actualment, diverses tècniques no invasives permeten l'avaluació de la RA. El principal avantatge d'aquestes tècniques és que permeten obtenir una mesura directa de paràmetres estretament lligats a la rigidesa de la paret del vas. Aquestes tècniques les podem agrupar en dos grans grups: la mesura de la RA i la mesura de les ones de reflexió.

Diverses revisions publicades en els últims anys han repassat els principals aspectes metodològics sobre la mesura de la RA (119; 138; 155-158) i han estandarditzat una sèrie de recomanacions per a la seva avaluació (Taula 3).

Taula 3: Recomanacions per a l'estandardització de l'avaluació de la RA (157)

Recomanacions	
Tª ambient	Mantenir temperatura ambient a $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$
Repòs	Mínim 10 minuts en posició decúbit
Hora del dia	Realitzar les avaluacions a hores del dia similars en cas de mesures repetides
Tabac, ingesta	Els subjectes han d'estar sense fumar i en dejú les tres hores prèvies a l'avaluació, i especialment abstenir-se de consumir begudes que continguin cafeïna
Alcohol	Abstenir-se de consumir alcohol les 10 hores prèvies a l'avaluació
Parlar, dormir	Els pacients no poden parlar ni dormir durant la realització de les mesures
Posició	Preferentment decúbit supí
Efecte bata blanca	Pot influenciar en la presa de la pressió i les mesures de RA dependents d'aquesta
Arítmies	Poden interferir en el registres

4.2.3.1. Mesures de rigidesa arterial

Mesures locals, regionals i sistèmiques

La RA es pot mesurar de forma directa tant a nivell regional com local, no sent així per la RA sistèmica, que només es pot estimar a partir dels models de circulació.

Mesures de rigidesa arterial local

La RA local és la mesura de l'elasticitat arterial en un segment determinat d'un vas. Permet calcular paràmetres com la compliància (canvi de volum per a un determinat canvi de pressió) i la distensió (canvi de diàmetre per a un determinat canvi

de pressió) de les artèries i estimar la VOP local. La seva mesura es pot realitzar a nivell de les artèries superficials (habitualment l'artèria caròtida) mitjançant dispositius ecogràfics o bé a nivell d'artèries profundes mitjançant ressonància magnètica (119; 138). El principal avantatge és que es tracta d'una mesura directa, no obstant requereix una important experiència tècnica i més temps que les mesures de RA regionals, implicant un cost superior. A més a més, el problema més important és que, tot i que la mesura de RA local i regional aporten informació similar de l'impacte de l'edat sobre la RA en subjectes normals, no es comporten de la mateixa forma en persones d'alt risc cardiovascular (com per exemple amb HTA o amb DM). En aquests casos es produeix un increment de la RA superior a nivell de l'aorta respecte al dels altres territoris (com per exemple el carotidi) fent que ambdues mesures no puguin ser intercanviables (159).

Mesures regionals

Mentre que les mesures de compliància i distensió es consideren mesures de RA local, la mesura de RA regional es basa en la determinació de la VOP en un determinat territori arterial, habitualment l'aòrtic (VOP aòrtica o caròtida-femoral). L'artèria aorta és el principal territori d'interès a l'hora de determinar la RA regional bàsicament per dos motius: en primer lloc, és el principal contribuent a la funció d'amortiment arterial (128; 160-162) i en segon lloc, la VOP aòrtica (VOPa) és un predictor independent d'episodis cardiovasculars en diverses poblacions (163).

L'avaluació de la VOP és considerada el mètode no invasiu més validat per a la mesura de la RA. Actualment, la determinació de la VOPa es considera el seu *gold standard* donada la seva senzillesa, precisió, reproductibilitat i predicció d'episodis cardiovasculars (164-166). Donat que es tracta del *gold standard* per mesurar la RA, la metodologia i les tècniques existents per a la seva mesura es desenvoluparan, específicament i més endavant, en un apartat propi.

Mesures de rigidesa arterial sistèmica

Els mètodes utilitzats per determinar la RA sistèmica es basen en models matemàtics de circulació (models elèctrics que combinen capacitància i resistència) (119; 155-157). Aquests mètodes tenen com a principal limitació que es basen en

aproximacions teòriques fetes a partir de l'avaluació de paràmetres perifèrics, fent que el seu ús sigui limitat en la pràctica clínica. Fins a l'actualitat, no existeixen estudis longitudinals que hagin demostrat el seu valor predictiu d'episodis cardiovasculars (167).

Velocitat de l'ona del pols

Tal i com s'ha esmentat en l'apartat anterior, la determinació de la VOPa es considera el *gold standard* per a la mesura de la RA. Diversos estudis han demostrat el valor predictiu per episodis cardiovasculars de la VOPa, no sent així per a la mesura en altres territoris, com per exemple la VOP braquial o femoro-tibial (119; 163), i sent superior al valor predictiu de mesures de RA local i de les derivades de l'anàlisi de les ones de reflexió (168).

Càlcul de la velocitat de l'ona del pols

La VOP es mesura habitualment utilitzant el mètode "peu a peu" de varies ones enregistrades. El peu de l'ona es defineix com el final de la diàstole, quan s'inicia l'ona del pols. Es realitza l'enregistrament a nivell de dos punts diferents de l'arbre arterial (per exemple l'artèria caròtida comú dreta i l'artèria femoral dreta en el cas de la VOPa), mesurant el decalatge de temps que hi ha entre l'inici (el peu) d'ambdues ones. La distància que recorre l'ona del pols, s'assumeix com la distància entre els dos llocs de l'enregistrament. La VOP es calcula dividint la distància (ΔL) entre la diferència de temps (temps de trànsit: Δt) (Figura 2).

És necessari mesurar la distància de forma acurada ja que pot influir en el valor absolut de la VOP (169). Com més curta sigui la distància entre els dos punts de registre, més gran serà l'error absolut en determinar el temps de trànsit. El consens sobre RA publicat l'any 2006 recomanava utilitzar una de les següents opcions (119):

- utilitzar la distància total entre el punt carotí i el femoral,
- restar la distància entre el punt carotí i l'osca esternal de la distància total,
- o bé restar la distància entre el punt carotí i l'osca esternal de la distància entre el punt femoral i l'osca esternal.

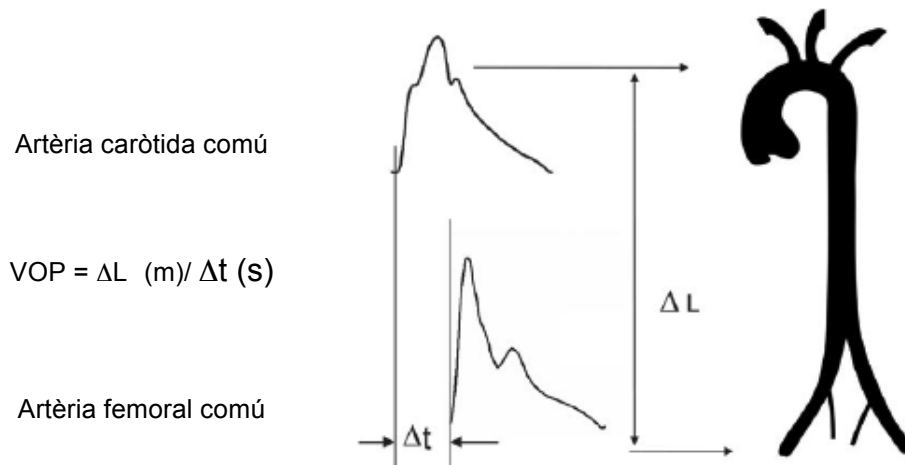


Figura 2: Mesura de la VOPa (caròtida-femoral) amb el mètode "peu a peu".
Laurent et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. Eur Heart J 2006;27:2588-2605.

Aquests tres mètodes eren aproximacions de la distància, posteriorment se n'han descrit més (170). Les diferències absolutes obtingudes amb aquests mètodes no acostumen a ser significatives en estudis d'intervenció amb mesures repetides. No obstant, al comparar dues poblacions diferents o al posar en comú dades de diferents poblacions (per exemple en un metaanàlisi), les diferències en els mètodes emprats per avaluar la distància si que són rellevants. Tant és així, que recentment s'ha publicat un nou consens amb l'objectiu d'estandarditzar la mesura de la distància (158). Per tal d'establir el millor mètode, els autors es van basar en un estudi publicat l'any 2011 en què es comparaven les diferents tècniques de mesura amb la mesura directa de la distància mitjançant ressonància magnètica (170). Aquest estudi va objectivar que la distància total entre l'artèria caròtida comú i l'artèria femoral comú sobreestimava la distància real en un 25,4% mentre que les mesures resultants de restar la distància entre l'artèria caròtida comú i l'artèria femoral comú de la osca esternal la infraestimaven entre el 10,3 i el 29,2%. Els autors van concloure que el millor mètode és utilitzar el 80% de la distància total entre l'artèria caròtida comú i l'artèria femoral comú, sobreestimant únicament la mesura real en un 0,4% (158).

Per últim, també s'ha de tenir present la dificultat per mesurar l'artèria femoral en determinades persones (per exemple amb obesitat o malaltia arterial perifèrica)

(157). A més a més, l'obesitat abdominal o el contorn del pit en les dones també pot contribuir a que la distància sigui poc acurada (157).

Mètodes per a la mesura de la velocitat de l'ona del pols

- Tonometria d'aplanament i mètodes oscil·lomètrics

Es basa en la mesura de l'ona del pols mitjançant l'enregistrament d'ones de pressió. L'ona del pols es mesura simultàniament o bé de forma seqüencial en dos punts de l'arbre arterial. En els enregistraments simultanis, el càlcul del temps de trànsit es realitza de forma automàtica mitjançant algorismes matemàtics. En el segon cas, el temps de trànsit es calcula, mitjançant un enregistrament electrocardiogràfic simultani, prenent com a punt de referència l'ona R de l'electrocardiograma (ECG). El temps entre l'ona R i el peu de l'ona enregistrada a nivell proximal es resta del mateix temps calculat a nivell distal, obtenint el temps de trànsit (Δt) (119). Actualment, existeixen diversos aparells al mercat que calculen de forma automàtica el valor de la VOP (171).

Aquestes tècniques són relativament senzilles de realitzar, de baix cost i han demostrat una elevada reproductibilitat. Actualment, són les tècniques de les que disposem de més experiència pel que fa al seu valor pronòstic. No obstant, tal i com s'ha esmentat prèviament, el principal inconvenient és el càlcul de la distància, sent una aproximació de la distància real i podent ser imprecisa en determinades situacions com per exemple en l'obesitat (138).

- Ecocardiograma

Es basa en l'enregistrament d'ones de distensió mitjançant dispositius ecocardiogràfics. En aquests casos, l'enregistrament també es pot realitzar de forma simultània o de forma seqüencial, usant com a referència l'ona R de l'ECG per al càlcul dels temps de trànsit entre els punts proximal i distal. Les mesures es realitzen habitualment a nivell de l'artèria subclàvia esquerra i a prop de la bifurcació de l'aorta abdominal (119). El seu ús no està tan estès com la tonometria d'aplanament, tot i que s'ha demostrat una bona correlació entre els dos mètodes (172). Actualment, existeixen menys estudis pel que fa al seu valor pronòstic i requereix més expertesa tècnica que la tonometria d'aplanament (138).

- Ressonància nuclear magnètica

És la tècnica que s'ha descrit més recentment. Té l'avantatge de que permet l'estudi dels vasos en tres dimensions. Les dades de la VOP es poden obtenir de forma simultània en dos punts diferents del territori aòrtic. El principal avantatge és que permet el càlcul de la distància de forma directe. Cal destacar com a principals inconvenients que està menys validada, que existeixen menys estudis en comparació amb les tècniques de tonometria d'aplanament, i que la durada de l'exploració i el seu cost són també superiors (138).

4.2.3.2. Mesures de les ones de reflexió

Anàlisi de l'ona del pols central

Existeixen dos tipus de paràmetres principals a l'hora de quantificar de les ones de reflexió a nivell central. El primer és determinar el temps i la proporció de les ones reflectides i el segon és la possibilitat d'estimar les pressions centrals: la PPc i la PSc. La contribució de les ones de reflexió en l'increment de la pressió sistòlica es pot quantificar a través de l'índex d'augment (IA). L'IA es defineix com la diferència entre el segon i el primer pic sistòlic (pressió d'augment: $AP=P2-P1$) expressat en percentatge respecte la PP (Figura 3) (173). L'edat i la VOP són els seus principals determinants (174).

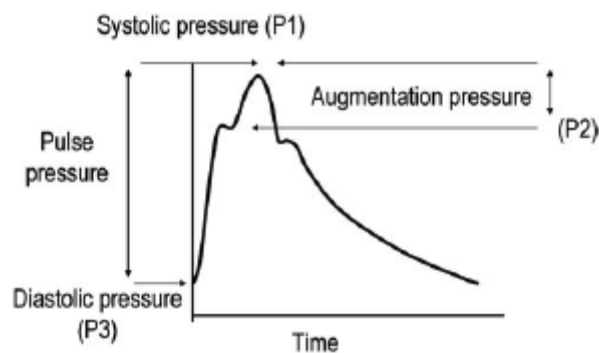


Figura 3: Ona del pols carotídia registrada per tonometria d'aplanament. L'alçada del pic sistòlic tarda (P1) per sobre de la inflexió (P2) defineixen l'IA, expressat en percentatge respecte la PP. *Laurent et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. Eur Heart J 2006;27:2588-2605.*

4. Antecedents i justificació

El segon aspecte a l'hora d'analitzar les ones de reflexió és estimar els valors absoluts de les pressions centrals: la PPc i la PSc. Al tractar-se de valors absoluts, la mesura de la PPc i la PSc requereix d'una calibració (157; 175), al contrari que l'IA. La calibració es basa en el fet que la PA mitjana és manté constant a nivell de l'arbre arterial i que la PAD no varia substancialment. A la pràctica, la PA mitjana es mesura a l'artèria de referència, habitualment la braquial, i la PP es calcula com la diferència entre la PAS i la PAD. Partint de la base que la PA mitjana es manté constant, s'estableix el valor de la PA mitjana braquial com el valor de la PA mitjana central. La PPc es calcula partint de la PAD i de la posició de la PA mitjana a nivell de la pressió del pols central. La PSc s'obté sumant la PPc a la PAD (Figura 4) (176).

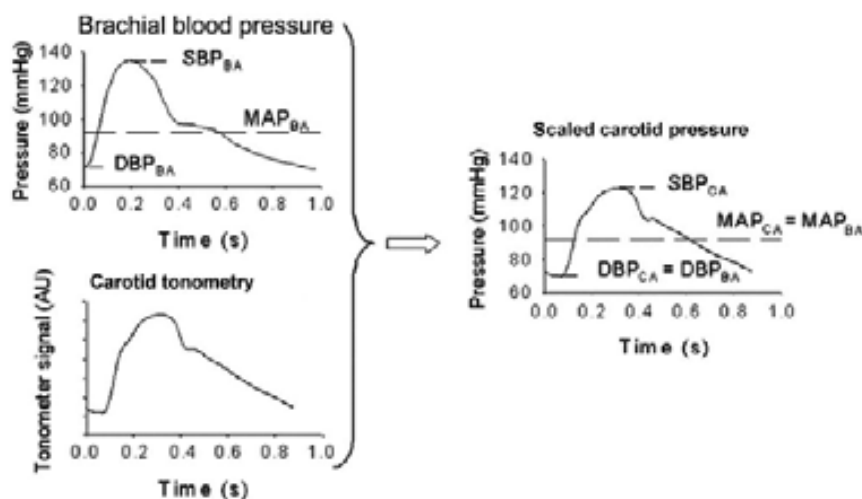


Figura 4: Mètode de calibració per la PPc. *Laurent et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. Eur Heart J 2006;27:2588-2605.*

Es considera que la VOP és una mesura directa de RA, en canvi la PPc, PSc i l'IA són únicament mesures indirectes. No obstant, ens aporten informació addicional sobre les ones de reflexió. Per aquest motiu, es recomana que l'anàlisi de l'ona del pols es realitzi únicament de forma complementària a la mesura de la VOPa (no com a substitut), per tal de determinar la contribució de la RA sobre les ones de reflexió.

4.2.4. Rigidesa arterial: Aplicacions clíniques

En els últims anys, l'avaluació de la RA en nombrosos estudis observacionals ha permès comprendre millor la patogènesis de les complicacions cardiovasculars. Per altra banda, el principal argument per recomanar la mesura de la RA en la pràctica clínica habitual prové de la demostració recent del valor predictiu de la RA per episodis cardiovasculars (177).

No obstant, la implementació de l'estudi de la RA com a prova habitual ha estat dificultada per la manca d'estandardització en la mesura de la VOP, així com per la manca de valors de referència en la població general. Un exemple d'aquesta dificultat el trobem en la guia d'HTA publicada l'any 2007 de *l'European Society of Hypertension* i *l'European Society of Cardiology* que va establir el valor de 12 m/s (178) basant-se en estudis epidemiològics, sense tenir en compte els múltiples factors que poden influir en el valor de la VOP. En aquest sentit, s'ha demostrat àmpliament que existeixen diferències importants pel que fa als valors absoluts de la VOP tenint en compte la metodologia emprada o la població estudiada.

Valors de normalitat de la velocitat de l'ona del pols aòrtica

L'any 2010 es va publicar un treball, en el que van participar 13 centres distribuïts per tota Europa, establint els valors de normalitat de la VOPa per a la població sense factors de risc cardiovascular ($n = 1.455$) (Taula 4). Addicionalment es van establir uns valors de referència de la VOPa aplicables a una població més àmplia, amb i sense factors de risc cardiovascular (incloent persones amb HTA sense tractament, hipercolesterolèmia sense tractament o tabaquisme actiu i havent-se exclòs prèviament els individus amb DM o malaltia cardiovascular prèvia) ($n=11.092$). Els valors de normalitat per aquesta segona població es van dividir en funció dels diferents grups d'edat i de les xifres de PA (principals determinants de la VOP) (Taula 5). Per aquest estudi, es va estandarditzar prèviament el càlcul de la VOPa en funció de la tècnica utilitzada en cada centre amb l'objectiu d'unificar criteris (179). Aquest treball, és possiblement, el primer que ha aportat, fins a l'actualitat, uns valors de referència basats en una àmplia població i utilitzant una metodologia estandarditzada. No obstant, cap dels països participants pertanyien a l'àrea mediterrània, i per tant, faltaria conèixer si els valors de referència serien extrapolables a la nostra població.

4. Antecedents i justificació

Taula 4. Valors de normalitat de la VOPa (m/s) en funció de l'edat en població general sense factors de risc cardiovascular (1.455 individus). Adaptada de la referència (*Eur Heart J 2010;31:2338-2350*)

Edat	Mitjana (± 2 DE)	Mediana (10-90 pc)
< 30	6,2 (4,7-7,6)	6,1 (5,3-7,1)
30-39	6,5 (3,8-9,2)	6,4 (5,2-8,0)
40-49	7,2 (4,6-9,8)	6,9 (5,9-8,6)
50-59	8,3 (4,5-12,1)	8,1 (6,3-10,0)
60-69	10,3 (5,5-15,0)	9,7 (7,9-13,1)
> 70	10,9 (5,5-16,3)	10,6 (8,0-14,6)

VOPa: velocitat de l'ona del pols aòrtica; DE: desviació estàndard; pc: percentil

Taula 5. Valors de referència de la VOPa (m/s) en població general amb i sense factors de risc cardiovascular (11.092 individus) en funció de les categories d'edat i pressió arterial. Adaptada de la referència (*Eur Heart J 2010;31:2338-2350*)

Edat	Categories de pressió arterial				
	Òptima	Normal	Normal-Alta	HTA grau I	HTA grau II/III
Valors de VOPa en funció de la mitjana (± 2 DE)					
< 30	6,1 (4,6-7,5)	6,6 (4,9-8,2)	6,8 (5,1-8,5)	7,4 (4,6-10,1)	7,7 (4,4-11,0)
30-39	6,6 (4,4-8,9)	6,8 (4,2-9,4)	7,1 (4,5-9,7)	7,3 (4,0-10,7)	8,2 (3,3-13,0)
40-49	7,0 (4,5-9,6)	7,5 (5,1-10,0)	7,9 (5,2-10,7)	8,6 (5,1-12,0)	9,8 (3,8-15,7)
50-59	7,6 (4,8-10,5)	8,4 (5,1-11,7)	8,8 (4,8-12,8)	9,6 (4,9-14,3)	10,5 (4,1-16,8)
60-69	9,1 (5,2-12,9)	9,7 (5,7-13,6)	10,3 (5,5-15,1)	11,1 (6,1-16,2)	12,2 (5,7-18,6)
> 70	10,4 (5,2-15,6)	11,7 (6,0-17,5)	11,8 (5,7-17,9)	12,9 (6,9-18,9)	14,0 (7,4-20,6)
Valors de VOPa en funció de la mediana (10-90 pc)					
< 30	6,0 (5,2-7,0)	6,4 (5,7-7,5)	6,7 (5,8-7,9)	7,2 (5,7-9,3)	7,6 (5,9-9,9)
30-39	6,5 (5,4-7,9)	6,7 (5,3-8,2)	7,0 (5,5-8,8)	7,2 (5,5-9,3)	7,6 (5,8-11,2)
40-49	6,8 (5,8-8,5)	7,4 (6,2-9,0)	7,7 (6,5-9,5)	8,1 (6,8-10,8)	9,2 (7,1-13,2)
50-59	7,5 (6,2-9,2)	8,1 (6,7-10,4)	8,4 (7,0-11,3)	9,2 (7,2-12,5)	9,7 (7,4-14,9)
60-69	8,7 (7,0-11,4)	9,3 (7,6-12,2)	9,8 (7,9-13,2)	10,7 (8,4-14,1)	12,0 (8,5-16,5)
> 70	10,1 (7,6-13,8)	11,1 (8,6-15,8)	11,2 (8,6-15,8)	12,7 (9,3-16,7)	13,5 (10,3-18,2)

VOPa: velocitat de l'ona del pols aòrtica; HTA: hipertensió arterial; DE: desviació estàndard; pc: percentil. Categories de pressió arterial: Òptima <120/80, Normal entre ≥120/80 i <130/85, Normal-Alta entre ≥130/85 i <140/90, HTA grau I entre ≥140/90 i <160/100, grau II/III ≥160/100.

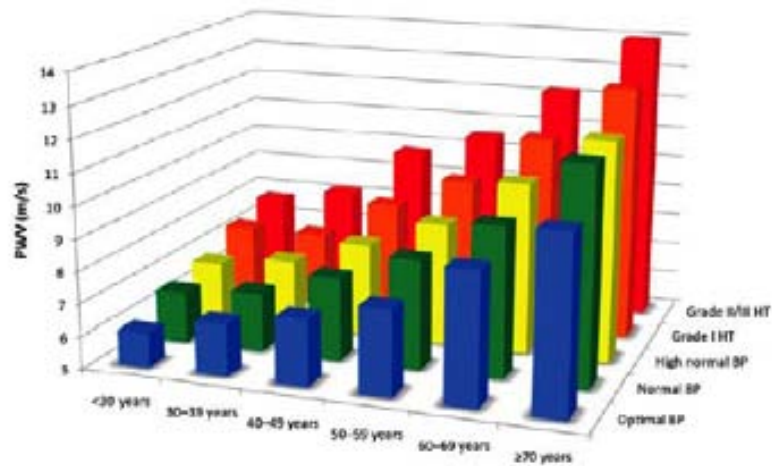


Figura 5: Valors de referència per la VOPa (PWV) en funció de les categories d'edat i pressió arterial incloent un total de 11.092 individus. *The Referente Values for Arterial Stiffness' Colaboration. Eur Heart J 2010;31:2338-2350.*

La velocitat de l'ona del pols com a factor de risc cardiovascular

Diversos articles i revisions publicats en els últims anys han donat a conèixer les diferents condicions fisiopatològiques i els factors de risc associats a l'increment de la RA (119; 180-182). Dins d'aquest ampli ventall de situacions, trobem (1) condicions fisiològiques com per exemple l'edat, el baix pes al néixer, el cicle menstrual, la menopausa i l'exercici físic; (2) la càrrega genètica com els antecedents familiars d'HTA, DM o cardiopatia isquèmica i determinats polimorfismes genètics; (3) factors de risc cardiovascular com l'obesitat, el tabaquisme, la HTA, la hipercolesterolèmia, la intolerància oral a la glucosa i la DM; (4) la presència de malaltia cardiovascular com la cardiopatia isquèmica i malaltia cerebrovascular i finalment (5) altres malalties cròniques com la IRC, l'artritis reumatoide, vasculitis sistèmiques, el lupus eritematós sistèmic, la sida o la malaltia inflamatòria intestinal.

La velocitat de l'ona del pols com a factor pronòstic

Estudis longitudinals han posat de manifest el valor predictiu per episodis cardiovasculars tant de la RA com de l'avaluació de les ones de reflexió (119; 163; 177). El paràmetre més avaluat és la VOPa. La VOPa ha demostrat tenir un valor predictiu independent per mortalitat (cardiovascular i total) i per episodis cardiovasculars en la població general (168; 183-187), població d'edat avançada (188; 189), en malalts amb HTA (190-193), IRC terminal (194-196) i DM2 (197).

dos, el valor predictiu incrementava significativament (àrea sota la corba: 0,76 +/- 0,09) indicant que la VOP és capaç de millorar la predicció del risc (191). En els altres dos estudis, es va confirmar aquesta capacitat per millorar la predicció de mortalitat cardiovascular en gent gran (184) i en població general de mitjana edat (198). Aquest fet es traduiria en una proporció substancial d'individus de risc intermedi que es reclassificarien en els grups de baix o alt risc cardiovascular al mesurar la RA (168; 184; 198). Per exemple, en l'estudi de *Framingham*, un 15,7% dels individus de risc intermedi es podrien reclassificar com a baix (1,4%) o alt risc (14,3%) (168).

La velocitat de l'ona del pols en estudis d'intervenció

S'ha demostrat que diverses intervencions tant higiènic-dietètiques (exercici físic, pèrdua de pes, baix consum de sal, entre d'altres) com farmacològiques (com el tractament antihipertensiu i les estatines, entre d'altres) poden produir un descens de la RA. No obstant, aquests estudis no aporten evidència suficient que recolzi que la disminució de la RA s'acompanyi d'una reducció dels episodis cardiovasculars, independentment de la normalització dels factors de risc cardiovascular clàssics (119; 138; 158). Un punt important rau en si la reducció de RA es traduiria en una reducció del risc cardiovascular. Actualment hi ha molts pocs estudis que recolzin aquest fet. Guerin *et al.* van publicar un treball incloent 150 persones amb IRC en els que es van realitzar mesures repetides de VOP durant el seguiment. Aquelles persones que mostraven una absència de reducció de la VOP en resposta al descens de les xifres de tensió arterial presentaven un risc augmentat de mortalitat cardiovascular (199). No obstant, no existeixen en general estudis d'intervenció ben dissenyats que hagin respost aquesta pregunta.

4.2.5. Rigidesa arterial i diabetis mellitus tipus 1

A finals dels anys 80 i principis dels 90 comencen a aparèixer en la literatura els primers estudis sobre RA central en la DM1 (principalment amb tècniques per avaluar-la a nivell local) però no és fins els últims anys quan comencen a aparèixer els primers estudis per avaluar la RA central a través de l'anàlisi de l'ona del pols (mesura de pressions centrals -PPc i PSc- i de l'IA) i posteriorment mitjançant l'avaluació de la VOPa, el seu *gold standard*. Per aquest motiu, les dades sobre RA central en la DM1

han estat escasses i sovint contradictòries fins fa relativament poc (especialment tenint en compte els estudis que mesuren la VOPa).

En l'última revisió realitzada (última revisió del *PubMed* amb data 24 de Juny de 2013) s'han trobat un total de 10 estudis de casos i controls, tres en nens i adolescents (200-202) i set en població adulta (un en dones embarassades) (203-209) en què s'utilitza la tonometria d'aplanament per a la mesura de la VOPa. De tots aquests estudis, en un total de sis s'han objectivat diferències entre grups (dos en adolescents i quatre en adults) (201-204; 208; 209), sense observar-se diferències en els altres estudis (200; 205-207). Aquestes diferències han estat en el sentit d'una major RA en les persones amb DM1.

També s'ha avaluat l'efecte dels canvis de glucèmia, tant aguts com crònics, sobre la RA. En l'estudi publicat per Westerbacka *et al.* es va avaluar l'efecte de l'euglucèmia i l'administració d'insulina via endovenosa (clamp euglucèmic hiperinsulinèmic). Les persones amb DM1, a diferència dels controls sans, no presentaven cap disminució dels valors de l'IA amb l'administració d'insulina durant la primera hora, presentant una resposta més tardana respecte la població control, associada a un major grau de resistència a la insulina (210). Wilhelm *et al.* si que van objectivar un descens de l'IA amb l'administració d'insulina, tot i que sense arribar a normalitzar-se ni igualar-se en relació amb el grup control (211). També s'ha avaluat l'efecte de la hiperglucèmia aguda (clamp hiperglucèmic) sobre l'IA objectivat-se un increment ràpid d'aquest paràmetre tant en les persones amb DM1 com en els subjectes del grup control (206). La hipoglucèmia aguda produiria l'efecte contrari (212), amb una disminució de la RA fisiològica en condicions normals, resposta que es perd en persones amb DM1 de llarga durada. Per últim, la glucèmia mitjana diària s'ha associat positivament a l'increment de VOPa, no sent així per altres paràmetres de mesura de la variabilitat glucèmica com l'índex d'amplitud mitjana de les excursions glucèmiques (*MAGE: Mean Amplitude Glucose Excursions*) (213).

Més recentment, diversos estudis de tall transversal han demostrat una associació entre l'increment de la RA (mesurada mitjançant la VOPa) i la presència de complicacions cròniques com la retinopatia, la nefropatia, la neuropatia autonòmica, la malaltia cardiovascular i la malaltia arterial perifèrica (209; 214; 215). No obstant, actualment encara existeixen poques dades prospectives que hagin permès l'avaluació

del valor predictiu de la RA en la DM1 en relació a aquestes complicacions. L'any 2003, Schram *et al.* van objectivar que la PP braquial era un bon predictor de la presència de complicacions microvasculars i de malaltia cardiovascular incident (216). Posteriorment, l'any 2011, Gordin *et al.* van objectivar que la PPc era un predictor independent d'episodis cardiovasculars després d'ajustar per la resta de factors de risc clàssic. No obstant, aquesta associació desapareixia en tenir en compte l'antecedent de malaltia cardiovascular prèvia. Per contra, la PPc no va ser predictora de la progressió de nefropatia. Tant aquests autors com els anteriors no aportaven dades sobre el valor de la VOP (217). Per últim, Theilade *et al.* han objectivat que la PP braquial és un predictor independent, després d'ajustar per la resta de factors de risc cardiovascular clàssics, de mortalitat total, episodis i mortalitat cardiovascular i de progressió de la nefropatia a IRC terminal en persones amb DM1, però tampoc aporten dades de paràmetres centrals ni de VOPa (218).

Per tant, les dades de que disposem actualment pel que fa a la VOPa són encara escasses i falten estudis prospectius que permetin avaluar el seu valor predictiu en relació especialment als episodis cardiovasculars (com ja s'ha establert en altres poblacions (177)) però també per les complicacions microvasculars de la DM1.

4.3. Relació entre la rigidesa arterial i la inflamació sistèmica de baix grau i la disfunció endotelial

Com hem esmentat anteriorment, des d'un punt de vista més fisiopatològic, la RA es desenvoluparia a través de la complexa interacció entre canvis estructurals i funcionals produïts a nivell de la paret del vas (139; 140). El grau de RA vindria determinat principalment per la contribució relativa de les dues proteïnes estructurals principals: el col·lagen i l'elastina (124; 141) que habitualment es mantindria constant gràcies a un procés dinàmic de producció i degradació. El desequilibri en aquest procés, estimulat principalment per la ISBG, conduiria a una sobreproducció de col·lagen i una disminució relativa de la quantitat d'elastina, contribuint a l'aparició de RA (142). Addicionalment a aquests canvis estructurals, la RA també es relacionaria amb canvis a nivell de l'endoteli i del to del múscul llis vascular, que condicionaran canvis funcionals implicats també en la seva aparició (139). Per tant, tant la ISBG com la disfunció endotelial estarien directament implicades en l'increment de RA. Des d'un

punt de vista més clínic, diversos estudis de tall transversal han objectivat associacions entre l'increment de RA i marcadors tant d'ISBG com de disfunció endotelial, predominantment en població general i en individus amb HTA.

La ISBG s'ha associat a l'increment de RA en diverses poblacions: en població general (219-223), en població d'edat avançada (224; 225), persones hipertenses (226-229), individus amb hipercolesterolèmia (230), IRC terminal (231) o DM2 (232). En població general, s'ha objectivat una correlació positiva entre la PCRus i la PPc, la PSC i l'IA (219; 221; 223), així com amb la VOP (220; 222). En persones d'edat avançada, dos estudis van posar de manifest una associació positiva entre la PCR i l'IA i la VOP (224; 225). També existeixen diversos estudis en població hipertensa en què s'ha observat una associació entre la PCRus i la VOP (226; 228; 229) i entre la PCRus i l'IA (227). Altres marcadors d'ISBG (IL-6 i $\text{TNF}\alpha$) o l'adiponectina (adipocina antiinflamatòria) també s'han relacionat amb la VOP (226; 229). Tot i que la ISBG també s'ha implicat en l'aparició de complicacions cròniques en la DM1 (61; 63; 233-236), actualment no existeixen estudis que hagin demostrat una associació entre la RA i la ISBG en la DM1. No obstant, recentment s'ha demostrat en un estudi del nostre grup que l'activació del sistema del $\text{TNF}\alpha$ s'associa a un increment de la PP perifèrica, marcador subrogat de RA (237). En aquest treball, es va observar que en un grup de persones amb DM1 sense HTA (n=112), els valors de PP braquial es correlacionaven amb les concentracions plasmàtiques dels sR1 $\text{TNF}\alpha$ i sR2 $\text{TNF}\alpha$, inclús després d'ajustar per la resta de factors de risc cardiovascular, posant de manifest la possible implicació de la ISBG en l'increment de la RA.

Com hem esmentat anteriorment, la disfunció endotelial es caracteritza per una disminució de la biodisponibilitat de vasodilatadors, com l'ON, així com un increment de la producció de vasoconstrictors que conduiria a un increment funcional de la RA. La disfunció endotelial s'ha associat a l'increment de RA en població general (238; 239), en persones amb malaltia cardiovascular (240) i en individus amb factors de risc cardiovascular com la HTA (241) o la DM2 (242). Pel que fa a l'associació de la RA i la disfunció endotelial en la DM1 només existeixen tres estudis que hagin avaluat aquest aspecte. Stadler *et al.* van objectivar una associació positiva (correlació univariada) entre la VOPa i marcadors sèrics de disfunció endotelial (ICAM-1) en un grup de persones amb DM1 heterogeni (10 DM1 post-trasplantats de ronyó i pàncrees, 10

DM1 amb bon control glucèmic, 10 DM1 amb mal control metabòlic, 9 controls sans i 6 post-trasplantats renals sense DM) (243). Per contra, altres autors no han objectivat cap relació entre la mesura de disfunció endotelial mitjançant *FMD* i mesures de RA sistèmica (244) o amb l'avaluació de les ones de reflexió mitjançant l'IA (245). Per tant, les dades de que disposem actualment són encara escasses.

4.4. Justificació

En resum, la DM1 es caracteritza per un procés d'arteriosclerosi accelerat, sent la malaltia coronària la principal causa de mort. Aquest augment del risc cardiovascular no s'explica completament pels factors de risc cardiovascular clàssics. En els últims anys, s'han desenvolupat una sèrie de tècniques no invasives per valorar l'arteriosclerosi en fases preclíniques. Entre aquestes tècniques trobem les que avaluen la RA, considerada un dels primers signes detectables d'arteriosclerosi. En diverses poblacions, l'estudi de la RA central mitjançant la VOPa (el seu *gold standard*) ha demostrat que aporta informació addicional als factors de risc cardiovascular clàssics en la predicció d'episodis cardiovasculars. En la DM1 existeix una elevació precoç de la PP braquial (com a signe de RA perifèrica) que prediu la presentació d'episodis cardiovasculars. Aquest increment de PP braquial no reflecteix acuradament l'increment en la RA central, que és la que participaria directament a la patogènia dels episodis cardiovasculars. Tot i que la determinació de la VOPa es pot realitzar amb fiabilitat, senzillesa i de forma no invasiva, existeixen relativament pocs estudis que l'hagin mesurada a la DM1. A més a més, actualment, els mecanismes fisiopatològics implicats en l'aparició de RA en la DM1 no estan clarament establerts. Es creu que la RA es desenvoluparia a través de la complexa interacció de factors com la ISBG o la disfunció endotelial, que conduirien a una sobreproducció de col·lagen i una disminució relativa de la quantitat d'elastina, contribuint a l'aparició d'aquesta. Per aquest motiu ens vam plantejar estudiar la RA central (mitjançant la mesura de la VOPa) com a signe d'arteriosclerosi preclínica en un grup de persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia. A més a més vam avaluar alguns dels possibles mecanismes fisiopatològics implicats en el seu increment, centrant-nos especialment en el paper de la ISBG i la disfunció endotelial.

5. Hipòtesis

5. Hipòtesis

Tenint en compte tots els punts desenvolupats en l'apartat anterior les nostres hipòtesis de treball són:

1. Que les persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia presentaran un increment de la RA central, mesurada mitjançant la VOPa, en comparació amb un grup de control sans, emparellats per edat i sexe.
2. Que les persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia presentaran un augment de les concentracions sèriques de determinats marcadors d'ISBG, en comparació amb el mateix grup de control sans, i que aquest augment estarà relacionat amb l'increment de la VOPa.
3. Que les persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia presentaran una disminució de les concentracions sèriques de sTWEAK i un augment de les concentracions sèriques de CD163, en comparació amb el mateix grup de control sans, i que aquestes alteracions estaran relacionades amb l'increment de la VOPa.
4. Que les persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia presentaran un augment de la disfunció endotelial, en comparació amb el mateix grup de control sans, i que aquest augment estarà relacionat amb l'increment de la VOPa.

6. Objectius

6. Objectius

1. Estudiar si la RA, mesurada amb la VOPa per tonometria d'aplanament, està incrementada en les persones amb DM1 en relació amb un grup control, emparellat per edat i sexe, tenint en compte els possibles factors de confusió.
2. Estudiar si les persones amb DM1 presenten un augment dels marcadors sèrics d'ISBG (PCRus, IL-6, sR1TNF α i sR2TNF α) en comparació amb el mateix grup control, i si aquestes diferències es correlacionen amb les possibles diferències entre ambdós grups pel que fa a la VOPa.
3. Estudiar si les persones amb DM1 presenten una disminució de les concentracions sèriques de sTWEAK i un augment de les concentracions sèriques de CD163 en comparació amb el mateix grup control, i si aquestes diferències es correlacionen amb les possibles diferències entre ambdós grups pel que fa a la VOPa.
4. Estudiar si les persones amb DM1 presenten més disfunció endotelial (mesurada per pletismografia arterial perifèrica i a través de marcadors sèrics: ICAM-1, VCAM-1 i E-Selectina) en comparació amb el mateix grup control, i si aquestes diferències es correlacionen amb les possibles diferències entre ambdós grups pel que fa a la VOPa.

7. Mètodes

7. Mètodes

7.1. Disseny de l'estudi

Es va dissenyar un estudi transversal de casos i controls per tal d'avaluar la RA i els mecanismes fisiopatològics implicats (ISBG i disfunció endotelial) en les persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia en comparació amb un grup de controls sans.

7.2. Subjectes. Criteris d'inclusió i d'exclusió

Es van incloure un total de 136 participants, 68 individus amb DM1 i 68 controls sans emparellats per edat (+/- 2 anys) i sexe. En cada grup van participar 34 homes i 34 dones.

Criteris d'inclusió

- DM1 segons els criteris de la *American Diabetes Association* (casos)
- Edat entre 18 i 65 anys

Criteris d'exclusió

- Descompensació aguda greu (cetosi, cetoacidosi, situació hiperosmolar no cetòsica o hipoglucèmia greu) en l'últim mes (podent-se avaluar passat aquest període).
- Hipoglucèmia simptomàtica (glucèmia <50mg/dl) la nit anterior a l'avaluació (podent-se avaluar un altre dia).
- Hiperglucèmia en dejú (glucèmia >300mg/dl) (podent-se avaluar un altre dia).
- Presència de complicacions macroangiopàtiques (cardiopatia isquèmica, accident cerebrovascular, malaltia arterial perifèrica) segons la història clínica del pacient.
- Híper o hipotiroïdisme (podent ser inclosos els malalts amb hipotiroïdisme amb funció tiroïdal normal i sense canvis en el tractament amb levotiroxina en els últims tres mesos).
- Altres malalties immunològiques associades a la DM1 (malaltia d'Addison, celiaquia o menopausa precoç)
- Pèrdua de pes significativa durant els últims 3 mesos (>3%).

7. Mètodes

- Hepatopatia crònica i IRC (Creatinina > 1,3mg/dl en homes o >1,1mg/dL en dones).
- Presència de malalties inflamatòries agudes o cròniques.
- Tractament amb glucocorticoides en els últims 6 mesos.
- Neoplàsia en els últims 5 anys (excloent el carcinoma basocel·lular cutani).
- Intervenció quirúrgica o ingrés hospitalari en els últims dos mesos (podent-se avaluar posteriorment).
- Malalties infeccioses agudes en l'últim mes (podent-se avaluar posteriorment).
- Consum d'alcohol >40g/dia.
- Arítmies cardíques (excepte extrasistòlia supraventricular aïllada).

7.3. Aspectes ètics

El protocol va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital de Sabadell. Es va informar de les característiques de l'estudi i es va obtenir el consentiment informat per escrit de tots els participants inclosos en l'estudi. El protocol es va desenvolupar d'acord amb la Declaració de Hèlsinki. L'estudi es va realitzar d'acord amb la normativa legal vigent (Llei de Recerca Biomèdica 14/2007).

7.4. Avaluacions dels grups d'estudi

Anamnesi

Es va realitzar la recollida de les següents dades: edat, sexe, consum de tabac, ingesta d'alcohol, antecedents patològics i tractament mèdic habitual i avaluació de l'activitat física mitjançant el qüestionari validat IPAQ (Qüestionari Internacional d'Activitat Física) (246). En els malalts amb DM1 es va enregistrar l'any del diagnòstic de la malaltia.

Exploració física: mesures antropomètriques

Es van determinar el pes i la talla, l'IMC, els diàmetres de cintura i de maluc (amb una cinta mètrica a l'alçada del melic i els trocànters, respectivament).

Pressió arterial braquial

Es va determinar utilitzant sempre el mateix dispositiu oscil·lomètric semiautomàtic i validat (Omron 705 CP, Omron Healthcare, Kyoto, Japó). Els participants van estar asseguts i en repòs durant 5 minuts en una habitació tranquil·la, després se'ls van realitzar tres preses de pressió sobre la artèria braquial a intervals de tres minuts. La mitjana de les dues últimes determinacions es va considerar com la PA braquial definitiva. La PA mitjana es va calcular segons la fórmula establerta: $1/3$ de la PAS + $2/3$ de la PAD. Es van definir com a hipertensos aquelles persones amb una PA superior o igual a 140/90 o que estiguessin tractats amb qualsevol fàrmac antihipertensiu (178).

Estudi de ECG

Després de l'apartat anterior es va realitzar un ECG amb el subjecte en decúbit supí per tal de descartar qualsevol tipus d'arítmia cardíaca, així com la presència d'alteracions de la repolarització suggestives d'isquèmia (presència d'ones Q d'origen isquèmic, depressió del segment ST, canvis de les ones T o bloqueig complet de branca esquerra).

Avaluació de les complicacions cròniques microvasculars

En les persones amb DM1, es va avaluar la presència de complicacions cròniques microangiopàtiques. La polineuropatia perifèrica es va avaluar mitjançant un protocol basat en dues etapes que combinava el qüestionari per neuropatia MNSI (*Michigan Neuropathy Screening Instrument*) i una exploració física, tal i com ha descrit el nostre grup prèviament (237). La nefropatia diabètica es va avaluar mitjançant la mesura del quocient albúmina/creatinina en orina (primera micció del matí). Les persones amb un quocient superior a 30mg d'albúmina/g de creatinina (com a mínim en dues determinacions separades 3-6 mesos, tenint en compte les determinacions prèvies que constaven en la història clínica de cada pacient) o en tractament previ amb inhibidors de l'enzim de conversió de l'angiotensina o antagonistes del receptor de l'angiotensina II (únicament per micro o macroalbuminúria) es van considerar que presentaven nefropatia diabètica (247). La presència de retinopatia es va valorar tenint en compte els registres a l'últim any a les històries del Servei d'Oftalmologia. Les

Es van utilitzar unes sondes pneumàtiques col·locades a nivell del dit índex d'ambdues mans per mesurar els canvis d'amplitud de l'ona del pols en les artèries digitals, abans i després del període d'hiperèmia reactiva. Es va col·locar una sonda pneumàtica en el dit índex d'ambdues mans i es va enregistrar el to arterial perifèric durant el repòs (cinc minuts). Posteriorment a l'enregistrament basal, el flux arterial del braç no dominant es va ocloure durant cinc minuts amb un esfigmomanòmetre inflat 40mmHg per sobre de la xifra de PAS. Després, l'esfigmomanòmetre es va desinflar ràpidament, per permetre la resposta hiperèmica reactiva. L'amplitud de l'ona del pols es va enregistrar durant cinc minuts més post-oclusió. L'índex RH-PAT es va calcular automàticament dividint la mitjana del pols digital post-oclusió (hiperèmia reactiva) respecte la basal, corregit pel braç contra lateral (control). A valors més baixos de l'índex RH-PAT, més disfunció endotelial.

Estimació de la resistència a la insulina

Es va realitzar una estimació de la resistència a la insulina, mitjançant l'equació de Williams *et al.* validada per individus amb DM1 (118), i ja prèviament utilitzada pel nostre grup en diversos estudis (233; 248; 249). L'equació estima la resistència a la insulina tenint en compte tres paràmetres: l'índex cintura-maluc, la presència d'HTA i el valor d'HbA1c.

$$eGDR = 24,31 - 12,22 \times (\text{índex cintura-maluc}) - 3,29 \times (\text{HTA si/no}) - 0,57 \times (\text{HbA1c})$$

Determinacions analítiques

Després dels apartats anteriors, es va realitzar una extracció de sang per obtenir mostres de sèrum i plasma. Totes les determinacions analítiques es van realitzar en dejú. En les dones es van realitzar durant la fase fol·licular del cicle menstrual (entre el 5è i 10è dia).

Amb una part d'aquestes mostres es van realitzar les següents determinacions el mateix dia de l'extracció: hemograma, glucèmia plasmàtica, HbA1c, perfil lipídic convencional (colesterol, triglicèrids, colesterol HDL, colesterol LDL), natrèmia, potassèmia, AST, ALT, GGT i creatinina. L'orina obtinguda en la primera micció del matí es va utilitzar per determinar el quocient albúmina/creatinina en orina. La HbA1c es va

determinar mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (Menarini Diagnostics, Florència, Itàlia). El colesterol total, els triglicèrids, i el colesterol LDL i HDL es van determinar mitjançant mètodes enzimàtics estàndards. La resta de mostres sanguínies es van emmagatzemar a -80°C , per a la posterior determinació en sèrum dels marcadors d'ISBG i dels de disfunció endotelial (realitzades a l'Hospital Joan XXIII de Tarragona).

Marcadors d'inflamació sistèmica de baix grau

La PCRus es va determinar per immunonefelometria altament sensible (Siemens, Munic, Alemanya). La determinació d'IL-6 es va realitzar mitjançant un ELISA (R&D Systems, Oxon, Regne Unit), de la mateixa manera que es van realitzar les determinacions dels sR1TNF α (Hycultbiotech, UDEN, Països Baixos) i sR2TNF α (R&D Systems, Oxon, Regne Unit). La determinació del sTWEAK i el CD163 es va realitzar mitjançant l'assaig Human DuoSet ELISA (R&D Systems, Oxon, Regne Unit).

Marcadors de disfunció endotelial

Es van determinar les concentracions sèriques de tres molècules d'adhesió implicades en la disfunció endotelial mitjançant un ELISA: ICAM-1 (Boster Biological Technology, Wuhan, China), VCAM-1 (Boster Biological Technology, Wuhan, China) i E-Selectina (Boster Biological Technology, Wuhan, China).

7.5. Anàlisi estadística

Càlcul de la mostra

Es va calcular que el nombre d'individus necessari per trobar una diferència en la VOPa de 0,5 m/s entre persones amb DM1 i el grup control i de forma estratificada per sexe havia de ser de 34 per cada grup ($\alpha = 0,05$ i $\beta = 0,20$).

Anàlisi de resultats

Les dades estan presentades en percentatges per les variables qualitatives, mitjana (desviació estàndard) per les variables quantitatives distribuïdes de forma normal o mediana (rang interquartil) per les no distribuïdes de forma normal. Donat que existeixen estudis a favor de diferències entre sexes pel que fa a la malaltia

cardiovascular, i especialment en la DM, es va testar inicialment la interacció entre ambdues variables per cadascun dels paràmetres analitzats. En aquells aspectes en que la interacció DM1*sexe era significativa, es va realitzar l'anàlisi estadístic estratificat per sexe.

Per realitzar les comparacions entre els dos grups, en primer lloc es van analitzar si totes les variables enregistrades seguien o no una distribució normal (test de *Kolmogorov-Smirnoff*). En cas de que no la seguissin, es va realitzar una transformació logarítmica per utilitzar proves paramètriques o bé es van analitzar amb proves no paramètriques. Si seguien una distribució normal es va utilitzar la prova de la *t de Student* per comparar tots dos grups. En el cas de que no la seguien, es van utilitzar proves no paramètriques (*U de Mann-Whitney*). Les variables qualitatives es van comparar amb la prova de la χ^2 o amb el *test de Fisher* (mostres petites).

Les correlacions entre les variables analitzades es van realitzar amb els coeficients de correlació de *Pearson* o *Spearman*, segons correspongués. Es van utilitzar models de regressió lineal per ajustar pels possibles factors de confusió. Per avaluar les diferències entre grups, ajustant per la resta de factors de confusió, es van utilitzar com a variables dependents, la VOPa (variable principal), els marcadors d'ISBG i els paràmetres de disfunció endotelial (variables secundàries). Per avaluar la contribució dels diferents mecanismes fisiopatològics a l'increment de la VOPa, tenint en compte la resta de factors de risc cardiovascular clàssics, es va utilitzar com a variable dependent, la VOPa (variable principal) i com a variables independents, els marcadors sèrics d'ISBG i els paràmetres de disfunció endotelial (variables secundàries) respectivament, segons cada objectiu. Les variables independents incloses en els models de regressió lineal es van seleccionar en base a les correlacions univariades o en funció de les variables potencialment relacionades amb la variable dependent avaluada des d'una perspectiva clínica.

Donat que tant els marcadors sèrics d'ISBG com els de disfunció endotelial només es van mesurar una vegada, la possible associació amb la RA podria haver estat subestimada. Per aquest motiu es van calcular dos *Z scores* generals: un per la ISBG i un altre per la disfunció endotelial. En primer lloc, es va calcular un *Z score* per a cada marcador seguint la següent fórmula: (valor de l'individu – mitjana de la població) / desviació estàndard. Posteriorment es van calcular els *scores* generals per ISBG: (Z

$score$ de PCRus + Z $score$ IL-6 + Z $score$ sR1TNF α + Z $score$ sR2TNF α)/4 i per disfunció endotelial: (Z $score$ ICAM-1 + Z $score$ VCAM-1 + Z $score$ E-Selectina) /3.

Es va utilitzar el paquet *IBM SPSS Statistics* (v19.0 per a Mac; SPSS, Inc, IBM Company) per la realització de tots els càlculs. Totes les p van ser bilaterals i es van considerar com a estadísticament significatives per a un valor <0,05.

8. Resultats

Objectius 1 i 2:

Article 1:

Llauradó G, Ceperuelo-Mallafré V, Vilardell C, Simó R, Freixenet N, Vendrell J, González-Clemente JM. Arterial stiffness is increased in patients with type 1 diabetes without cardiovascular disease. A potential role of low-grade inflammation. *Diabetes Care* 2012; 35: 1083-9.

Arterial Stiffness Is Increased in Patients With Type 1 Diabetes Without Cardiovascular Disease

A potential role of low-grade inflammation

GEMMA LLAURADÓ, MD¹
 VICTÒRIA CEPERUELO-MALLAFRÉ, MD, PHD^{2,3}
 CARMÉ VILARDELL, MD, PHD⁴
 RAFAEL SIMÓ, MD, PHD⁵
 NÚRIA FREIXENET, MD¹
 JOAN VENDRELL, MD, PHD³
 JOSÉ MIGUEL GONZÁLEZ-CLEMENTE, MD, PHD¹

OBJECTIVE—To investigate the relationship between arterial stiffness and low-grade inflammation in subjects with type 1 diabetes without clinical cardiovascular disease.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—Sixty-eight patients with type 1 diabetes and 68 age- and sex-matched healthy subjects were evaluated. Arterial stiffness was assessed by aortic pulse wave velocity (aPWV). Serum concentrations of high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), interleukin (IL)-6, and soluble fractions of tumor necrosis factor- α receptors 1 and 2 (sTNF α R1 and sTNF α R2, respectively) were measured. All statistical analyses were stratified by sex.

RESULTS—Subjects with diabetes had a higher aPWV compared with healthy control subjects (men: 6.9 vs. 6.3 m/s, $P < 0.001$; women: 6.4 vs. 6.0 m/s, $P = 0.023$). These differences remained significant after adjusting for cardiovascular risk factors. Men with diabetes had higher concentrations of hsCRP (1.2 vs. 0.6 mg/L; $P = 0.036$), IL-6 (0.6 vs. 0.3 pg/mL; $P = 0.002$), sTNF α R1 (2,739 vs. 1,410 pg/mL; $P < 0.001$), and sTNF α R2 (2,774 vs. 2,060 pg/mL; $P < 0.001$). Women with diabetes only had higher concentrations of IL-6 (0.6 vs. 0.4 pg/mL; $P = 0.039$). In men with diabetes, aPWV correlated positively with hsCRP ($r = 0.389$; $P = 0.031$) and IL-6 ($r = 0.447$; $P = 0.008$), whereas in women with diabetes no significant correlation was found. In men, multiple linear regression analysis showed that the following variables were associated independently with aPWV: age, BMI, type 1 diabetes, and low-grade inflammation ($R^2 = 0.543$). In women, these variables were age, BMI, mean arterial pressure, and type 1 diabetes ($R^2 = 0.550$).

CONCLUSIONS—Arterial stiffness assessed as aPWV is increased in patients with type 1 diabetes without clinical cardiovascular disease, independently of classical cardiovascular risk factors. In men with type 1 diabetes, low-grade inflammation is independently associated with arterial stiffness.

It is well established that type 2 diabetes is a risk factor for cardiovascular disease. However, it is less well known that the relative risk of cardiovascular

disease in type 1 diabetes can be as much as 10-fold greater than in the healthy population, especially in women (1), being even greater than in type 2 diabetes (2).

Consequently, cardiovascular disease is the major cause of mortality in type 1 diabetes (2). Diabetes results in an accelerated arteriosclerotic process, which is not fully explained by classical cardiovascular risk factors. As a result, the pathophysiological mechanisms underlying cardiovascular events in type 1 diabetes are not completely understood.

Arterial stiffness is an early sign of arteriosclerosis (3), and its study would be appropriate for investigating the arteriosclerotic mechanisms long before any cardiovascular event occurs. Arterial stiffness predicts cardiovascular events independently of classical cardiovascular risk factors in several populations (see below). Therefore, it can be assumed that it reflects the deleterious effect of all cardiovascular risk factors (known and unknown) on the arterial wall. The gold standard for measuring central arterial stiffness is aortic pulse wave velocity (aPWV), according to a recent consensus (4). aPWV independently predicts cardiovascular events and mortality in the general population, in the elderly, in hypertensive individuals, in subjects with end-stage renal failure, and in subjects with type 2 diabetes (5).

Finally, little is known regarding factors involved in the pathophysiology of arterial stiffness in type 1 diabetes. One of these factors could be low-grade inflammation. High-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) is the most established downstream marker of low-grade inflammation and has been reported to be a strong predictor of cardiovascular outcomes (6). The primary proinflammatory cytokines interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α are the main inducers for the hepatic synthesis of hsCRP (7). Although there is less evidence in comparison with hsCRP, both of them also have been associated with the prediction of cardiovascular outcomes (8–10). Low-grade inflammation also has been associated with the development of both micro- and macrovascular complications in type 1 diabetes (11). Indeed, low-grade inflammation impairs endothelial function and has been associated

From the ¹Department of Diabetes, Endocrinology, and Nutrition, Hospital of Sabadell, Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí (Universitat Autònoma de Barcelona), Sabadell, Spain; the ²Centro de Investigación Biomédica en Red-Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERObn), Hospital Clínico Virgen de la Victoria, Málaga, Spain; the ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, Institut Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; the ⁴Diabetes, Endocrinology, and Nutrition Unit, Hospital Sant Joan de Déu de Manresa, Xarxa Assistencial Althaia, Manresa, Spain; and the ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) and Diabetes and Metabolism Research Unit, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Corresponding author: José Miguel González-Clemente, josmi.gonza@gmail.com.

Received 22 August 2011 and accepted 6 January 2012.

DOI: 10.2337/dc11-1475

© 2012 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

Arterial stiffness, inflammation, and type 1 diabetes

with an increase in aPWV in healthy subjects (12), in hypertensive individuals (13), and in subjects with chronic kidney disease (14) or with metabolic syndrome (15). No such evidence exists in type 1 diabetes; however, recently an activation of the TNF α system has been reported in association with an increase in brachial PP, a surrogate marker of arterial stiffness, in normotensive subjects with type 1 diabetes (16).

Our main objective was to evaluate aPWV as a measure of arterial stiffness in a group of subjects with type 1 diabetes without clinical cardiovascular disease and to explore its relationship with biomarkers of low-grade inflammation. Because the role of low-grade inflammation in the atherosclerotic process seems to be different in men and women (17), our study was stratified by sex, and the sample size was calculated taking this stratification into account.

RESEARCH DESIGN AND

METHODS—Sixty-eight patients with type 1 diabetes (34 men and 34 women), aged 18–65 years, and 68 age- and sex-matched healthy subjects were included in our study. None of them had any condition associated with an inflammatory response (e.g., acute or chronic inflammatory infectious diseases) or had received anti-inflammatory treatment in the previous 6 months. None of them had any clinical cardiovascular disease. Subjects with type 1 diabetes were consecutively recruited from our outpatient clinic, and all had at least 1 year of duration/evolution of diabetes. The control group was recruited from hospital staff members and their relatives and friends.

After an overnight fast, venous blood samples were taken, and aliquots of plasma and serum were stored at -80°C until processing. In women, all measurements were conducted during the follicular phase of the menstrual cycle. The following information was recorded using a predefined standardized form: sex, age, diabetes duration, BMI, waist-to-hip ratio, systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP, respectively), and mean arterial pressure (MAP; defined as $1/3\text{ SBP} + 2/3\text{ DBP}$ – physical activity [International Physical Activity Questionnaire], cigarette smoking, alcohol intake, insulin dose or the use of any other medical treatment, HbA $_{1c}$, lipid profile, serum concentrations of hsCRP, IL-6, soluble fractions of the TNF α receptors 1 and 2 [sTNF α R1 and sTNF α R2, respectively],

and microvascular complications [only in the cases]). Hypertension was defined as having blood pressure $>140/90$ mmHg (18) and/or being under antihypertensive treatment. Dyslipidemia was defined as having concentrations of total cholesterol >5.2 mmol/L, triglycerides >1.7 mmol/L, HDL cholesterol <1.03 mmol/L, LDL cholesterol >3.4 mmol/L (19), and/or receiving drug treatment for dyslipidemia.

The study protocol was approved by our hospital's ethics committee and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All subjects gave their informed consent before participating in the study.

Assessment of microvascular complications

Peripheral polyneuropathy was assessed through a previously described two-step protocol combining the 15-item Michigan Neuropathy Screening Instrument and a physical examination evaluation (16). Retinopathy was classified according to the data from our department database. Subjects were classified into the following three groups according to the degree of retinopathy: no retinopathy, nonproliferative retinopathy, or proliferative retinopathy. Nephropathy was evaluated by the measurement of urinary albumin excretion. Subjects with a urinary albumin-to-creatinine ratio >3.4 mg/mmol (20), or those who previously were treated with converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers (for microalbuminuria or macroalbuminuria), were considered as having diabetic nephropathy.

Assessment of arterial stiffness

Measurement of aPWV. We measured brachial blood pressure three times with the subjects in a sitting position; the mean of the last two measurements was used in all calculations. Subjects rested in the supine position, and measurements were taken immediately after the determination of blood pressure in accordance with the recommendations of the recent consensus on arterial stiffness (4). Subjects were asked to refrain from smoking and from eating or taking caffeine beverages at least 3 h before measurements. aPWV was determined by sequential applanation tonometry (Millar tonometer, SPC-301; Millar Instruments, Houston, TX) at the carotid and femoral arteries gated to a three-lead electrocardiogram using the SphygmoCor device (SphygmoCor; AtCor, Sydney, Australia). Time delay was calculated

using a foot-of-the-wave method. The surface distance from the suprasternal notch to each recording site was measured. The total transit distance was calculated by subtracting the sternal notch to carotid distance from the sternal notch to femoral distance. aPWV was calculated using the total transit distance divided by the time delay. aPWVs not achieving the automatic quality controls specified by the SphygmoCor software were rejected. The mean of two aPWV measurements was taken for each subject for all calculations. Data were available for all the participants included in the study.

Laboratory analyses

HbA $_{1c}$ was determined by high-performance liquid chromatography (Menarini Diagnostics, Firenze, Italy). Total serum cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol, and LDL cholesterol were measured using standard enzymatic methods. hsCRP was determined by immunonephelometry (Siemens, Munich, Germany). IL-6 was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Oxon, U.K.) as were sTNF α R1 (Hycultbiotech, Uden, The Netherlands) and sTNF α R2 (R&D Systems).

Statistical analyses

We calculated that the number of subjects needed to find a difference of 0.5 m/s in aPWV between men and women with type 1 diabetes and their respective control subjects would be 34 in each of the four groups ($\alpha = 0.05$ and $\beta = 20\%$). Data are presented as percentages, means (SD) for variables normally distributed, or medians (interquartile range) for variables not normally distributed. All data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. To improve skewedness and kurtosis, variables not normally distributed were log transformed. The analyses were performed stratified by sex. Differences between patients with type 1 diabetes and control subjects were analyzed using the χ^2 test for comparisons of proportions and unpaired *t* tests or Mann-Whitney *U* tests for comparisons of quantitative variables, as needed. In both men and women, we assessed the potential relationships between arterial stiffness and all inflammatory-related serum proteins evaluated through univariate, nonparametric correlations and linear regression models to adjust for potential confounders. Variables for linear regression analyses were selected based on univariate correlation analyses

and those variables known or likely to be associated with arterial stiffness. In the final model, the variables included for both sexes were age, smoking status, physical activity, hypertension (no/yes), dyslipidemia (no/yes), BMI, MAP, total cholesterol, log triglycerides, logHDL cholesterol, type 1 diabetes, and low-grade inflammation. Because inflammatory-related serum proteins only were measured once, the association (if any) of low-grade inflammation with arterial stiffness would tend to be underestimated. To address this issue, a z score was calculated for each inflammatory-related serum protein evaluated as the following: (value in the individual – mean value in the study population)/SD. Subsequently, the low-grade inflammation general score was calculated as the following: (z score of hsCRP + z score of IL-6 + z score of sTNF α R1 + z score of sTNF α R2)/4. In addition, it is reasonable to consider that the integrated information obtained using these four selected proinflammatory markers is better than if we had used each parameter separately. The IBM SPSS Statistics (version 19 for Macintosh; IBM, Armonk, NY) was used for all calculations. All P values were two sided, and a P value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS—We evaluated 68 patients with type 1 diabetes and 68 age- and sex-matched healthy subjects ($n = 136$). Their clinical and analytical characteristics are shown in Table 1 for men and Table 2 for women. Of 136 subjects, 8 were on antihypertensive drugs (7 patients and 1 control subject), 15 were on statins (14 patients), and 6 were on antiplatelet drugs (all with diabetes). A total of 13 patients were on levothyroxine treatment (8 with diabetes; range dose 25–150 μ g/day), but all had normal serum concentrations of thyroxine and thyrotropin.

Subjects with type 1 diabetes, compared with healthy control subjects, showed higher values of fasting plasma glucose and HbA_{1c}. Men with type 1 diabetes were more hypertensive than control subjects and had higher values of SBP. Women with type 1 diabetes presented higher BMI values. Subjects with type 1 diabetes presented a better nonsignificant lipid profile than control subjects, probably as a result of the significant number of patients treated with statins.

Subjects with type 1 diabetes (men and women) had a higher aPWV compared with their respective control subjects (men: 6.9 m/s [6.5–7.9] vs. 6.3 m/s

Table 1—Clinical characteristics of study population (men)

Men	Healthy control subjects	Type 1 diabetic subjects	P
n	34	34	
Age (years)	35.6 (9.0)	36.5 (8.9)	0.963
Alcohol intake (g/day)	2.9 (0–7.1)	5.7 (2.9–15.0)	0.008
Current smokers [n (%)]	7 (20.6)	12 (35.3)	0.089
Physical activity (METs min/week)	1,395.0 (779.6–2,265.8)	1,903.0 (910.5–2,776.5)	0.270
Family history of coronary heart disease [n (%)]	2 (5.9)	2 (5.9)	1.000
Family history of type 2 diabetes [n (%)]	5 (14.7)	7 (20.6)	0.525
Family history of type 1 diabetes [n (%)]	0 (0)	2 (5.9)	0.493
Hypertension [n (%)]	3 (8.8)	13 (38.2)	0.004
Dyslipidemia [n (%)]	17 (50.0)	18 (52.9)	0.808
Diabetes duration (years)	—	14.00 (8.50–20.50)	—
Microvascular complications [n (%)]	—	9 (26.5)	—
Retinopathy [n (%)]	—	5 (14.7)	—
None [n (%)]	—	29 (85.3)	—
Non proliferative [n (%)]	—	4 (11.8)	—
Proliferative [n (%)]	—	1 (2.9)	—
Nephropathy [n (%)]	—	6 (17.6)	—
Peripheral polyneuropathy [n (%)]	—	0 (0)	—
BMI (kg/m ²)	25.0 (2.8)	26.1 (3.3)	0.138
Waist (cm)	91.0 (10.1)	90.6 (11.3)	0.862
Waist-to-hip ratio	0.90 (0.10)	0.91 (0.07)	0.532
SBP (mmHg)	124.9 (9.5)	131.7 (10.8)	0.008
DBP (mmHg)	73.8 (8.0)	76.7 (7.0)	0.124
MAP (mmHg)	90.8 (8.1)	95.0 (7.3)	0.029
Fasting plasma glucose (mmol/L)	4.76 (0.57)	8.71 (3.76)	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	5.08 (1.54)	4.74 (0.82)	0.260
Triglycerides (mmol/L)	0.88 (0.69–1.29)	0.83 (0.69–1.14)	0.585
HDL cholesterol (mmol/L)	1.31 (1.13–1.49)	1.31 (1.11–1.76)	0.560
LDL cholesterol (mmol/L)	2.81 (2.26–3.59)	2.61 (2.23–3.13)	0.213
HbA _{1c} (%)	5.4 (5.1–5.5)	7.3 (6.6–7.9)	<0.001
Urinary albumin-to-creatinine ratio (mg/mmol)	0.39 (0.30–0.51)	0.28 (0.20–0.47)	0.125
aPWV (m/s)	6.3 (5.7–6.7)	6.9 (6.5–7.9)	<0.001
hsCRP (mg/L)	0.6 (0.3–1.1)	1.2 (0.5–2.9)	0.036
IL-6 (pg/mL)	0.3 (0.2–0.6)	0.6 (0.3–1.0)	0.002
sTNF α R1 (pg/mL)	1,410 (1,113–2,308)	2,739 (1,748–3,224)	<0.001
sTNF α R2 (pg/mL)	2,060 (1,870–2,365)	2,774 (2,267–3,064)	<0.001

Data are percentages, means (SD), or medians (interquartile range), unless otherwise indicated.

[5.7–6.7], $P < 0.001$; women: 6.4 m/s [5.9–7.5] vs. 6.0 m/s [5.3–6.7], $P = 0.023$). These differences remained significant after adjusting for classical cardiovascular risk factors (age, physical activity, smoking status, hypertension, dyslipidemia, and BMI) in both sexes (men: $P = 0.001$; women: $P = 0.025$). Men with type 1 diabetes showed higher serum concentrations of hsCRP, IL-6,

sTNF α R1, and sTNF α R2 (Table 1). Women with type 1 diabetes only had higher concentrations of IL-6 (Table 2).

In type 1 diabetes, univariate correlations showed that aPWV correlated positively with age, BMI, waist, waist-to-hip ratio, SBP, MAP, and total and LDL cholesterol (Table 3). In healthy subjects, aPWV was associated with age, BMI, waist, total and LDL cholesterol, and fasting

Arterial stiffness, inflammation, and type 1 diabetes

Table 2—Clinical characteristics of study population (women)

Women	Healthy control subjects	Type 1 diabetic subjects	P
n	34	34	
Age (years)	35.3 (11.4)	35.2 (11.2)	0.971
Alcohol intake (g/day)	1.4 (0–2.9)	0.0 (0.0–0.7)	0.001
Current smokers [n (%)]	9 (26.5)	12 (35.3)	0.536
Physical activity (METs min/week)	1,386.0 (770.3–2,079.0)	1,386.0 (672.8–1,686.0)	0.442
Family history of coronary heart disease [n (%)]	4 (11.8)	1 (2.9)	0.356
Family history of type 2 diabetes [n (%)]	7 (20.6)	9 (26.5)	0.567
Family history of type 1 diabetes [n (%)]	1 (2.9)	3 (8.8)	0.614
Hypertension [n (%)]	0 (0)	4 (11.8)	0.114
Dyslipidemia [n (%)]	17 (50)	14 (41.2)	0.465
Diabetes duration (years)	—	12.00 (6.75–18.00)	—
Microvascular complications [n (%)]	—	7 (20.6)	—
Retinopathy [n (%)]	—	5 (14.7)	—
None [n (%)]	—	29 (85.3)	—
Non proliferative [n (%)]	—	2 (5.9)	—
Proliferative [n (%)]	—	3 (8.8)	—
Nephropathy [n (%)]	—	3 (8.8)	—
Peripheral polyneuropathy [n (%)]	—	0 (0)	—
Body mass index (kg/m ²)	23.0 (3.1)	25.3 (3.9)	0.009
Waist (cm)	76.3 (6.9)	80.0 (10.3)	0.092
Waist-to-hip ratio	0.80 (0.06)	0.81 (0.07)	0.529
SBP (mmHg)	116.3 (9.5)	118.3 (9.6)	0.379
DBP (mmHg)	67.9 (7.8)	69.1 (7.9)	0.508
MAP (mmHg)	84.0 (7.9)	85.5 (7.5)	0.417
Fasting plasma glucose (mmol/L)	4.59 (0.48)	9.59 (3.55)	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	5.18 (1.11)	4.82 (0.92)	0.146
Triglycerides (mmol/L)	0.72 (0.56–0.93)	0.70 (0.53–0.84)	0.484
HDL cholesterol (mmol/L)	1.77 (1.46–1.99)	1.80 (1.49–2.20)	0.377
LDL cholesterol (mmol/L)	2.78 (2.18–3.48)	2.47 (1.90–2.97)	0.056
HbA _{1c} (%)	5.3 (5.2–5.4)	7.8 (7.1–9.1)	<0.001
Urinary albumin-to-creatinine ratio (mg/mmol)	0.38 (0.27–0.65)	0.47 (0.30–0.91)	0.315
aPWV (m/s)	6.0 (5.3–6.7)	6.4 (5.9–7.5)	0.023
hsCRP (mg/L)	0.9 (0.4–2.8)	1.4 (0.7–2.5)	0.447
IL-6 (pg/mL)	0.4 (0.2–0.6)	0.6 (0.3–1.2)	0.039
sTNFαR1 (pg/mL)	1,917 (1,355–3,295)	2,262 (1,366–2,978)	0.864
sTNFαR2 (pg/mL)	2,215 (1,897–2,700)	2,295 (2,018–3,006)	0.320

Data are percentages, means (SD), or medians (interquartile range), unless otherwise indicated.

plasma glucose. In men with type 1 diabetes, aPWV correlated positively with hsCRP ($r = 0.389$; $P = 0.031$) and IL-6 ($r = 0.447$; $P = 0.008$). However, no significant association between aPWV and inflammatory-related serum proteins was found in healthy control subjects (men and women) or in women with type 1 diabetes. In women with type 1 diabetes, aPWV correlated positively with diabetes

duration ($r = 0.538$; $P = 0.001$). No association between aPWV and chronic diabetes complications was found either in men or women.

To evaluate the main predictors of aPWV, multiple linear regression analyses were performed. Inflammatory-related serum proteins were tested in all these models as well as the low-grade inflammation general score previously described.

In men, the best multiple linear regression model showed that the independent predictors of aPWV were age, BMI, type 1 diabetes, and the low-grade inflammation general score ($R^2 = 0.543$; $P < 0.001$). In women, age, BMI, MAP, and type 1 diabetes were the independent predictors for aPWV ($R^2 = 0.550$; $P < 0.001$) (Table 4). Even after adjusting for metabolic control (logHbA_{1c}) these results did not change.

CONCLUSIONS—The main finding of the current study is that arterial stiffness (assessed as aPWV) is increased in subjects with type 1 diabetes compared with age- and sex-matched healthy subjects, even after controlling for classic cardiovascular risk factors. Of note is the fact that our study suggests an association, for the first time, between arterial stiffness and low-grade inflammation in men with type 1 diabetes.

Our results confirm, and reinforce in a larger population, previous studies showing an increase in arterial stiffness assessed as aPWV in adult subjects with type 1 diabetes when compared with healthy subjects (21,22). We also found that patients with type 1 diabetes have higher concentrations of inflammatory-related serum proteins than healthy control subjects, as previously reported in several studies (23,24). Men with type 1 diabetes had higher concentrations of hsCRP, IL-6, sTNFαR1, and sTNFαR2 than their control subjects. However, women only showed differences for IL-6. Despite these discrepancies, we found no differences between sexes within the same group. Previous studies have found higher inflammatory parameters in type 1 diabetic women than in men (24–26). Nevertheless, other authors have failed to report such differences, which agrees with our results (27–29).

Our study shows, for the first time, an association between arterial stiffness and low-grade inflammation in subjects with type 1 diabetes. We have observed that men with type 1 diabetes have higher aPWV and higher concentrations of inflammatory-related serum proteins than control subjects. When we adjusted these data, a general score of low-grade inflammation was an independent predictor of aPWV, taking into account diabetes status. Similar associations between aPWV and inflammatory-related serum proteins have been previously reported in healthy individuals (12), in hypertensive subjects (13), in subjects with chronic kidney disease (14), and in individuals with metabolic syndrome (15) for both sexes.

Table 3—Spearman correlation coefficients for the association between aPWV and cardiovascular risk factors and low-grade inflammation (stratified for diabetes status and sex)

	Men		Women	
	Healthy	Type 1 diabetes	Healthy	Type 1 diabetes
Age (years)	0.598 (<0.001)	0.515 (0.003)	0.577 (0.005)	0.621 (<0.001)
Smoking (no/yes)	0.248 (0.158)	0.113 (0.537)	0.266 (0.128)	−0.152 (0.391)
Physical activity	−0.257 (0.142)	0.077 (0.677)	0.262 (0.354)	−0.004 (0.983)
BMI (kg/m ²)	0.439 (0.009)	0.515 (0.002)	0.542 (0.001)	0.412 (0.015)
Waist (cm)	0.461 (0.006)	0.567 (<0.001)	0.620 (0.001)	0.541 (0.001)
Waist-to-hip ratio	0.436 (0.010)	0.412 (0.016)	0.213 (0.227)	0.385 (0.024)
SBP (mmHg)	0.249 (0.156)	0.364 (0.037)	0.158 (0.371)	0.528 (0.001)
DBP (mmHg)	0.282 (0.106)	0.279 (0.122)	0.235 (0.182)	0.490 (0.003)
MAP (mmHg)	0.275 (0.115)	0.3470 (0.009)	0.280 (0.109)	0.547 (0.001)
Cholesterol (mmol/L)	0.534 (0.001)	0.498 (0.004)	0.404 (0.018)	0.393 (0.021)
Triglycerides (mmol/L)	0.498 (0.003)	0.017 (0.922)	0.259 (0.139)	−0.113 (0.525)
HDL (mmol/L)	0.019 (0.914)	−0.70 (0.695)	0.154 (0.384)	0.323 (0.062)
LDL (mmol/L)	0.578 (<0.001)	0.460 (0.009)	0.366 (0.033)	0.400 (0.019)
Fasting plasma glucose (mmol/L)	0.465 (0.006)	0.153 (0.389)	0.380 (0.026)	0.137 (0.440)
HbA _{1c} (%)	0.218 (0.215)	0.177 (0.316)	0.328 (0.059)	0.048 (0.786)
hsCRP (mg/L)	0.010 (0.958)	0.389 (0.031)	0.203 (0.249)	0.037 (0.836)
IL-6 (pg/mL)	0.125 (0.482)	0.447 (0.008)	0.225 (0.202)	−0.183 (0.316)
sTNFαR1 (pg/mL)	0.264 (0.167)	0.204 (0.298)	0.255 (0.145)	0.077 (0.664)
sTNFαR2 (pg/mL)	0.070 (0.694)	0.163 (0.407)	0.295 (0.107)	0.224 (0.203)
Low-grade inflammation score	0.248 (0.179)	0.369 (0.035)	0.321 (0.083)	0.051 (0.776)

Data are Spearman correlation coefficients (*P* value).

However, we only observed this association in men. Tsioufis et al. (30) reported similar results in hypertensive patients. They found that hsCRP and adiponectin were independent predictors of aPWV

only in men. Colhoun et al. (31) reported that hsCRP was independently associated with coronary artery calcification (a validated measure of coronary atherosclerosis) only in men with type 1 diabetes.

Table 4—Independent aPWV predictors for the whole population (by sex)

	B (unstandardized)	SD	β (standardized)	<i>P</i>
Men				
log aPWV (<i>R</i> = 0.737; <i>R</i> ² = 0.543)				
Constant	0.586	0.054	—	<0.001
Age	0.003	0.001	0.351	0.001
Low-grade inflammation score	0.028	0.011	0.287	0.019
BMI	0.005	0.002	0.225	0.024
Type 1 diabetes	0.030	0.014	0.246	0.035
Women				
log aPWV (<i>R</i> = 0.741; <i>R</i> ² = 0.550)				
Constant	0.377	0.085	—	<0.001
Age	0.004	0.001	0.509	<0.001
BMI	0.005	0.002	0.227	0.018
MAP	0.002	0.001	0.202	0.032
Type 1 diabetes	0.028	0.014	0.182	0.047

The following variables were adjusted for in this model: age, smoking, physical activity, hypertension (no/yes), dyslipidemia (no/yes), BMI, MAP, total cholesterol, log triglycerides, logHDL cholesterol, type 1 diabetes, and low-grade inflammation score. Only significant variables are shown in the table.

These results indicate that more studies are needed to elucidate the potential gender differences in the pathophysiology of cardiovascular disease in type 1 diabetes.

The exact mechanisms responsible for the increase in arterial stiffness in type 1 diabetes are not fully understood but are likely to reflect a complex interaction between structural and functional changes in the arterial wall. The structural changes are characterized by an overproduction of abnormal collagen and diminished quantities of normal elastin (32). Our results suggest that low-grade inflammation could play a role in the increase of arterial stiffness in type 1 diabetes. However, other mechanisms, such as the accumulation of advanced glycation end products and endothelial dysfunction, also could be involved (32).

Low-grade inflammation has been associated with the presence of a worse cardiovascular profile (33) and the presence of micro- and macrovascular complications in subjects with type 1 diabetes (11). Prospective studies also have demonstrated the predictive value of low-grade inflammation in the development of chronic complications in this disease (34). Our study would be in agreement with these results, arterial stiffness being an early sign of arteriosclerosis.

aPWV predicts cardiovascular events and total and cardiovascular mortality in the general population, in the elderly, in patients with hypertension, in subjects with end-stage renal failure, and in subjects with type 2 diabetes (5). The independent predictive value of arterial stiffness has been demonstrated after adjustment for classical cardiovascular risk factors. This suggests that arterial stiffness measurement could add a value to the classical cardiovascular risk factors in the prediction of cardiovascular risk (35). This may be explained by the fact that arterial stiffness integrates the damage of cardiovascular risk factors (classical and nonclassical) on the aortic wall over a long period of time, whereas cardiovascular risk factors can fluctuate in time, and their values, recorded at the time of risk assessment, may not reflect their real impact in damaging the arterial wall (4). However, prospective studies are needed to establish the prognosis value of aPWV in subjects with type 1 diabetes regarding cardiovascular events. To the best of our knowledge, only one recent prospective study has evaluated the relationship between central arterial stiffness and the prediction of cardiovascular events

Arterial stiffness, inflammation, and type 1 diabetes

in type 1 diabetes. This study showed that central PP was more strongly associated with the prediction of cardiovascular events than AIx, but neither data on aPWV nor markers of low-grade inflammation were reported (36).

The major limitation of our study is its cross-sectional design, which makes it impossible to determine the temporal ordering of the association between arterial stiffness and increased levels of inflammatory-related serum proteins. In addition, its observational design does not allow us to ensure complete control of all the potential (unknown) confounding factors. The concentrations of the inflammatory-related serum proteins were measured only once, which might underestimate the association between them and arterial stiffness. Nevertheless, it should be noted that the low-grade inflammation general score was independently associated with aPWV in the multiple regression analyses.

In conclusion, our study demonstrates that aPWV is increased in subjects with type 1 diabetes compared with age- and sex-matched healthy subjects, even after controlling for classical cardiovascular risk factors. This suggests that the measurement of arterial stiffness could provide some additional information regarding cardiovascular risk in type 1 diabetes. Finally, our study shows, for the first time, that arterial stiffness is associated with an increase in inflammatory-related serum proteins in men with type 1 diabetes. Our findings suggest that arterial stiffness measurement is a useful tool for detecting subclinical arteriosclerosis and making a better cardiovascular prediction in type 1 diabetes. Additional studies exploring not only the link between arterial stiffness and low-grade inflammation but also its potential therapeutic implications are needed.

Acknowledgments—Financial support was provided by the Associació Catalana de Diabetis (Beca Gonçal Lloveras 2008); the Fundació la Marató de TV3-2008 (project no. 081410); FIS PS09/01360, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain; and by an intensification grant to J.M.G.-C. (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

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

G.L. researched data, contributed to the discussion, and wrote, reviewed, and edited the manuscript. V.C.-M. and N.F. researched data. C.V., R.S., and J.V. contributed to the discussion and reviewed and edited the manuscript.

J.M.G.-C. wrote, reviewed, and edited the manuscript and contributed to the discussion. J.M.G.-C. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet* 2006; 367:847–858
- Libby P, Nathan DM, Abraham K, et al.; National Heart, Lung, and Blood Institute; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on Cardiovascular Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on Cardiovascular Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation* 2005;111:3489–3493
- Cavalcante JL, Lima JA, Redheuil A, Al-Mallah MH. Aortic stiffness: current understanding and future directions. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1511–1522
- Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, et al.; European Network for Non-invasive Investigation of Large Arteries. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006;27:2588–2605
- Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1318–1327
- Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, et al.; Emerging Risk Factors Collaboration. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 2010;375:132–140
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–1695
- Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767–1772
- Tuomisto K, Jousilahti P, Sundvall J, Pajunen P, Salomaa V. C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha as predictors of incident coronary and cardiovascular events and total mortality: a population-based, prospective study. *Thromb Haemost* 2006;95:511–518
- Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Med* 2008;5:e78
- Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Fuller JH, Stehouwer CD; EURODIAB Prospective Complications Study Group. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2005;48:370–378
- Nakhai-Pour HR, Grobbee DE, Bots ML, Muller M, van der Schouw YT. C-reactive protein and aortic stiffness and wave reflection in middle-aged and elderly men from the community. *J Hum Hypertens* 2007;21:949–955
- Mahmud A, Feely J. Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension. *Hypertension* 2005; 46:1118–1122
- Lilitkamtakul P, Dhaun N, Melville V, et al. Blood pressure and not uraemia is the major determinant of arterial stiffness and endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease and minimal co-morbidity. *Atherosclerosis* 2011;216: 217–225
- Ferreira I, Boreham CA, Twisk JW, et al. Clustering of metabolic syndrome risk factors and arterial stiffness in young adults: the Northern Ireland Young Hearts Project. *J Hypertens* 2007;25: 1009–1020
- González-Clemente JM, Giménez-Pérez G, Richart C, et al. The tumour necrosis factor (TNF)-alpha system is activated in accordance with pulse pressure in normotensive subjects with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2005;153: 687–691
- Arain FA, Kuniyoshi FH, Abdalrhim AD, Miller VM. Sex/gender medicine: the biological basis for personalized care in cardiovascular medicine. *Circ J* 2009;73: 1774–1782
- Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al.; The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension; The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. 2007 guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2007;28: 1462–1536
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143–3421

20. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes: 2011. *Diabetes Care* 2011;34(Suppl. 1):S11–S61
21. Lacy PS, O'Brien DG, Stanley AG, Dewar MM, Swales PP, Williams B. Increased pulse wave velocity is not associated with elevated augmentation index in patients with diabetes. *J Hypertens* 2004;22:1937–1944
22. Vastagh I, Horváth T, Nagy G, et al. Evolution and predictors of morphological and functional arterial changes in the course of type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2010;26:646–655
23. Schalkwijk CG, Poland DC, van Dijk W, et al. Plasma concentration of C-reactive protein is increased in type 1 diabetic patients without clinical macroangiopathy and correlates with markers of endothelial dysfunction: evidence for chronic inflammation. *Diabetologia* 1999;42:351–357
24. Jenkins AJ, Rothen M, Klein RL, et al.; DCCT/EDIC Research Group. Cross-sectional associations of C-reactive protein with vascular risk factors and vascular complications in the DCCT/EDIC cohort. *J Diabetes Complications* 2008;22:153–163
25. Kilpatrick ES, Keevil BG, Jagger C, Spooner RJ, Small M. Determinants of raised C-reactive protein concentration in type 1 diabetes. *QJM* 2000;93:231–236
26. Mackness B, Hine D, McElduff P, Mackness M. High C-reactive protein and low paraoxonase1 in diabetes as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2006;186:396–401
27. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB; European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet* 1997;349:462–466
28. Lanza GA, Pitocco D, Navarese EP, et al. Association between cardiac autonomic dysfunction and inflammation in type 1 diabetic patients: effect of beta-blockade. *Eur Heart J* 2007;28:814–820
29. Nowak M, Wielkoszyński T, Marek B, et al. Antioxidant potential, paraoxonase 1, ceruloplasmin activity and C-reactive protein concentration in diabetic retinopathy. *Clin Exp Med* 2010;10:185–192
30. Tsioufis C, Dimitriadis K, Selima M, et al. Low-grade inflammation and hypoadiponectinaemia have an additive detrimental effect on aortic stiffness in essential hypertensive patients. *Eur Heart J* 2007;28:1162–1169
31. Colhoun HM, Schalkwijk C, Rubens MB, Stehouwer CD. C-reactive protein in type 1 diabetes and its relationship to coronary artery calcification. *Diabetes Care* 2002;25:1813–1817
32. Ziemán SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:932–943
33. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk C, et al.; EURODIAB Prospective Complications Study. Vascular risk factors and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care* 2003;26:2165–2173
34. Astrup AS, Tarnow L, Pietraszek L, et al. Markers of endothelial dysfunction and inflammation in type 1 diabetic patients with or without diabetic nephropathy followed for 10 years: association with mortality and decline of glomerular filtration rate. *Diabetes Care* 2008;31:1170–1176
35. Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension* 2002;39:10–15
36. Gordin D, Wadén J, Forsblom C, et al.; FinnDiane Study Group. Pulse pressure predicts incident cardiovascular disease but not diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes (The FinnDiane Study). *Diabetes Care* 2011;34:886–891

Objectiu 3:

Article 2:

Llauradó G, González-Clemente JM, Maymó-Masip E, Subías D, Vendrell J, Chacón MR. Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: relationship with cardiovascular risk factors, a case-control study. PLoS One 2012; 7: e43919.

Serum Levels of TWEAK and Scavenger Receptor CD163 in Type 1 Diabetes Mellitus: Relationship with Cardiovascular Risk Factors. A Case-Control Study

Gemma Llauradó^{1*}, José-Miguel González-Clemente¹, Elsa Maymó-Masip², David Subías¹, Joan Vendrell², Matilde R. Chacón^{2*}

1 Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell, Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí (Universitat Autònoma de Barcelona), Sabadell, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, Institut Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

Abstract

Objective: To test the usefulness of serum concentrations of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) and soluble scavenger receptor CD163 (sCD163) as markers of subtle inflammation in patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) without clinical cardiovascular (CV) disease and to evaluate their relationship with arterial stiffness (AS).

Methods: Sixty-eight patients with T1DM and 68 age and sex-matched, healthy subjects were evaluated. Anthropometrical variables and CV risk factors were recorded. Serum concentrations of sTWEAK and sCD163 were measured. AS was assessed by aortic pulse wave velocity (aPWV). All statistical analyses were stratified by gender.

Results: T1DM patients showed lower serum concentrations of sTWEAK (Men: 1636.5 (1146.3–3754.8) pg/mL vs. 765.9 (650.4–1097.1) pg/mL; $p < 0.001$. Women: 1401.0 (788.0–2422.2) pg/mL vs. 830.1 (562.6–1175.9) pg/mL; $p = 0.011$) compared with their respective controls. Additionally, T1DM men had higher serum concentrations of sCD163 (285.0 (247.7–357.1) ng/mL vs. 224.8 (193.3–296.5) ng/mL; $p = 0.012$) compared with their respective controls. sTWEAK correlated negatively with aPWV in men ($r = -0.443$; $p < 0.001$). However, this association disappeared after adjusting for potential confounders. In men, the best multiple linear regression model showed that the independent predictors of sTWEAK were T1DM and WHR ($R^2 = 0.640$; $p < 0.001$). In women, T1DM and SBP were the independent predictors for sTWEAK ($R^2 = 0.231$; $p = 0.001$).

Conclusion: sTWEAK is decreased in T1DM patients compared with age and sex-matched healthy subjects after adjusting for classic CV risk factors, although sTWEAK levels may be partially influenced by some of them. Additionally, T1DM men have higher serum concentrations of sCD163. These results point out an association between the inflammatory system and CV risk in T1DM.

Citation: Llauradó G, González-Clemente J-M, Maymó-Masip E, Subías D, Vendrell J, et al. (2012) Serum Levels of TWEAK and Scavenger Receptor CD163 in Type 1 Diabetes Mellitus: Relationship with Cardiovascular Risk Factors. A Case-Control Study. PLoS ONE 7(8): e43919. doi:10.1371/journal.pone.0043919

Editor: Francesco Dotta, University of Siena, Italy

Received: February 8, 2012; **Accepted:** July 27, 2012; **Published:** August 24, 2012

Copyright: © 2012 Llauradó et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Financial support was provided by: 1) Fundació la Marató de TV3-2008 (Project N° 081410); 2) FIS P509/01360 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain); 3) PI08/0733 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain); 4) PI11/00049 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain); and 5) Matilde R. Chacón is supported by a fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) CP06/00119. CP06/00119 PI08/0733 and PI11/00049 are co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: gllauradoc@gmail.com (GL); mrodriguez.hj23.ics@gencat.cat (MRC)

Introduction

Cardiovascular (CV) disease is the major cause of mortality in type 1 diabetes mellitus (T1DM) [1]. As much as 10% of premature coronary artery disease morbidity and mortality in the general population is due to T1DM, but conventional CV risk factors (CVRF) account for no more than 25% of the excess CV disease risk [2]. As a result, the pathophysiological mechanisms underlying CV events in T1DM are not completely understood.

In recent years, several inflammation-related plasma proteins have been recognised as predictors of CV disease in the context of atherosclerosis in different populations [3]. Thus, T1DM subjects, a score of TNF- α , IL-6 and CRP has been associated with CV

disease [4], focusing attention on chronic inflammation mediated by cytokines in T1DM CV disease.

The tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a relatively new member of the TNF superfamily of cytokines with multiple biological functions, including stimulation of cell growth and angiogenesis, induction of inflammatory cytokines and, under some experimental conditions, stimulation of apoptosis [5]. TWEAK induces production of proinflammatory cytokines, proliferation and migration of cells present in atherosclerotic plaques and increases the expression of metalloproteinases that degrade the extracellular matrix [5]. However, TWEAK plasma levels are diminished in patients with carotid atherosclerosis [6], coronary and peripheral artery disease [7,8] or

in atherosclerotic associated diseases, such as type 2 diabetes (T2DM) or end-stage renal disease [9]. The mechanisms leading to lower TWEAK plasma levels in subjects with atherosclerosis remain poorly understood.

CD163 is a new potential TWEAK scavenger receptor [10]. It has previously been identified as the receptor which uptakes haptoglobin-haemoglobin complexes for the removal and metabolism of the potent antioxidant haemoglobin [11]. A soluble form of CD163 (sCD163) is a normal constituent in plasma and is generated by proteolytic cleavage of CD163 at the cell surface [12]. This receptor is now recognized as an immunomodulator of the atherosclerotic plaque, with pivotal anti-inflammatory and anti-atherogenic properties [13]. sCD163 levels are increased in patients with atherosclerosis [14,15] or atherosclerosis associated diseases, such as T2DM [16].

Our group has recently demonstrated that low-grade inflammation is associated with arterial stiffness (AS) in T1DM [17]. AS is an early sign of atherosclerosis [18] and its study would be appropriate in the investigation of atherosclerotic mechanisms long before any CV event occurs. According to a recent consensus [19], the gold standard for measuring AS is aortic pulse wave velocity (aPWV), and it predicts CV events and mortality independently of classical CVRF in several populations [3].

Because of the great burden of atherosclerosis in T1DM and the suggested association of TWEAK and CD163 with inflammation and CV disease, we carried out a study to gain some insight into the contribution of TWEAK and CD163 in the pathogenesis of CV disease in T1DM. For this purpose, we have determined serum concentrations of soluble TWEAK (sTWEAK) and sCD163 and their relationship with CVRF and AS in a group of subjects with T1DM without clinical CV disease and compared with age and sex-matched healthy subjects.

Methods

Sixty-eight patients with T1DM (34 men and 34 women) aged 18–65 years (type 1 was defined as an onset of diabetes before the age of 36 years and insulin treatment initiated within one year of diagnosis), and 68 age- and sex-matched healthy subjects were included in our study. None of them had any condition associated with an inflammatory response (e.g. acute or chronic infectious diseases) or had received anti-inflammatory treatment in the previous 6 months. None of them had any clinical CV disease. T1DM patients were consecutively recruited from our outpatient clinic and all had at least one year of evolution. The control group was recruited from hospital staff members and their relatives and friends.

The study methods have previously been described in detail [17]. Briefly, the following information was recorded using a predefined standardized form: gender, age, diabetes duration, body mass index (BMI), waist-to-hip ratio (WHR), systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP) and mean arterial pressure (MAP) – defined as $1/3 \text{ SBP} + 2/3 \text{ DBP}$ –, physical activity (IPAQ questionnaire), cigarette smoking, insulin dose or the use of any other drug treatment, and microvascular complications. After an overnight fast, venous blood samples were taken and aliquots of plasma and serum were stored at -80°C until processing. In women, all measurements were done during the follicular phase of the menstrual cycle. HbA1c, lipid profile, serum concentrations of high-sensitivity CRP (hsCRP), IL-6, soluble fractions of the TNF- α receptors 1 and 2 (sTNF α R1 and sTNF α R2), sTWEAK and sCD163 were measured.

To estimate insulin-resistance in T1DM patients, we used the formula proposed by Williams *et al.*, which yields an estimate of the

glucose disposal rate (eGDR) taking into account glycemic control, WHR and blood pressure (eGDR = $24.31 - 12.22 (\text{WHR}) - 3.29 (\text{Hypertension } 0 = \text{No}; 1 = \text{Yes}) - 0.57 (\text{HbA1c})$) [20]. It has been validated against euglycemic-hyperinsulinemic clamp in a group of T1DM subjects clinically similar to the subjects evaluated in the present study. Lower eGDR scores are reflective of greater insulin-resistance.

The study protocol was approved by our hospital Ethics Committee (Clinical Research Ethics Committee of Hospital of Sabadell), and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All subjects gave their written informed consent before participating in the study.

Assessment of microvascular complications

Peripheral polyneuropathy was assessed through a previously described two-step protocol combining the 15-item MNSI questionnaire and a physical examination evaluation [21]. Retinopathy was classified according to the data from our department database. Subjects were classified into three groups according to the degree of retinopathy: no retinopathy, non-proliferative retinopathy or proliferative retinopathy. Nephropathy was evaluated by the measurement of urinary albumin excretion. Subjects with a urinary albumin/creatinine ratio (ACR) greater than 3.4 mg/mmol (or 30 mcg/mg) [22], or previously treated with converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers (for microalbuminuria or macroalbuminuria), were considered as having diabetic nephropathy.

Assessment of arterial stiffness

Measurement of aortic pulse wave velocity (aPWV). We measured brachial blood pressure three times with the subjects in a sitting position: the mean of the last two measurements was used in all calculations. Subjects rested supine and measurements were taken immediately after the determination of blood pressure according to the recommendations of the recent consensus on AS [19]. aPWV was determined by sequential applanation tonometry at the carotid and femoral arteries gated to a three-lead ECG using the SphygmoCor[®] device (SphygmoCor[®], AtCor, Sydney, Australia). Time delay was calculated using a foot-of-the-wave method. The surface distance from supra-sternal notch to each recording site was measured. The total transit distance was calculated by subtracting the sternal notch to carotid distance from the sternal notch to femoral distance. aPWV was calculated using the total transit distance divided by the time delay. aPWV not achieving the automatic quality controls specified by the SphygmoCor[®] software were rejected. The mean of two aPWV measurements was taken for each subject for all calculations. Data were available for all the participants included in the study.

Laboratory analyses

HbA1c was determined by high-performance liquid chromatography (Menarini Diagnostics, Firenze, Italy). Total serum cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol were measured using standard enzymatic methods. hsCRP was determined by immunonephelometry (Siemens, Munich, Germany). IL-6 was determined by ELISA (R&D Systems, Oxon, UK), as were sTNF α R1 (Hycultbiotech, Uden, The Netherlands) and sTNF α R2 (R&D Systems, Oxon, UK). sTWEAK and sCD163 were determined by Human DuoSet ELISA (R&D Systems, Oxon, UK).

Statistical Analyses

Data are presented as percentages, means (SD) for variables normally distributed or medians (interquartile range) for variables not normally distributed. All data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. To improve skewedness and kurtosis, variables not normally distributed were log transformed. The analyses were performed in the whole population and stratified by gender (p for interaction T1DM*gender for TWEAK = 0.090 and for CD163 = 0.006). Differences between T1DM patients and controls were analysed using the χ^2 test for comparisons of proportions, and unpaired t-tests or Mann-Whitney U tests for comparisons of quantitative variables as needed. We assessed the potential relationships between sTWEAK and sCD163 with CVRF, low-grade inflammation and AS through univariate, non-parametric correlations. Linear regression models were used to adjust for potential confounders. Variables for linear regression analyses were selected based on univariate correlation analyses and those variables known or likely to be associated with both parameters. Because inflammatory-related serum proteins were only measured once, the association (if any) of low-grade inflammation with sTWEAK and sCD163 would tend to be underestimated. To address this issue, a Z-score was calculated for each inflammatory-related serum protein evaluated as: (value in the individual minus mean value in the study population)/SD. Subsequently, the low-grade inflammation general score was calculated as (Z-score of hsCRP + Z-score of IL-6 + Z-score of sTNF α R1 + Z-score of sTNF α R2)/4. The IBM SPSS Statistics (v. 19 for Mac; SPSS, Inc, IBM Company) was used for all calculations. All p values were two-sided and a p value <0.05 was considered statistically significant. Regarding the power of the study when analysing the subjects by separated according to the gender, we have enough sample to detect at least a 20% percent of variation in sTWEAK concentrations in men and women with type 1 diabetes and their respective controls (α = 0.05 and β = 10%).

Results

Baseline characteristics

Sixty-eight patients with T1DM and 68 age- and sex-matched healthy subjects (n = 136) were included in the study. Their clinical and analytical characteristics are shown in Tables 1 and 2 (men and women respectively). The baseline characteristics have previously been described [17].

T1DM patients showed lower serum concentrations of sTWEAK in both men and women, when compared with their respective counterparts (Tables 1 and 2). In addition, T1DM men had higher serum concentrations of sCD163 compared with their respective controls. No differences were observed regarding circulating levels of this soluble receptor in women.

Association of sTWEAK and sCD163 with CVRF, low-grade inflammation, insulin-resistance, microvascular complications and arterial stiffness. In univariate correlations, sTWEAK correlated negatively with T1DM status, smoking, WHR, SBP and DBP, MAP, fasting glucose and HbA1c, IL-6 and with the low-grade inflammation score in the whole population and in men. In women, sTWEAK was inversely associated with T1DM status, SBP and DBP, MAP, fasting plasma glucose and HbA1c. In the whole population, sCD163 did not show any correlation with CVRF or low-grade inflammation. However, sCD163 was positively associated with T1DM status, HbA1c and sTNF α R2 only in men (Table 3). In T1DM men, sTWEAK was negatively associated with diabetic nephropathy (r = -0.520; p = 0.003) and positively with eGDR (r = 0.375; p = 0.038). In

T1DM women, sCD163 correlated negatively with eGDR (r = -0.428; p = 0.012). Regarding aPWV, a negative association with sTWEAK (r = -0.443; p < 0.001) was observed in men. However, this association disappeared after adjusting for age, diabetes status, BMI, MAP and total cholesterol. Additionally, no significant association between sTWEAK and aPWV was found in women (r = -0.182; p = 0.169). No association between sCD163 and aPWV was found either in men or women (Men: r = 0.046; p = 0.711. Women: r = -0.076; p = 0.539).

Multivariate regression analyses. To evaluate the main predictors of sTWEAK and sCD163, multiple linear regression analyses were performed.

Analysis considering the whole population. In the whole population, T1DM status and SBP were the independent predictors for sTWEAK (R^2 = 0.341; p < 0.001). In men, the best multiple linear regression model showed that the main determinants of sTWEAK were T1DM status and WHR (R^2 = 0.640; p < 0.001). In women, T1DM status and SBP were the independent predictors for sTWEAK (R^2 = 0.231; p = 0.001) (Table 4).

Analysis in T1DM cohort. In T1DM patients, the main predictors were SBP, retinopathy and HbA1c (R^2 = 0.379; p = 0.007) (Table 5).

Discussion

Inflammatory/anti-inflammatory imbalance has gained attention as an active player in the increased CV risk that accounts in T1DM. In the present study, we have shown that sTWEAK is decreased in T1DM patients. Additionally, T1DM men have higher serum concentrations of sCD163, suggesting that these cytokines may contribute to the inflammatory events that accounts in T1DM.

In previous studies, decreased concentrations of sTWEAK has been described in patients with carotid atherosclerosis [6], coronary and peripheral arterial disease [7,8] or in atherosclerotic associated diseases, such as T2DM or end-stage renal disease [9]. These studies are in agreement with the data observed in our cohort of T1DM patients, being a disease with high prevalence of CV risk. Thus, the presence of T1DM was a strong predictive determinant of circulating levels of sTWEAK. Similarly, the data observed with sCD163, a scavenger receptor being a potential target of TWEAK, indicated higher levels in T1DM men. High levels of this receptor are usually associated with a poor CV profile, the opposite of that observed for sTWEAK. Previous data have shown that sCD163 levels are increased in patients with atherosclerosis [14,15] or atherosclerosis associated diseases, such as T2DM [16]. Nevertheless, this association was not maintained when controlling for classical CVRF in our cohort.

In our study, sTWEAK concentrations were negatively associated with blood pressure and glycemic metabolic control in both genders. Previous studies found that fasting plasma glucose was the only parameter correlated with sTWEAK whereas no significant associations were found with the rest of CVRF [6,9]. Interestingly, we observed an inverse association between central obesity and serum concentrations of sTWEAK and also an inverse association between insulin-resistance (assessed as eGDR) and lower levels of sTWEAK. Therefore, both central obesity and insulin-resistance would be associated with a decrease in sTWEAK concentrations, as the rest of CV risk factors. These data are in accordance with a previous report by Kralisch *et al.* in which HOMA-IR and sTWEAK were inversely associated in T2DM patients on chronic hemodialysis [9]. In contrast, in our patients sCD163 was only marginally correlated with metabolic control

Table 1. Clinical characteristics of study population (men).

Men	Controls (n = 34)	T1DM (n = 34)	p
Age (years)	35.6 (9.0)	36.5 (8.9)	0.963
Current smokers (n, %)	7 (20.6)	12 (35.3)	0.089
Physical activity (METS-min/week)	1395.0(779.6–2265.8)	1903.0(910.5–2776.5)	0.270
Family history of CHD (n,%)	2 (5.9)	2 (5.9)	1.000
Family history of T2DM (n, %)	5 (14.7)	7 (20.6)	0.525
Family history of T1DM (n, %)	0 (0)	2 (5.9)	0.493
Hypertension (n, %)	3 (8.8)	13 (38.2)	0.004
Dyslipidemia (n, %)	17 (50.0)	18 (52.9)	0.808
Diabetes duration (years)	-	14.00 (8.50–20.50)	-
Microvascular complications (n, %)	-	9 (26.5)	-
Retinopathy (n,%)	-	5 (14.7)	-
None (n, %)	-	29 (85.3)	-
Non proliferative (n, %)	-	4 (11.8)	-
Proliferative (n, %)	-	1 (2.9)	-
Nephropathy (n, %)	-	6 (17.6)	-
Peripheral polyneuropathy (n, %)	-	0 (0)	-
BMI (kg/m ²)	25.0 (2.8)	26.1 (3.3)	0.138
Waist (cm)	91.0 (10.1)	90.6 (11.3)	0.862
WHR	0.90 (0.10)	0.91 (0.07)	0.532
Systolic blood pressure (mmHg)	124.9 (9.5)	131.7 (10.8)	0.008
Diastolic blood pressure (mmHg)	73.8 (8.0)	76.7 (7.0)	0.124
Mean arterial pressure (mmHg)	90.8 (8.1)	95.0 (7.3)	0.029
Fasting plasma glucose (mmol/L)	4.76 (0.57)	8.71 (3.76)	<0.001
Total Cholesterol (mmol/L)	5.08 (1.54)	4.74 (0.82)	0.260
Triglycerides (mmol/L)	0.88 (0.69–1.29)	0.83 (0.69–1.14)	0.585
HDL-Cholesterol (mmol/L)	1.31 (1.13–1.49)	1.31 (1.11–1.76)	0.560
LDL-Cholesterol (mmol/L)	2.81 (2.26–3.59)	2.61 (2.23–3.13)	0.213
HbA1c (%)	5.4 (5.1–5.5)	7.3 (6.6–7.9)	<0.001
ACR (mg/mmol)	0.39 (0.30–0.51)	0.28 (0.20–0.47)	0.125
aPWV (m/s)	6.3 (5.7–6.7)	6.9 (6.5–7.9)	<0.001
hsCRP (mg/L)	0.6(0.3–1.1)	1.2(0.5–2.9)	0.036
IL-6 (pg/mL)	0.3(0.2–0.6)	0.6(0.3–1.0)	0.002
sTNF α R1 (pg/mL)	1410(1113–2308)	2739(1748–3224)	<0.001
sTNF α R2 (pg/mL)	2060(1870–2365)	2774(2267–3064)	<0.001
sTWEAK (pg/mL)	1636.5(1146.3–3754.8)	765.9 (650.4–1097.1)	<0.001
sCD163 (ng/mL)	224.8(193.3–296.5)	285.0(247.7–357.1)	0.012

Data are given as percentages, mean (SD) or median (interquartile range). CHD, coronary heart disease; ACR, urinary albumin/creatinine ratio.
doi:10.1371/journal.pone.0043919.t001

(only in men) and with insulin-resistance in women, without any correlation with CVRF. Reported data in the literature on the relationship between sCD163 and CVRF are contradictory. Thus, some authors have reported a positive correlation between sCD163 and anthropometric measures or blood pressure [23] but others have failed to find such associations [14,15].

Moreover, we have shown, for the first time, an inverse association between sTWEAK concentrations and microvascular complications. In T1DM, retinopathy was one of the main predictors of sTWEAK. In contrast, it has been previously reported that TWEAK can stimulate blood vessel formation in the rat cornea angiogenesis assay, but it is presently unknown whether this cytokine could play a role in the pathological

angiogenesis associated with diabetic retinopathy [24]. An inverse relationship between serum levels and local concentration in the atherosclerotic plaques has already been described in patients with high CV risk [5]. These differences may indicate dual action regarding local or systemic activity. Whether sTWEAK could be a potential marker of diabetic chronic complications warrants further investigation in prospective studies.

The role of TWEAK may seem counterintuitive because TWEAK induces some inflammatory markers and increases the expression of metalloproteinases that degrade the extracellular matrix [5]. However, in contrast to this proinflammatory role, recent evidence suggests that TWEAK could attenuate the transition from innate to adaptive immunity [25], modulating

Table 2. Clinical characteristics of study population (women).

Women	Controls (n = 34)	T1DM (n = 34)	p
Age (years)	35.3 (11.4)	35.2 (11.2)	0.971
Current smokers (n, %)	9 (26.5)	12 (35.3)	0.536
Physical activity (METS-min/week)	1386.0 (770.3–2079.0)	1386.0 (672.8–1686.0)	0.442
Family history of CHD (n, %)	4 (11.8)	1 (2.9)	0.356
Family history of T2DM (n, %)	7 (20.6)	9 (26.5)	0.567
Family history of T1DM (n, %)	1 (2.9)	3 (8.8)	0.614
Hypertension (n, %)	0 (0)	4 (11.8)	0.114
Dyslipidemia (n, %)	17 (50)	14 (41.2)	0.465
Diabetes duration (years)	-	12.00 (6.75–18.00)	-
Microvascular complications (n,%)	-	7 (20.6)	-
Retinopathy (n,%)	-	5 (14.7)	-
None (n, %)	-	29 (85.3)	-
Non proliferative (n, %)	-	2 (5.9)	-
Proliferative	-	3 (8.8)	-
Nephropathy (n,%)	-	3 (8.8)	-
Peripheral polyneuropathy (n, %)	-	0 (0)	-
BMI (kg/m ²)	23.0 (3.1)	25.3 (3.9)	0.009
Waist (cm)	76.3 (6.9)	80.0 (10.3)	0.092
WHR	0.80 (0.06)	0.81 (0.07)	0.529
Systolic blood pressure (mmHg)	116.3 (9.5)	118.3 (9.6)	0.379
Diastolic blood pressure (mmHg)	67.9 (7.8)	69.1 (7.9)	0.508
Mean arterial blood pressure (mmHg)	84.0 (7.9)	85.5 (7.5)	0.417
Fasting plasma glucose (mmol/L)	4.59 (0.48)	9.59 (3.55)	<0.001
Total Cholesterol (mmol/L)	5.18 (1.11)	4.82 (0.92)	0.146
Triglycerides (mmol/L)	0.72 (0.56–0.93)	0.70 (0.53–0.84)	0.484
HDL-Cholesterol (mmol/L)	1.77 (1.46–1.99)	1.80 (1.49–2.20)	0.377
LDL-Cholesterol (mmol/L)	2.78 (2.18–3.48)	2.47 (1.90–2.97)	0.056
HbA1c (%)	5.3 (5.2–5.4)	7.8 (7.1–9.1)	<0.001
ACR (mg/mmol)	0.38 (0.27–0.65)	0.47 (0.30–0.91)	0.315
aPWV (m/s)	6.0 (5.3–6.7)	6.4 (5.9–7.5)	0.023
hsCRP (mg/L)	0.9(0.4–2.8)	1.4(0.7–2.5)	0.447
IL-6 (pg/mL)	0.4(0.2–0.6)	0.6(0.3–1.2)	0.039
sTNF α R1 (pg/mL)	1917(1355–3295)	2262(1366–2978)	0.864
sTNF α R2 (pg/mL)	2215(1897–2700)	2295(2018–3006)	0.320
sTWEAK (pg/mL)	1401.0(788.0–2422.2)	830.1(562.6–1175.9)	0.011
sCD163 (ng/mL)	269.2(223.4–329.7)	246.7(197.4–285.0)	0.144

Data are given as percentages, mean (SD) or median (interquartile range). CHD, coronary heart disease; ACR, urinary albumin/creatinine ratio. doi:10.1371/journal.pone.0043919.t002

the activity of other inflammatory cytokines, like TNF α . As such, previous studies have found a negative correlation between sTWEAK and inflammatory markers [26,27]. In concurrence with these results, we found a negative correlation between sTWEAK and IL-6 and with the low-grade inflammation score. Conversely, sCD163 concentrations have been associated with inflammatory markers [14,23,28]. This inflammatory profile attributed to sCD163 was only marginally observed in our cohort, with a weak association with sTNF α R2 (only in men).

Whether sTWEAK and sCD163 play a role in the pathogenesis of atherosclerosis remains unclear. Previous data have shown that, intima-media thickness was negatively correlated with sTWEAK [6] and this association remained significant after adjusting for

classic CVRF and inflammatory markers. In agreement with this report, we found a negative correlation between sTWEAK and AS (assessed as aPWV) but only in men, although this association disappeared after adjusting for potential confounders. Moreno *et al.* observed that intima-media thickness was positively associated with sCD163 concentrations with independence of traditional CVRF and inflammatory markers [14,15]. However, we failed to find any association between AS and sCD163 in our cohort. Thereafter, we could not confirm the association between these two markers and AS; a marker of subclinical atherosclerosis, in T1DM patients. There are no previous data on the role of sTWEAK or sCD163 in the pathogenesis of AS. It is likely that carotid intima-media thickness reflects more advanced structural

Table 3. Spearman correlation coefficients for the association between sTWEAK and CD163 with CVRF and low-grade inflammation.

	sTWEAK			sCD163		
	Whole population	Men	Women	Whole population	Men	Women
Age (years)	-0.129	-0.232	-0.044	-0.035	-0.204	0.105
Diabetes mellitus (N/Y)	-0.500**	-0.677**	-0.333*	0.070	0.309*	-0.178
Smoking (N/Y)	-0.263**	-0.425**	-0.105	-0.109	0.017	-0.234
Physical activity (METS-min/week)	0.076	-0.054	0.160	0.137	0.094	0.161
BMI (kg/m ²)	-0.154	-0.252	-0.146	0.106	0.161	0.069
Waist (cm)	0.009	-0.229	0.033	0.114	0.163	0.062
WHR	-0.034	-0.332**	-0.020	0.079	-0.030	0.185
SBP (mmHg)	-0.279**	-0.458**	-0.404**	0.016	0.080	-0.155
DBP (mmHg)	-0.200**	-0.334**	-0.273*	-0.010	0.035	-0.102
MAP (mmHg)	-0.262**	-0.399**	-0.381**	0.006	0.042	-0.112
Total Cholesterol (mmol/L)	-0.094	-0.075	-0.083	-0.004	-0.046	0.037
Triglycerides (mmol/L)	-0.066	-0.203	-0.011	0.095	0.101	0.038
HDL-Cholesterol (mmol/L)	-0.131	0.109	-0.263	-0.162	-0.237	-0.117
LDL-Cholesterol (mmol/L)	-0.010	-0.104	0.056	0.086	0.053	0.114
FPG (mmol/L)	-0.363**	-0.429**	-0.294*	-0.064	0.024	-0.151
HbA1c (%)	-0.482**	-0.654**	-0.314*	0.080	0.286*	-0.103
hsCRP (mg/L)	-0.151	-0.178	-0.098	-0.115	-0.043	-0.202
IL-6 (pg/mL)	-0.233*	-0.368**	-0.115	-0.145	-0.052	-0.246
sTNF α R1 (pg/mL)	-0.163	-0.203	-0.109	0.071	0.060	0.079
sTNF α R2 (pg/mL)	-0.199	-0.249	-0.015	0.153	0.260*	0.051
Low-grade inflammation Score	-0.343**	-0.461**	-0.236	-0.037	0.097	-0.180

SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure, MAP, mean arterial pressure; FPG, fasting plasma glucose. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.
doi:10.1371/journal.pone.0043919.t003

atherosclerotic changes in the arterial wall than AS [29]. Our population was younger than those included in previous studies reporting associations between intima-media thickness and sTWEAK or sCD163 concentrations. Perhaps these differences

may explain the lack of association between AS and these markers in our study.

In prospective studies sTWEAK serum levels independently predicted an adverse prognosis in patients with chronic heart failure [30]. In addition, decreased sTWEAK level is an

Table 4. Independent sTWEAK predictors for the whole population.

Whole population ($R = 0.604$, $R^2 = 0.341$)			
	β	95% CI	p
Constant	-	3.536–4.731	<0.001
T1DM status	-0.396	-0.328 to -0.144	<0.001
SBP	-0.327	-0.013 to -0.004	<0.001
Men (R = 0.800, R² = 0.640)			
	β	95% CI	p
Constant	-	3.758–5.500	<0.001
T1DM status	-0.543	-0.419 to -0.209	<0.001
WHR	-0.253	-1.908 to -0.277	0.010
Women (R = 0.481, R² = 0.231)			
	β	95% CI	p
Constant	-	3.336–5.090	<0.001
SBP	-0.353	-0.018 to -0.004	0.004
T1DM status	-0.312	-0.327 to -0.045	0.011

Variables entered into this model: age, (gender), smoking, physical activity, hypertension (N/Y), dyslipidemia (N/Y), WHR, SBP, logTriglycerides, logLDL-cholesterol, T1DM status and logHb1Ac.
doi:10.1371/journal.pone.0043919.t004

Table 5. Independent sTWEAK predictors for T1DM population.

log sTWEAK (R = 0.615, R ² = 0.379)	β	95% CI	p
Constant	-	3.560–6.102	<0.001
Retinopathy	-0.397	-0.263 to -0.036	0.012
logHb1Ac	-0.370	-2.322 to -0.194	0.022
PAD	-0.330	-0.018 to 0.000	0.039

Variables initially entered into this model: age, gender, smoking, physical activity, hypertension (N/Y), dyslipidemia (N/Y), BMI, WHR, SBP, DBP, logTriglycerides, logLDL-cholesterol, logHDL-cholesterol, retinopathy, nephropathy, logHb1Ac, and logeGDR.
doi:10.1371/journal.pone.0043919.t005

independent predictor of CV outcomes in patients with non-dialysis chronic kidney disease [31] and with peripheral arterial disease [27]. In contrast, elevated sTWEAK levels predicted an adverse short-term outcome in patients with ST-elevation

myocardial infarction [32] and CV and all-cause mortality in hemodialysis patients [26]. Therefore, future prospective studies are needed to better understand the potential role of these markers in atherosclerosis and their prognosis value.

We are aware that one of the limitations of our study is the cross-sectional design; therefore any inference regarding causality cannot be made. In addition, its observational design does not allow us to ensure complete control of all the potential (unknown) confounding factors. The concentrations of sTWEAK and sCD163 were measured only once, which might underestimate the association between them and AS.

In conclusion, our study demonstrates sTWEAK is decreased in T1DM patients compared with age and sex-matched healthy subjects, even after controlling for classic CVRF. However, neither marker is associated with AS after adjusting for potential confounders.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JMGC JV MRC. Performed the experiments: GL EMM DS. Analyzed the data: GL JMGC JV. Contributed reagents/materials/analysis tools: EMM DS MRC. Wrote the paper: GL JMGC JV MRC.

References

- Libby P, Nathan DM, Abraham K, Brunzell JD, Fradkin JE, et al. (2005) Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on Cardiovascular Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation* 111: 3489–3493.
- Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED (2001) Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 37: 1053–1059.
- Vlachopoulos C, Aznaouridis K, O'Rourke MF, Safar ME, Baou K, et al. (2010) Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with central haemodynamics: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J* 31: 1865–1871.
- Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Fuller JH, Stehouwer CD (2005) Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes—the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 48: 370–378.
- Wiley SR, Winkles JA (2003) TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine & growth factor reviews* 14: 241–249.
- Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, Munoz-Garcia B, Orbe J, Paramo JA, et al. (2007) Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 916–922.
- Jelic-Ivanovic Z, Bujisic N, Spasic S, Bogavac-Stanojevic N, Spasojevic-Kalimanovska V, et al. (2009) Circulating sTWEAK improves the prediction of coronary artery disease. *Clinical biochemistry* 42: 1381–1386.
- Moreno JA, Dejouvencel T, Labreuche J, Smadja DM, Dussiot M, et al. (2010) Peripheral artery disease is associated with a high CD163/TWEAK plasma ratio. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 1253–1262.
- Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lossner U, et al. (2008) Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 199: 440–444.
- Bover LC, Cardo-Vila M, Kuniyasu A, Sun J, Rangel R, et al. (2007) A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *Journal of immunology* 178: 8183–8194.
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, et al. (2001) Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409: 198–201.
- Moller HJ, Peterslund NA, Graversen JH, Moestrup SK (2002) Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood* 99: 378–380.
- Guetta J, Strauss M, Levy NS, Fahoum L, Levy AP (2007) Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* 191: 48–53.
- Aristoteli LP, Moller HJ, Bailey B, Moestrup SK, Kriharides L (2006) The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 184: 342–347.
- Moreno JA, Munoz-Garcia B, Martin-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Orbe J, et al. (2009) The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 207: 103–110.
- Levy AP, Purushothaman KR, Levy NS, Purushothaman M, Strauss M, et al. (2007) Downregulation of the hemoglobin scavenger receptor in individuals with diabetes and the Hp 2-2 genotype: implications for the response to intraplaque hemorrhage and plaque vulnerability. *Circ Res* 101: 106–110.
- Llauradó G, Ceperuelo-Mallafre V, Vilardell C, Simó R, Freixenet N, et al. (2012) Arterial stiffness is increased in patients with type 1 diabetes without cardiovascular disease. A potential role of low-grade inflammation. *Diabetes Care* 35: 1083–1089.
- Cavalcante JL, Lima JA, Redheuil A, Al-Mallah MH (2011) Aortic stiffness: current understanding and future directions. *J Am Coll Cardiol* 57: 1511–1522.
- Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, et al. (2006) Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 27: 2588–2605.
- Williams KV, Erbey JR, Becker D, Arslanian S, Orchard TJ (2000) Can clinical factors estimate insulin resistance in type 1 diabetes? *Diabetes* 49: 626–632.
- Gonzalez-Clemente JM, Gimenez-Perez G, Richart C, Broch M, Caixas A, et al. (2005) The tumour necrosis factor (TNF)-alpha system is activated in accordance with pulse pressure in normotensive subjects with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 153: 687–691.
- Standards of medical care in diabetes-2011 (2011) *Diabetes Care* 34 Suppl 1: S11–61.
- Axelsson J, Moller HJ, Witasp A, Qureshi AR, Carrero JJ, et al. (2006) Changes in fat mass correlate with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 48: 916–925.
- Lynch CN, Wang YC, Lund JK, Chen YW, Leal JA, et al. (1999) TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem* 274: 8455–8459.
- Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, Lawrence D, LeBlanc H, et al. (2005) TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell* 123: 931–944.
- Carrero JJ, Ortiz A, Qureshi AR, Martin-Ventura JL, Barany P, et al. (2009) Additive effects of soluble TWEAK and inflammation on mortality in hemodialysis patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 4: 110–118.
- Urbanaviciene G, Martin-Ventura JL, Lindholt JS, Urbanavicius S, Moreno JA, et al. (2011) Impact of soluble TWEAK and CD163/TWEAK ratio on long-term cardiovascular mortality in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 219: 892–899.
- Moller HJ, Frikke-Schmidt R, Moestrup SK, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A (2011) Serum soluble CD163 predicts risk of type 2 diabetes in the general population. *Clin Chem* 57: 291–297.
- Koivisto T, Virtanen M, Hutri-Kahonen N, Lehtimäki T, Jula A, et al. (2011) Arterial pulse wave velocity in relation to carotid intima-media thickness, brachial flow-mediated dilation and carotid artery distensibility: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study and the Health 2000 Survey. *Atherosclerosis*.
- Richter B, Rychlík K, Hohensinner PJ, Berger R, Mortl D, et al. (2010) Differences in the predictive value of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) in advanced ischemic and non-ischemic heart failure. *Atherosclerosis* 213: 545–548.
- Yilmaz MI, Carrero JJ, Martin-Ventura JL, Sonmez A, Saglam M, et al. (2010) Combined therapy with renin-angiotensin system and calcium channel blockers

8. Resultats

TWEAK and CD163 in Type 1 Diabetes Mellitus

in type 2 diabetic hypertensive patients with proteinuria: effects on soluble TWEAK, PTX3, and flow-mediated dilation. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 5: 1174–1181.

32. Chorianopoulos E, Jarr K, Steen H, Giannitsis E, Frey N, et al. (2010) Soluble TWEAK is markedly upregulated in patients with ST-elevation myocardial infarction and related to an adverse short-term outcome. *Atherosclerosis* 211: 322–326.

Objectiu 4:

Article 3:

Llauradó G, Ceperuelo-Mallafré V, Vilardell C, Simó R, Albert L, Berlanga E, Vendrell J, González-Clemente JM. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 2013 May 2 (DOI: [10.1016/j.diabet.2013.03.006](https://doi.org/10.1016/j.diabet.2013.03.006)).



Available online at
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en

Diabetes
 & *Metabolism*

Diabetes & Metabolism xxx (2013) xxx–xxx

Original article

Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes

G. Llauradó^a, V. Ceperuelo-Mallafre^{b,c}, C. Vilardell^d, R. Simó^e, L. Albert^a, E. Berlanga^f,
 J. Vendrell^c, J.M. González-Clemente^{a,*}

^a Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Hospital of Sabadell, Corporació Sanitària i Universitària Parc Taul (Universitat Autònoma de Barcelona), 08208 Sabadell, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), Hospital Clínico Virgen de la Victoria, Málaga, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, Institut Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

^d Diabetes, Endocrinology and Nutrition Unit, Hospital Sant Joan de Déu de Manresa, Xarxa Assistencial Althaia, Manresa, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) and Diabetes and Metabolism Research Unit, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrà (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^f Biochemistry Department, UDIAT, Corporació Sanitària i Universitària Parc Taul (Universitat Autònoma de Barcelona), Sabadell, Spain

Received 7 May 2012; received in revised form 12 March 2013; accepted 12 March 2013

Abstract

Aim. This study investigated the relationship between endothelial dysfunction (ED) and arterial stiffness (AS) in adults with type 1 diabetes and no clinical cardiovascular (CV) disease.

Methods. A total of 68 patients with type 1 diabetes and 68 age- and gender-matched healthy (non-diabetic) subjects were evaluated. ED was assessed by reactive hyperaemia peripheral arterial tonometry (RH-PAT) and by serum concentrations of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) and E-selectin. AS was assessed by aortic pulse wave velocity (aPWV). All statistical analyses were stratified by gender.

Results. Adults with type 1 diabetes had RH-PAT index scores similar to those of their matching controls [men: 1.55 (1.38–1.98)% versus 1.61 (1.40–2.17)%, $P=0.556$; women: 2.07 (1.55–2.31)% versus 2.08 (1.79–2.49)%; $P=0.215$]. However, after adjusting for potential confounders, type 1 diabetes emerged as the main determinant of the RH-PAT index in women. Also, differences between genders in both the controls and type 1 diabetes patients disappeared. Men with diabetes had higher serum concentrations of E-selectin, and women had higher serum concentrations of sICAM-1, sVCAM-1 and E-selectin than their respective controls. However, after adjusting for potential confounders, only the differences in sICAM-1 (women) and E-selectin (both genders) remained significant. No association was found between aPWV and the RH-PAT index and ED markers after adjusting for CV risk factors.

Conclusion. ED was increased in adults with type 1 diabetes compared with age-matched non-diabetic subjects. Also, gender differences in ED were lost in type 1 diabetes. However, ED was not associated with AS after adjusting for potential confounders. These findings suggest that ED occurs earlier than AS in type 1 diabetes.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Endothelial dysfunction; Arterial stiffness; Type 1 diabetes

Summary

La dysfonction endothéliale n'est pas associée à la rigidité artérielle chez les adultes diabétiques de type 1.

Objectif. Étudier la relation entre la dysfonction endothéliale (DE) et la rigidité artérielle (RA) chez les sujets diabétiques de type 1 sans maladie cardiovasculaire (CV) clinique.

Abbreviations: CV, Cardiovascular; ED, Endothelial dysfunction; RH-PAT, Reactive hyperaemia peripheral arterial tonometry; AS, Arterial stiffness; BMI, Body mass index; WHR, Waist-to-hip ratio; SBP, Systolic blood pressure; DBP, Diastolic blood pressure; MAP, Mean arterial pressure; sICAM-1, Soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1, Soluble vascular cell adhesion molecule-1; aPWV, Aortic pulse wave velocity; CHD, Coronary heart disease; UAC ratio, Urinary albumin-to-creatinine ratio.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 745 8412; fax: +34 93 716 0646.

E-mail address: josmi.gonza@gmail.com (J.M. González-Clemente).

1262-3636/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2013.03.006>

Please cite this article in press as: Llauradó G, et al. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Metab* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2013.03.006>

M thodes. Soixante-huit diabétiques de type 1 et 68 volontaires sains (appariés selon l'âge et le sexe) ont été évalués. La DE a été évaluée par l'hyperémie réactive-périphérique tonométrie artérielle (RH-PAT) et par les concentrations sériques d'ICAM-1, VCAM-1 et E-Sélectine. La RA a été mesurée par la vélocité de l'onde de pouls aortique (aVOP). Toutes les analyses faites ont été stratifiées selon le sexe.

R sultats. Les diabétiques avaient les mêmes valeurs de RH-PAT que leurs témoins (hommes : 1,55 % (1,38–1,98) versus 1,61 % (1,40–2,17); $P = 0,556$; femmes : 2,07 % (1,55–2,31) versus 2,08 % (1,79–2,49); $P = 0,215$). Toutefois, après l'ajustement pour les facteurs confondants, le diabète de type 1 a émergé comme le principal composant du RH-PAT (femmes). En outre, les différences entre les sexes dans la population générale, chez les diabétiques de type 1 ont disparu. Les hommes diabétiques avaient des concentrations sériques de E-Sélectine plus élevées comparativement aux sains. Les femmes diabétiques avaient des concentrations sériques de ICAM-1, VCAM-1 et E-Sélectine plus élevées comparativement à leurs témoins. Toutefois, après ajustement pour les facteurs confondants, seuls les différences d'ICAM-1 (femmes) et E-Sélectine (les deux sexes) sont restées significatives. Nous n'avons trouvé aucune association entre la aVOP et le RH-PAT ou des marqueurs de dysfonction endothéliale après ajustement pour les autres facteurs de risque CV.

Conclusion. La DE est augmentée chez les patients diabétiques. En outre, les différences entre les sexes dans la DE ont disparu chez les patients diabétiques. Par contraste, la DE n'est pas associée à la RA après ajustement pour les facteurs confondants potentiels. Ces résultats suggèrent que la DE se produit plus tôt que la RA chez les sujets diabétiques de type 1.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés

Mots clés : Dysfonction endothéliale ; Rigidité artérielle ; Diabète de type 1

1. Introduction

The relative risk of cardiovascular (CV) disease in type 1 diabetes can be as much as ten times greater than in the non-diabetic population, especially in women [1], and is even greater than the risk in type 2 diabetes [2]. In fact, CV disease is the major cause of mortality in type 1 diabetes [2], representing around 40–47% of deaths in certain cohorts [3,4]. Diabetes results in an accelerated arteriosclerotic process that is not fully explained by classical CV risk factors. The pathophysiological mechanisms underlying CV events in type 1 diabetes are complex and still not fully understood, but are known to involve endothelial dysfunction (ED) as an important factor in the arteriosclerotic process.

ED is characterized by reduced bioavailability of certain vasodilators such as nitric oxide and increased production of certain vasoconstrictors [5]. Endothelial function can be estimated indirectly by measuring endothelium-dependent vasodilatation and by determining ED serum markers such as adhesion molecules [5]. Reactive hyperaemia peripheral arterial tonometry (RH-PAT) is a novel and promising non-invasive technique for assessing peripheral microvascular endothelial function. It measures changes in digital pulse volume during reactive hyperaemia [6]. In adults, it has shown excellent correlation with measures of coronary and peripheral ED [6,7]. Furthermore, RH-PAT has been associated with CV risk factors [8,9] and has recently been shown to be an independent predictor of late CV events [10]. In paediatric patients with type 1 diabetes, lower RH-PAT scores have been described compared with their respective controls, but no data are available in adults [11,12].

Arterial stiffness (AS) is an early sign of arteriosclerosis [13] and is therefore a highly promising method for detecting patients at risk of arteriosclerosis long before a CV event occurs. Indeed, AS has emerged as an independent determinant of CV events and mortality beyond the classical CV risk factors in several populations [14]. Previously, our group was able to demonstrate that AS is increased in patients with type 1 diabetes and no clinical CV disease [15].

Although the precise mechanisms responsible for the increase in AS are not yet fully understood, ED could be involved, leading to functional stiffening of the arterial wall [16]. In fact, ED has been associated with measures of AS in healthy subjects [17,18] and in patients with CV disease [19] or CV risk factors [20,21]. Also, type 1 diabetes has been associated with ED [22], thought to be an important factor in the pathogenesis of micro- and macrovascular complications [23–25]. However, the relationship between ED and AS in patients with type 1 diabetes remains unclear. For this reason, it was hypothesized that, in type 1 diabetes, ED (as assessed by RH-PAT and ED serum markers) would be increased and associated with AS. Thus, the present study was carried out in patients with type 1 diabetes without clinical CV disease and in age- and gender-matched healthy (non-diabetic) subjects.

2. Patients and methods

A total of 68 patients with type 1 diabetes (34 men and 34 women) aged 18–65 years and 68 age- and gender-matched healthy subjects were included. None of them had any condition associated with an inflammatory response (such as acute or chronic infectious diseases) or had received anti-inflammatory treatment within the previous 6 months, and none had experienced any previous clinical CV event. Patients with type 1 diabetes were consecutively recruited from our outpatients clinic and all had diabetes of at least 1 year's duration. The healthy control group was recruited from hospital staff members and their relatives and friends.

After an overnight fast, venous blood samples were taken and aliquots of plasma and serum stored at -80°C until processing. In women, all measurements were taken during the follicular phase of the menstrual cycle. The following information was recorded using a predefined standardized form: gender; age; diabetes duration; body mass index (BMI); waist-to-hip ratio (WHR); systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP); mean arterial pressure (MAP, defined as $1/3\text{ SBP} + 2/3\text{ DBP}$); physical activity (by International Physical Activity Questionnaire [IPAQ]) [26]; cigarette-smoking; alcohol intake; insulin

Please cite this article in press as: Llauradó G, et al. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. Diabetes Metab (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2013.03.006>

dose and any other drug treatment; microvascular complications (assessed only in patients with type 1 diabetes as previously described [15]); HbA_{1c}; lipid profile; serum concentrations of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP); interleukin (IL)-6; soluble fractions of tumour necrosis factor- α receptors 1 and 2 (sTNF α R1 and sTNF α R2); soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1); soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1); and E-selectin.

Hypertension was defined as blood pressure (BP) higher than 140/90 mmHg and/or the use of antihypertensive treatment [27]. Dyslipidaemia was defined as concentrations of total cholesterol greater than 5.2 mmol/L, triglycerides greater than 1.7 mmol/L, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol less than 1.03 mmol/L, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol greater than 3.4 mmol/L and/or the use of drug treatment for dyslipidaemia [28].

The study protocol was approved by the Hospital of Sabadell Clinical Research Ethics Committee and conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All subjects gave their informed consent before participating in the study.

2.1. Assessment of endothelial dysfunction

ED was assessed as the reactive hyperaemia index as measured by peripheral arterial tonometry (RH-PAT index) using the Endo-PAT2000 device (Itamar Medical Ltd, Caesarea, Israel), which measures endothelium-mediated changes in arterial tone by creating a downstream hyperaemic response induced by standard 5-min brachial occlusion. The device uses fingertip plethysmography probes to measure pulse wave amplitude changes in the digital arteries before and after the period of reactive hyperaemia. The RH-PAT index is then calculated to provide a measure of endothelial function. One probe is placed on the index finger of each hand, and pulse wave amplitudes are recorded during the study. After 5 minutes of baseline recording, arterial flow to the non-dominant arm is occluded for 5 minutes using a BP cuff inflated to 40 mmHg above SBP. The cuff is then rapidly deflated to allow reactive hyperaemia to take place. Pulse wave amplitudes are recorded for at least 5 minutes after the cuff has been deflated. A post-occlusion-to-pre-occlusion ratio for the tested arm is automatically calculated, using the contralateral arm as a control, thus providing the RH-PAT index. Lower RH-PAT index scores are indicative of greater ED.

2.2. Assessment of arterial stiffness

Participants rested supine while measurements were taken according to the recommendations of a recent consensus in AS [29]. The method has been previously described elsewhere in detail [15]. In brief, aortic pulse wave velocity (aPWV) was determined by sequential applanation tonometry, using a Millar tonometer (SPC-301, Millar Instruments, Houston, TX, USA) at the carotid and femoral arteries gated to three-lead electrocardiography (ECG) using the SphygmoCor[®] system (AtCor Medical Pty Ltd, West Ride [Sydney], NSW, Australia). Those aPWV recordings not satisfying the automatic quality controls specified by the SphygmoCor software were rejected. The mean

of two aPWV measurements was taken for each subject for all calculations, and data were available for all participants included in this study.

2.3. Laboratory analyses

HbA_{1c} was determined by high-performance liquid chromatography (A. Menarini Diagnostics, Florence, Italy). Total serum cholesterol, triglycerides, and HDL and LDL cholesterol were measured using standard enzymatic methods. The hs-CRP was determined by immunonephelometry, using a nephelometer (Siemens Healthcare Diagnostics, Munich, Germany). IL-6 was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; R&D Systems Europe, Abingdon, Oxon, UK), as were sTNF α R1 (Hycult Biotech, Uden, The Netherlands) and sTNF α R2 (R&D Systems Europe). sICAM-1 was also determined by ELISA (Wuhan Boster Biological Technology, Wuhan, China), along with sVCAM-1 and E-selectin (both by Wuhan Boster Biological Technology). Intra- and interassay coefficients of variation were 5% and 5.3% for sICAM-1, 3.5% and 7.7% for sVCAM-1, and 5.9% and 7.6% for E-selectin, respectively.

2.4. Statistical analyses

Sample size was calculated to obtain an absolute difference of 0.4% in the RH-PAT index between patients with type 1 diabetes and their matching controls adjusted by gender. Allowing for a type 1 error of 0.05, the number of subjects included in our study resulted in a statistical power of 90%. Data were expressed as percentages, as means (standard deviation [SD]) for normally distributed variables or as medians (interquartile range) for variables not normally distributed. All data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. To improve skewness and kurtosis, variables not normally distributed were log-transformed. The analyses were performed stratified by gender. Differences between patients with type 1 diabetes and controls were analyzed using the χ^2 test for comparisons of proportions and unpaired *t* tests or Mann-Whitney U tests for comparisons of quantitative variables as necessary. In both men and women, the potential relationships among all variables were assessed through univariate, non-parametric correlations. Linear regression models were used to adjust for potential confounders, treating each ED marker or aPWV as a dependent variable as it proceeded. Independent variables for linear regression analyses were selected based on univariate correlation analyses and with variables known or likely to be associated with either ED or AS. As ED markers were measured only once, the association (if any) of ED serum markers with AS were likely to be underestimated. To address this issue, a Z score was calculated for each of these markers and evaluated as the value in the individual minus the mean value in the study population divided by the SD. Subsequently, a general ED score was calculated as the Z score of sICAM-1 plus the Z score of sVCAM-1 plus the Z score of E-selectin divided by 3. The same calculation was done for low-grade inflammation markers (as described elsewhere [15]). Similar scores have been used in earlier published reports

Please cite this article in press as: Llauradó G, et al. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Metab* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2013.03.006>

[23,30,31]. IBM SPSS Statistics v. 19 for Mac software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for all calculations. All P values were two-sided and a $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Baseline characteristics

Altogether, 68 patients with type 1 diabetes and 68 age- and gender-matched healthy (non-diabetic) subjects ($n = 136$) were evaluated. Their main clinical and analytical characteristics are shown in Table 1 (men) and Table 2 (women). Their baseline characteristics have been described elsewhere [15].

The initial non-adjusted analyses found no differences in RH-PAT index scores between patients with type 1 diabetes and the healthy controls (men: 1.55% [1.38–1.98] versus 1.61% [1.40–2.17], $P = 0.556$; women: 2.07% [1.55–2.31] versus 2.08% [1.79–2.49], $P = 0.215$). However, after adjusting for potential confounders (variables included in the model were age, type 1 diabetes [yes/no], smoker, WHR, MAP, HDL and LDL cholesterol, and HbA_{1c}), type 1 diabetes emerged as the main determinant of the RH-PAT index in women, whereas there was a non-significant trend in men (men: $\beta = -0.429$, $P = 0.080$; women: $\beta = -1.459$, $P < 0.001$).

In addition, the men in our non-diabetic cohort had lower RH-PAT index scores than the women (1.61% [1.40–2.17] versus 2.08 [1.79–2.49]; $P = 0.004$), which was in agreement with previous studies [9]. However, this gender dimorphism was not observed on analyzing patients with type 1 diabetes (1.55% [1.38–1.98] versus 2.07% [1.55–2.31]; $P = 0.066$). Using stepwise regression analyses including CV risk factors and stratified by study group, it was found that gender was the main determinant of the RH-PAT index in the healthy population ($\beta = 0.348$, $P = 0.015$), but not in the type 1 diabetics ($\beta = -0.025$, $P = 0.873$).

As for circulating ED markers, men with type 1 diabetes had higher serum concentrations of E-selectin compared with their respective controls (Table 1), while women with type 1 diabetes had higher serum concentrations of sICAM-1, sVCAM-1 and E-selectin compared with their respective controls (Table 2). Nevertheless, only sICAM-1 serum concentrations (in women) and E-selectin serum concentrations (in both men and women) remained significantly associated with type 1 diabetes after adjusting for potential confounders on multivariate analyses (age, type 1 diabetes [yes/no], smoker, WHR, MAP, HDL and LDL cholesterol, and HbA_{1c}).

3.2. RH PAT index, ED serum markers, in ammation and microvascular complications

There was no association between RH-PAT index scores and ED serum markers in either healthy subjects or patients with type 1 diabetes. The healthy controls showed an association between E-selectin and sTNF α R1 ($r = 0.299$, $P = 0.016$), sTNF α R2 ($r = 0.307$, $P = 0.014$) and low-grade inflammation Z scores ($r = 0.254$, $P = 0.043$). In the type 1 diabetics, there were associations between sICAM-1 and sTNF α R2 ($r = 0.282$,

$P = 0.021$), E-selectin and sTNF α R2 ($r = 0.255$, $P = 0.037$), and low-grade inflammation Z scores ($r = 0.258$, $P = 0.035$). There was no association between ED and microvascular complications.

3.3. Relationship between ED and AS

Univariate correlations (stratified by study group) showed that aPWV correlated positively with E-selectin only in the healthy subjects ($r = 0.324$, $P = 0.007$; Table 3). Nevertheless, no association was observed between aPWV and the RH-PAT index in either diabetics or controls, nor were there any associations between aPWV and the remaining ED serum markers in the two groups. Also, when the analysis was adjusted for confounding variables (age, gender, BMI, MAP and total cholesterol), this association was not maintained. In addition, including duration of disease in the multivariate analyses for type 1 diabetes had no effect on the results.

4. Discussion

It is accepted that generalized ED precedes the development of arteriosclerosis and that hyperglycaemia promotes vascular damage, thereby raising the risk of CV events. Thus, early detection of ED is important in patients with type 1 diabetes before the development of overt CV disease. The present study has revealed for the first time that adults with type 1 diabetes and no signs of CV disease show evidence of ED as determined by the RH-PAT index. Furthermore, type 1 diabetes abrogated gender differences in the RH-PAT index suggesting that women with type 1 diabetes are more prone to ED than are healthy controls.

Previous studies of the RH-PAT index in paediatric populations revealed lower scores in patients with type 1 diabetes compared with their respective controls. However, in those studies, no gender dimorphism was explored [11,12]. In agreement with these data, in our present study the main determinant of the RH-PAT index was type 1 diabetes, but only in women. Previous studies of community-based populations have shown that men have lower RH-PAT index scores (reflecting more ED) than women [9]. Yet, this potentially protective effect, based on gender in the healthy population, vanished in our cohort of women with type 1 diabetes, whose ED was similar to that of the men. There are data to suggest that oestrogen may directly stimulate nitric oxide production and release in women [32] and, thus, sex hormone differences may be among the mechanisms potentially involved in ED. However, a previous study of type 2 diabetes evaluating endothelium-dependent vasodilatation showed that diabetes eliminates these differences [33]. Our present results are consistent with that finding and suggest that women with type 1 diabetes are more prone to ED than women without the disease. Nevertheless, the available data in type 1 diabetes are scanty and contradictory [34]. Consequently, more studies are needed to elucidate the potential gender differences in ED with type 1 diabetes as well as the contribution of sex hormones in the pathogenesis of CV disease in type 1 diabetes.

Previous studies have shown an increase in ED serum markers [22] and their association with the development of micro- and

Please cite this article in press as: Llauradó G, et al. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. Diabetes Metab (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2013.03.006>

Table 1
Clinical characteristics of the male study population.

Men	Healthy controls (n = 34)	Type 1 diabetics (n = 34)	P
Age (years)	35.6 (9.0)	36.5 (8.9)	0.963
Alcohol intake (g/day)	2.9 (0–7.1)	5.7 (2.9–15.0)	0.008
Current smokers (n, %)	7 (20.6)	12 (35.3)	0.089
Physical activity (MET-min/week)	1395.0 (779.6–2265.8)	1903.0 (910.5–2776.5)	0.270
Family history of CHD (n, %)	2 (5.9)	2 (5.9)	1.000
Family history of type 2 diabetes (n, %)	5 (14.7)	7 (20.6)	0.525
Family history of type 1 diabetes (n, %)	0 (0)	2 (5.9)	0.493
Hypertension (n, %)	3 (8.8)	13 (38.2)	0.004
Dyslipidaemia (n, %)	17 (50.0)	18 (52.9)	0.808
Diabetes duration (years)	–	14.7 (8.5)	–
Microvascular complications	–	9 (26.5)	–
Retinopathy (n, %)	–	5 (14.7)	–
None	–	29 (85.3)	–
Non-proliferative	–	4 (11.8)	–
Proliferative	–	1 (2.9)	–
Nephropathy (n, %)	–	6 (17.6)	–
Peripheral polyneuropathy (n, %)	–	0 (0)	–
Body mass index (kg/m ²)	25.0 (2.8)	26.1 (3.3)	0.138
Waist (cm)	91.0 (10.1)	90.6 (11.3)	0.862
Waist-to-hip ratio	0.90 (0.10)	0.91 (0.07)	0.532
Systolic blood pressure (mmHg)	124.9 (9.5)	131.7 (10.8)	0.008
Diastolic blood pressure (mmHg)	73.8 (8.0)	76.7 (7.0)	0.124
Mean arterial pressure (mmHg)	90.8 (8.1)	95.0 (7.3)	0.029
Fasting plasma glucose (mmol/L)	4.76 (0.57)	8.71 (3.76)	< 0.001
Total cholesterol (mmol/L)	5.08 (1.54)	4.74 (0.82)	0.260
Triglycerides (mmol/L)	0.88 (0.69–1.29)	0.83 (0.69–1.14)	0.585
HDL cholesterol (mmol/L)	1.31 (1.13–1.49)	1.31 (1.11–1.76)	0.560
LDL cholesterol (mmol/L)	2.81 (2.26–3.59)	2.61 (2.23–3.13)	0.213
HbA _{1c} (%)	5.4 (5.1–5.5)	7.3 (6.6–7.9)	< 0.001
UAC ratio (mg/mmol)	0.39 (0.30–0.51)	0.28 (0.20–0.47)	0.125
RH-PAT index (%)	1.61 (1.40–2.17)	1.55 (1.38–1.98)	0.556
sICAM-1 (ng/mL)	58.3 (53.2–66.6)	62.8 (49.5–73.7)	0.540
sVCAM-1 (ng/mL)	774.9 (581.0–903.7)	678.7 (520.7–982.0)	0.516
E-selectin (ng/mL)	82.0 (62.4–103.1)	146.3 (84.8–211.6)	0.001
hs-CRP (mg/L)	0.6 (0.3–1.1)	1.2 (0.5–2.9)	0.036
IL-6 (pg/mL)	0.3 (0.2–0.6)	0.6 (0.3–1.0)	0.002
sTNFαR1 (pg/mL)	1410 (1113–2308)	2739 (1748–3224)	< 0.001
sTNFαR2 (pg/mL)	2060 (1870–2365)	2774 (2267–3064)	< 0.001
aPWV (m/s)	6.30 (5.69–6.70)	6.90 (6.46–7.91)	< 0.001

MET: metabolic equivalent; CHD: coronary heart disease; HDL/LDL: high-density/low-density lipoprotein; UAC: urinary albumin-to-creatinine; RH-PAT: reactive hyperaemia peripheral arterial tonometry; sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1: soluble vascular cell adhesion molecule-1; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; IL-6: interleukin-6; sTNFαR1/2: soluble fractions of tumour necrosis factor-α receptors 1/2; aPWV, aortic pulse wave velocity. Data are presented as percentages, means (SD) or medians (interquartile range); statistical significance is indicated in bold.

Please cite this article in press as: Llauradó G, et al. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Metab* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2013.03.006>

Table 2
Clinical characteristics of the female study population.

Women	Healthy controls (n = 34)	Type 1 diabetics (n = 34)	P
Age (years)	35.3 (11.4)	35.2 (11.2)	0.971
Alcohol intake (g/day)	1.4 (0–2.9)	0.0 (0.0–0.7)	0.001
Current smokers (n, %)	9 (26.5)	12 (35.3)	0.536
Physical activity (MET-min/week)	1386.0 (770.3–2079.0)	1386.0 (672.8–1686.0)	0.442
Family history of CHD (n, %)	4 (11.8)	1 (2.9)	0.356
Family history of type 2 diabetes (n, %)	7 (20.6)	9 (26.5)	0.567
Family history of type 1 diabetes (n, %)	1 (2.9)	3 (8.8)	0.614
Hypertension (n, %)	0 (0)	4 (11.8)	0.114
Dyslipidaemia (n, %)	17 (50.0)	14 (41.2)	0.465
Diabetes duration (years)	–	13.0 (8.0)	–
Microvascular complications (n, %)	–	7 (20.6)	–
Retinopathy (n, %)	–	5 (14.7)	–
None	–	29 (85.3)	–
Non-proliferative	–	2 (5.9)	–
Proliferative	–	3 (8.8)	–
Nephropathy (n, %)	–	3 (8.8)	–
Peripheral polyneuropathy (n, %)	–	0 (0)	–
Body mass index (kg/m ²)	23.0 (3.1)	25.3 (3.9)	0.009
Waist (cm)	76.3 (6.9)	80.0 (10.3)	0.092
Waist-to-hip ratio	0.80 (0.06)	0.81 (0.07)	0.529
Systolic blood pressure (mmHg)	116.3 (9.5)	118.3 (9.6)	0.379
Diastolic blood pressure (mmHg)	67.9 (7.8)	69.1 (7.9)	0.508
Mean arterial blood pressure (mmHg)	84.0 (7.9)	85.5 (7.5)	0.417
Fasting plasma glucose (mmol/L)	4.59 (0.48)	9.59 (3.55)	< 0.001
Total cholesterol (mmol/L)	5.18 (1.11)	4.82 (0.92)	0.146
Triglycerides (mmol/L)	0.72 (0.56–0.93)	0.70 (0.53–0.84)	0.484
HDL cholesterol (mmol/L)	1.77 (1.46–1.99)	1.80 (1.49–2.20)	0.377
LDL cholesterol (mmol/L)	2.78 (2.18–3.48)	2.47 (1.90–2.97)	0.056
HbA _{1c} (%)	5.3 (5.2–5.4)	7.8 (7.1–9.1)	< 0.001
UAC ratio (mg/mmol)	0.38 (0.27–0.65)	0.47 (0.30–0.91)	0.315
RH-PAT index (%)	2.08 (1.79–2.49)	2.07 (1.55–2.31)	0.215
sICAM-1 (ng/mL)	53.4 (45.1–58.7)	56.2 (52.4–67.4)	0.032
sVCAM-1 (ng/mL)	705.4 (528.6–1007.0)	950.1 (708.7–1217.4)	0.008
E-selectin (ng/mL)	60.7 (45.3–91.5)	88.7 (65.0–144.9)	0.009
hs-CRP (mg/L)	0.9 (0.4–2.8)	1.4 (0.7–2.5)	0.447
IL-6 (pg/mL)	0.4 (0.2–0.6)	0.6 (0.3–1.2)	0.039
sTNFαR1 (pg/mL)	1917 (1355–3295)	2262 (1366–2978)	0.864
sTNFαR2 (pg/mL)	2215 (1897–2700)	2295 (2018–3006)	0.320
aPWV (m/s)	6.00 (5.30–6.71)	6.35 (5.94–7.46)	0.024

MET: metabolic equivalent; CHD: coronary heart disease; HDL/LDL: high-density/low-density lipoprotein; UAC: urinary albumin-to-creatinine; RH-PAT: reactive hyperaemia peripheral arterial tonometry; sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1: soluble vascular cell adhesion molecule-1; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; IL-6: interleukin-6; sTNFαR1/2: soluble fractions of tumour necrosis factor-α receptors 1/2; aPWV, aortic pulse wave velocity. Data are presented as percentages, means (SD) or medians (interquartile range); statistical significance is indicated in bold.

Please cite this article in press as: Llauradó G, et al. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Metab* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2013.03.006>



Table 3

Spearman's correlation coefficients (*P* values) for the association between aortic pulse wave velocity (aPWV) and endothelial dysfunction (ED) by study group and gender.

	Healthy subjects			Type 1 diabetics		
	All	Men	Women	All	Men	Women
RH-PAT index	−0.112 (0.361)	−0.260 (0.138)	0.091 (0.607)	−0.139 (0.257)	−0.017 (0.923)	−0.093 (0.602)
sICAM-1	0.051 (0.678)	−0.050 (0.778)	0.011 (0.950)	0.127 (0.303)	0.082 (0.643)	0.153 (0.437)
sVCAM-1	−0.149 (0.226)	−0.326 (0.060)	−0.072 (0.688)	−0.174 (0.156)	−0.150 (0.398)	−0.138 (0.437)
E-selectin	0.324 (0.007)	−0.022 (0.901)	0.496 (0.003)	0.219 (0.073)	0.295 (0.090)	0.186 (0.293)
ED general score	0.084 (0.498)	−0.202 (0.251)	0.227 (0.196)	0.055 (0.653)	0.076 (0.667)	0.018 (0.919)

RH-PAT: reactive hyperaemia peripheral arterial tonometry; sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1: soluble vascular cell adhesion molecule-1.

Statistical significance is indicated in bold.

macrovascular complications [23,25]. Our results are in agreement with such findings. Our study found that patients with type 1 diabetes had higher serum concentrations of sICAM-1 and E-selectin.

The mechanisms responsible for the AS increase in type 1 diabetes are likely to reflect the complex interaction between structural and functional changes in the arterial wall [16]. Structural changes are characterized by overproduction of abnormal collagen and diminished quantities of normal elastin. Various mechanisms, such as low-grade inflammation and the accumulation of advanced glycation end-products (AGEs), could also be involved in this imbalance [16]. ED is characterized by reduced bioavailability of vasodilators such as nitric oxide and increased production of vasoconstrictors such as endothelin-1 [5], which can lead to functional stiffening of the arterial wall. However, the relationship between ED and AS is controversial. Some studies demonstrate a clear association in both healthy subjects and those with CV disease [17–21], whereas others have failed to find such a relationship, especially in the presence of more advanced atherosclerosis [35,36]. Data in type 1 diabetics evaluating the relationship between ED and AS are limited. To our knowledge, only one study found an association between aPWV and ED serum markers [37], while others evaluating endothelium-dependent vasodilatation failed to find any such association [38,39]. The RH-PAT index is a dynamic measure that reflects the acute (rather than chronic) status of endothelial function, whereas aPWV reflects the effects of CV risk factors over a much longer period of time. As our study subjects were younger than those included in previous studies reporting an association between ED and AS, this difference could explain the lack of any association between ED and aPWV in our cohort.

The major limitation of our present study was its cross-sectional design. This means that any inferences on causality should be made with caution. Also, the observational design could not ensure complete control of all potentially (unknown) confounding factors. In addition, the source of our healthy controls was not ideal and was more likely to introduce bias. This was another limitation and might possibly explain the lack of difference in the RH-PAT index between our groups in the unadjusted analyses. It would also have been of interest to assess endothelial function using the brachial artery flow-mediated dilatation (FMD) technique. Although the RH-PAT technique has been associated with brachial and coronary artery

endothelial function [6,7], FMD is currently the best-validated technique available and well supported by prospective data. However, the technique was not available at our hospital. Furthermore, concentrations of ED serum markers were measured only once, which might have underestimated the association between them and AS, and only some of these markers were measured, so our present findings cannot be extrapolated to other ED markers.

5. Conclusion

Our study has demonstrated that ED is increased in type 1 diabetes patients with no previous clinical CV events compared with age-matched healthy (non-diabetic) subjects, and that gender differences for ED are lost in this population. However, ED was not associated with AS. These findings suggest that ED arises earlier than AS in type 1 diabetes.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgements

Financial support was provided by:

Fundaci la Marat de TV3 2008 (TV3 Marathon Foundation 2008; Project N° 081410);

FIS PS09/01360, *Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo* (Carlos III Institute of Health, Ministry of Health and Consumer Affairs), Spain;

Intensification Grant to José Miguel González-Clemente (Carlos III Institute of Health, Ministry of Health and Consumer Affairs, Spain).

References

- [1] Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet* 2006;367:847–58.
- [2] Libby P, Nathan DM, Abraham K, Brunzell JD, Fradkin JE, Haffner SM, et al. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on cardiovascular complications of type 1 diabetes mellitus. *Circulation* 2005;111:3489–93.

Please cite this article in press as: Llauradó G, et al. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Metab* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2013.03.006>

- [3] Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Burden AC, Morris A, Waugh NR, et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia* 2003;46:760–5.
- [4] Secrest AM, Becker DJ, Kelsey SF, Laporte RE, Orchard TJ. Cause-specific mortality trends in a large population-based cohort with long-standing childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetes* 2010;59:3216–22.
- [5] Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:143–59.
- [6] Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes Jr DR, Kuvin JT, Lerman A. Non-invasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2137–41.
- [7] Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, et al. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 2003;146:168–74.
- [8] Kuvin JT, Mammen A, Mooney P, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Assessment of peripheral vascular endothelial function in the ambulatory setting. *Vasc Med* 2007;12:13–6.
- [9] Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasani RS, Schnabel R, Pryde MM, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117:2467–74.
- [10] Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, et al. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* 2010;31:1142–8.
- [11] Haller MJ, Stein J, Shuster J, Theriaque D, Silverstein J, Schatz DA, et al. Peripheral artery tonometry demonstrates altered endothelial function in children with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2007;8:193–8.
- [12] Mahmud FH, Van Uum S, Kanji N, Thiessen-Philbrook H, Clarson CL. Impaired endothelial function in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr* 2008;152:557–62.
- [13] Cavalcante JL, Lima JA, Redheuil A, Al-Mallah MH. Aortic stiffness: current understanding and future directions. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1511–22.
- [14] Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1318–27.
- [15] Llauradó G, Ceperuelo-Mallafre V, Vilardell C, Simó R, Freixenet N, Vendrell J, et al. Arterial Stiffness Is Increased in Patients With Type 1 Diabetes Without Cardiovascular Disease: A potential role of low-grade inflammation. *Diabetes Care* 2012;35:1083–9.
- [16] Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:932–43.
- [17] McEniery CM, Wallace S, Mackenzie IS, McDonnell B, Yasmin, Newby DE, et al. Endothelial function is associated with pulse pressure, pulse wave velocity, and augmentation index in healthy humans. *Hypertension* 2006;48:602–8.
- [18] Malik AR, Kondragunta V, Kullo IJ. Forearm vascular reactivity and arterial stiffness in asymptomatic adults from the community. *Hypertension* 2008;51:1512–8.
- [19] Jadhav UM, Kadam NN. Non-invasive assessment of arterial stiffness by pulse-wave velocity correlates with endothelial dysfunction. *Indian Heart J* 2005;57:226–32.
- [20] Wallace SM, Yasmin, McEniery CM, Maki-Petaja KM, Booth AD, Cockcroft JR, et al. Isolated systolic hypertension is characterized by increased aortic stiffness and endothelial dysfunction. *Hypertension* 2007;50:228–33.
- [21] McCall DO, McGartland CP, Woodside JV, Sharpe P, McCance DR, Young IS. The relationship between microvascular endothelial function and carotid-radial pulse wave velocity in patients with mild hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2010;32:474–9.
- [22] Sibal L, Aldibbiat A, Agarwal SC, Mitchell G, Oates C, Razvi S, et al. Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria. *Diabetologia* 2009;52:1464–73.
- [23] Astrup AS, Tarnow L, Pietraszek L, Schalkwijk CG, Stehouwer CD, Parving HH, et al. Markers of endothelial dysfunction and inflammation in type 1 diabetic patients with or without diabetic nephropathy followed for 10 years: association with mortality and decline of glomerular filtration rate. *Diabetes Care* 2008;31:1170–6.
- [24] Costacou T, Lopes-Virella MF, Zgibor JC, Virella G, Otvos J, Walsh M, et al. Markers of endothelial dysfunction in the prediction of coronary artery disease in type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *J Diabetes Complications* 2005;19:183–93.
- [25] Lin J, Glynn RJ, Rifai N, Manson JE, Ridker PM, Nathan DM, et al. Inflammation and progressive nephropathy in type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 2008;31:2338–43.
- [26] Hallal PC, Victora CG. Reliability and validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ). *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:556.
- [27] Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2007;28:1462–536.
- [28] National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on 17 Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment 18 Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143–421.
- [29] Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006;27:2588–605.
- [30] Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk C, Giorgino F, Ebeling P, Fuller JH, et al. Vascular risk factors and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care* 2003;26:2165–73.
- [31] Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Fuller JH, Stehouwer CD. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes—the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2005;48:370–8.
- [32] Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 1997;273:L119–26.
- [33] Steinberg HO, Paradisi G, Cronin J, Crowde K, Hempfling A, Hook G, et al. Type II. Diabetes abrogates sex differences in endothelial function in premenopausal women. *Circulation* 2000;101:2040–6.
- [34] Chan NN, Vallance P, Colhoun HM. Endothelium-dependent and -independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: role of conventional risk factors, sex, and glycemic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1048–54.
- [35] Kopec G, Podolec P, Podolec J, Rubis P, Zmudka K, Tracz W. Atherosclerosis progression affects the relationship between endothelial function and aortic stiffness. *Atherosclerosis* 2009;204:250–4.
- [36] Yokoyama H, Sone H, Saito K, Yamada D, Honjo J, Haneda M. Flow-mediated dilation is associated with microalbuminuria independent of cardiovascular risk factors in type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb* 2011;18:744–52.
- [37] Stadler M, Theuer E, Anderwald C, Hanusch-Enserer U, Auinger M, Bieglmayer C, et al. Persistent arterial stiffness and endothelial dysfunction following successful pancreas-kidney transplantation in Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2009;26:1010–8.
- [38] Berry KL, Skyrme-Jones RA, Cameron JD, O'Brien RC, Meredith IT. Systemic arterial compliance is reduced in young patients with IDDM. *Am J Physiol* 1999;276:H1839–45.
- [39] Tryfonopoulos D, Anastasiou E, Protogerou A, Papaioannou T, Lily K, Dagne A, et al. Arterial stiffness in type 1 diabetes mellitus is aggravated by autoimmune thyroid disease. *J Endocrinol Invest* 2005;28:616–22.

Please cite this article in press as: Llauradó G, et al. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Metab* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2013.03.006>

9. Discussió

9. Discussió

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, la malaltia cardiovascular constitueix la major causa de morbi-mortalitat en la DM1. El risc relatiu de malaltia cardiovascular en la DM1 és 10 vegades superior respecte al de la població no diabètica (2; 3), sent inclús superior al de la DM2 (4). Els mecanismes implicats en aquest excés de risc no s'expliquen completament pels factors de risc cardiovascular clàssics. Aquest fet constitueix un dels obstacles principals per a una millor predicció del risc cardiovascular en aquests individus, especialment en les fases inicials de l'arteriosclerosi (abans del primer episodi cardiovascular).

La RA permet avaluar l'arteriosclerosi en la fase preclínica i ha demostrat que afegeix un valor predictiu d'episodis i mortalitat cardiovascular addicional a la resta de factors de risc clàssics en població general (184; 191; 198). Aquest fet fa possible hipotetitzar que la seva avaluació podria facilitar una millor estratificació del risc cardiovascular de les persones amb DM1. Per aquest motiu, ens vam plantejar estudiar la RA central (mitjançant la mesura de la VOPa) en un grup de persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia, així com avaluar els possibles mecanismes fisiopatològics associats al seu increment, centrant-nos especialment en el paper de la ISBG i la disfunció endotelial.

La principal troballa del nostre treball és que les persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia presenten un increment de la VOPa, en comparació amb els controls sans i, que aquest augment és independent de la resta de factors de risc cardiovascular clàssics. A més a més, les persones amb DM1 presenten un augment de les concentracions sèriques de marcadors d'ISBG, una disminució de les concentracions sèriques de sTWEAK i un augment dels marcadors de disfunció endotelial. No obstant, només la ISBG es va associar a l'increment de la VOPa.

Rigidesa arterial en la diabetis mellitus tipus 1

Tal i com hem esmentat, en el nostre treball hem objectivat que les persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia presentaven un increment dels valors de la VOPa en comparació amb un grup de controls sans (emparellats per edat i sexe), diferències que es van mantenir estadísticament significatives després d'ajustar pels factors de risc cardiovascular clàssics. Els nostres resultats han confirmat, en una

població més nombrosa, resultats publicats en estudis previs, on s'havia objectivat un increment de la VOPa en persones adultes amb DM1, mesurada mitjançant tonometria d'aplanament (203; 208). Un altre treball publicat *a posteriori* també ha confirmat aquest resultat (209).

També hem objectivat una associació positiva entre la VOPa i els diferents factors de risc cardiovascular clàssics, sent els seus principals determinants (a part de la presència de DM1): l'edat i l'IMC. La VOPa ha demostrat ser un bon predictor independent d'episodis cardiovasculars, mortalitat cardiovascular i mortalitat total en població general, en persones d'edat avançada, en individus amb HTA, en persones amb IRC terminal i en persones amb DM2 (177). Pel que fa a la RA, hem demostrat la seva associació de forma independent amb la DM1 després d'ajustar per la resta de factors de risc cardiovascular clàssics. Aquest fet indicaria que la mesura de la RA aportaria un valor addicional als factors de risc clàssics pel que fa a la predicció del risc cardiovascular en la DM1 (184; 191; 198). En aquest sentit, altres autors han postulat que la RA integraria el dany produït sobre la paret arterial pels diferents factors de risc cardiovascular (clàssics i no clàssics, coneguts i no coneguts) durant tota la vida del individu, mentre que, els valors dels factors de risc cardiovascular, al fluctuar al llarg del temps, no permetrien una avaluació tan acurada del seu impacte sobre el risc cardiovascular (119). Actualment, només un estudi prospectiu ha avaluat la relació entre la RA i la predicció d'episodis cardiovasculars en la DM1. En aquest estudi, es va objectivar que la PPC era un predictor independent d'episodis cardiovasculars després d'ajustar per la resta de factors de risc clàssics. No obstant, aquesta associació desapareixia al tenir en compte l'antecedent de malaltia cardiovascular prèvia. Tot i aportar paràmetres centrals derivats de l'anàlisi de l'ona del pols, en aquest estudi, els autors no van donar dades sobre el valor pronòstic de la VOPa (217). Per tant, a dia d'avui encara no disposem d'estudis prospectius per tal d'establir el possible valor pronòstic de la VOPa per a episodis i mortalitat cardiovascular en persones amb DM1.

Per altra banda, diversos estudis de tall transversal han demostrat una associació entre l'increment de la RA (mesurada mitjançant la VOPa) i la presència de complicacions cròniques com la retinopatia, la nefropatia, la neuropatia autonòmica, la malaltia cardiovascular i la malaltia arterial perifèrica (209; 214; 215). En el nostre treball, no hem objectivat cap associació entre l'increment de la VOPa i la presència de

complicacions microvasculars (les complicacions macrovasculars eren criteri d'exclusió). No obstant, cal destacar que el nombre de persones incloses que presentaven alguna complicació microangiopàtica era, probablement, massa petit per trobar alguna associació significativa. Avaluat la relació entre la RA i la presència de complicacions microvasculars no era l'objectiu del treball i per tant el nostre estudi no estava específicament dissenyat per a aquest fi. Aquest fet justificaria aquesta manca d'associació.

Pel que fa a l'associació entre l'increment de RA i el control glucèmic, les dades actualment són molt escasses en persones amb DM1. Alguns autors han reportat una associació entre l'increment de la VOPa i les xifres de glucèmia plasmàtica en dejú (202) o la glucèmia mitjana diària (213). No obstant, altres autors no han observat cap correlació entre la RA i els valors d'HbA1c (200; 207) ni amb altres paràmetres de control glucèmic com la mesura de la variabilitat glucèmica amb l'índex d'amplitud mitjana de les excursions glucèmiques (*MAGE: Mean Amplitude Glucose Excursions*) (213), resultats que estarien en concordança amb els nostres. En el moment actual, tampoc existeix cap estudi prospectiu que hagi avaluat si la millora del control glucèmic es tradueix en un descens de la RA. Per últim, la possible relació entre l'increment de la VOPa i la durada de la malaltia tampoc està clarament establerta (200; 207).

Inflamació sistèmica de baix grau i diabetis mellitus tipus 1. Paper de la Inflamació sistèmica de baix grau en l'increment de rigidesa arterial.

La DM1 s'associa a un estat d'ISBG en diverses fases de la malaltia. Aquest estat d'ISBG, s'ha associat principalment al desenvolupament de complicacions cròniques, tan micro com macroangiopàtiques (61). En el nostre treball hem objectivat que les persones amb DM1 presentaven un augment de les concentracions sèriques dels marcadors d'ISBG en comparació amb el grup control, en concordança amb altres estudis publicats anteriorment (250; 251). Tot i que aquest fet no és nou, probablement existeixen menys dades a la literatura que facin referència a les possibles diferències entre sexes. En el nostre estudi hem observat que els homes amb DM1 presentaven concentracions sèriques superiors de PCRus, IL-6, sR1TNF α i sR2TNF α en comparació amb el grup control. Per contra, les dones només presentaven

diferències en relació a les concentracions sèriques d'IL-6. Tot i aquestes discrepàncies, no hem objectivat diferències significatives entre sexes dins de cada grup que justificuessin aquest fet (és a dir que no hem trobat diferències entre homes i dones del grup control ni diferències entre homes i dones del grup amb DM1 respectivament). Altres estudis han reportat un increment dels marcadors d'ISBG en les dones amb DM1 en comparació amb els homes amb DM1 (250-252). No obstant, altres autors no han objectivat diferències entre gèneres en les persones amb DM1, en concordança amb els nostres resultats (253-255).

El nostre treball ha demostrat, per primer cop, una associació entre la RA i la ISBG en persones amb DM1. Hem observat que les persones amb DM1 presentaven valors superiors de VOPa i concentracions sèriques superiors dels marcadors d'ISBG en comparació amb el grup control. Després d'ajustar pels possibles factors de confusió i tenint en compte la presència de DM1, el *score* general d'ISBG (descriu anteriorment a l'apartat de mètodes) va ser un dels principals predictors independents de l'increment de la VOPa. Associacions similars entre la VOPa i la ISBG s'han descrit prèviament en població sana (225), en individus amb HTA (226), en persones amb IRC (256) i en individus amb síndrome metabòlica (257). No obstant, cal destacar que, en el nostre estudi, només hem trobat aquesta associació en el cas del sexe masculí. Tsioufis *et al.* (229) van publicar resultats similars en individus amb HTA. Els autors van objectivar que les concentracions de PCRus i d'adiponectina eren predictors independents de la VOPa només en homes. Colhoun *et al.* (258) van observar que les concentracions de PCRus s'associaven de forma independent a la presència de calci coronari (mesura validada d'aterosclerosi coronària) només en homes amb DM1. Aquests resultats recolzarien l'existència d'algunes diferències de gènere en la fisiopatologia de la malaltia cardiovascular en la DM1, fent palès que calen més estudis per tal d'aclarir-les.

Els mecanismes exactes responsables de l'increment de RA en la DM1 encara no es coneixen del tot. Probablement, reflecteixen una sèrie de canvis, tant a nivell estructural com a nivell funcional, de la paret arterial. Els nostres resultats suggereixen que la ISBG associada a la DM1 podria estar implicada en aquests canvis.

sTWEAK i sCD163 en la diabetis mellitus tipus 1. Relació amb els factors de risc cardiovascular i l'increment de rigidesa arterial.

En el nostre treball, a part d'avaluar els marcadors d'ISBG més coneguts (com serien la PCRus, la IL-6 o els sR1TNF α i sR2TNF α) hem avaluat també dos marcadors relacionats amb la ISBG i descrits més recentment: el sTWEAK i el CD163. Tal i com s'ha descrit en la introducció, el sTWEAK és un nou membre, descrit recentment, de la superfamília del TNF α (77). Presenta múltiples funcions biològiques, incloent l'estimulació del creixement cel·lular i l'angiogènesi, la inducció de la inflamació i, en determinades condicions, l'estimulació de l'apoptosi (77). El CD163 es considera el seu *scavenger receptor* (87) que actuaria com un immunomodulador de la placa d'ateroma, amb propietats antiinflamatòries i antiaterogèniques (90).

En aquest estudi, hem objectivat que les persones amb DM1 presentaven concentracions sèriques de sTWEAK disminuïdes, en comparació amb els controls sans. En estudis previs, s'ha descrit una disminució de les concentracions sèriques de sTWEAK en persones amb aterosclerosi carotídia (78), malaltia coronària, malaltia arterial perifèrica (79; 80) o amb altres malalties associades a un risc cardiovascular elevat com serien la IRC terminal o la DM2 (81). Aquests estudis concordarien amb els nostres resultats, ja que la DM1 també és una malaltia caracteritzada per un elevat risc cardiovascular. De fet, en el nostre estudi, la presència de DM1 va ser un dels predictors independents més important de les concentracions sèriques de sTWEAK.

Adicionalment, els homes amb DM1 presentaven un augment de les concentracions sèriques de sCD163, tot i que aquest increment no es va mantenir després d'ajustar per la resta de factors de risc cardiovascular. En estudis anteriors, les concentracions sèriques elevades d'aquest receptor s'han associat a un perfil cardiovascular més advers, al contrari que les concentracions de sTWEAK. En el mateix sentit, en estudis previs s'ha demostrat que les concentracions sèriques de sCD163 estan incrementades en persones amb aterosclerosi (91; 92) o a malalties associades com la DM2 (93).

Les concentracions de sTWEAK es van correlacionar negativament amb la PA, amb la glucèmia plasmàtica en dejú i amb els valors d'HbA1c. Estudis previs havien reportat exclusivament una associació negativa entre la glucèmia plasmàtica basal i les concentracions sèriques de sTWEAK, sense objectivar cap correlació amb la resta de

factores de risc cardiovascular (78; 81). A més a més, en el nostre treball hem objectivat una correlació inversa entre les concentracions sèriques de sTWEAK i l'obesitat central, així com amb la presència de resistència a la insulina (mesurada mitjançant eGDR) (tot i que només en homes). Aquestes dades concorden amb un estudi previ publicat per Kralisch *et al.* en què les concentracions sèriques de sTWEAK es correlacionaven negativament amb la insulino-resistència (estimada mitjançant el HOMA-IR) en persones amb DM2 en hemodiàlisi (81).

Per contra, en el nostre treball, les concentracions sèriques de sCD163 només es van associar positivament (tot i que de forma marginal) amb els valors d'HbA1c (en el cas dels homes) i amb la resistència a la insulina (en el cas de les dones), sense presentar cap clara associació amb la resta de factors de risc cardiovascular clàssics. Les dades existents a la literatura que descriuen la relació entre les concentracions de sCD163 i els factors de risc cardiovascular són contradictòries. Alguns autors han reportat una associació positiva entre el sCD163 i mesures antropomètriques o la PA (259) però altres no han trobat cap associació entre elles (91; 92).

D'altra banda, hem descrit per primer cop, una associació inversa entre les concentracions sèriques de sTWEAK i la presència de complicacions microvasculars. En les persones amb DM1, la retinopatia diabètica va ser un dels principals determinants del sTWEAK en el model de regressió lineal multivariant. Estudis previs realitzats *in vivo* en teixit corneal de rata, han demostrat que TWEAK estimularia la formació de vasos sanguinis. No obstant, es desconeix quin paper jugaria aquesta citocina en el procés d'angiogènesi associat a la retinopatia diabètica (260). Tot i que aquest fet podria semblar aparentment contradictori, també s'ha descrit un augment de l'expressió de TWEAK i el seu receptor (Fn14) a nivell de la placa d'ateroma en estudis *in vivo* (261; 262) i per contra una disminució de les concentracions sèriques de sTWEAK en persones amb elevat risc cardiovascular (78; 263). Aquestes diferències podrien explicar-se per una diferència d'acció del TWEAK segons sigui local o sistèmica. No obstant, fan falta més estudis de caire prospectiu per tal de poder establir si el sTWEAK és un marcador predictor de les complicacions cròniques de la DM.

El paper del TWEAK pot semblar paradoxal perquè, per una banda, indueix la producció de marcadors inflamatoris i incrementa l'expressió de MMPs que degraden la MEC (77), però, per altra banda, en contra d'aquest paper proinflamatori, s'ha

demostrat que atenua la transició de la immunitat innata cap a la immunitat adquirida (264), modulant l'activitat d'altres citocines inflamatòries, com per exemple el TNF α . En aquest sentit, estudis previs han objectivat una correlació negativa entre les concentracions de sTWEAK i els marcadors d'ISBG com la PCRus i la IL-6 (84; 86). D'acord amb aquests resultats, hem descrit una associació negativa entre les concentracions de sTWEAK i les concentracions sèriques d'IL-6 i del *score* general d'ISBG. Per contra, les concentracions de sCD163 s'han associat de forma positiva a l'augment de les concentracions dels marcadors d'ISBG com la PCR, la IL-6 i el TNF α (91; 259; 265). Aquest perfil proinflamatori atribuït al CD163 només es va trobar de forma marginal en el nostre estudi, demostrant-se una associació dèbil amb el sR2TNF α (únicament en homes).

El paper que juguen el sTWEAK i el sCD163 en la patogènesi de l'aterosclerosi continua pendent d'aclarir. Com ja hem esmentat, estudis previs han demostrat que el gruix de l'íntima-mèdia carotídia s'associava inversament a les concentracions de sTWEAK (78), associació que es mantenia significativa després d'ajustar per la resta de factors de risc cardiovascular clàssics i pels marcadors d'ISBG. En concordança amb aquests resultats, hem trobat una associació negativa entre les concentracions de sTWEAK i l'increment de la VOPa, tot i que només en homes, i sense mantenir-se significativa després d'ajustar pels possibles factors de confusió. Actualment, només hi ha un altre estudi que hagi avaluat el paper del sTWEAK en la patogènesi de la RA (publicat posteriorment al nostre treball), i que no ha trobat cap associació entre les concentracions sèriques de sTWEAK i la VOPa en persones amb IRC terminal en hemodiàlisi (266). Per altra banda, Moreno *et al.* van observar una associació positiva entre el gruix de l'íntima-mèdia carotídia i les concentracions sèriques de sCD163 amb independència de la resta de factors de risc cardiovascular clàssics i dels marcadors d'ISBG en un grup de persones de la població general sense malaltia cardiovascular prèvia (92). Per contra, en el nostre estudi no hem trobat cap associació entre la VOPa i el sCD163. Per tant, no hem pogut confirmar l'associació entre aquests marcadors i la RA com a manifestació d'arteriosclerosi preclínica en la DM1. Com han suggerit alguns autors, és probable que el gruix de l'íntima-mèdia carotídia reflecteixi canvis estructurals de la paret arterial en relació a l'arteriosclerosi més avançats que la RA (267). La nostra població era més jove que la inclosa en estudis previs que reportaven

associacions entre la íntima-mèdia carotídia i les concentracions sèriques del sTWEAK o el sCD163. Potser aquestes diferències explicarien la manca d'associació entre la RA i els marcadors sTWEAK i sCD163 en el nostre treball.

Pel que fa als estudis prospectius, un descens de les concentracions sèriques de sTWEAK han demostrat ser un predictor independent de mortalitat total en persones amb insuficiència cardíaca crònica d'origen no isquèmic (82). Addicionalment, això també s'ha associat a la predicció d'episodis cardiovasculars en persones amb IRC (83) i malaltia arterial perifèrica (84). En sentit contraposat, un augment de les concentracions de sTWEAK s'ha associat a la predicció de resultats adversos a curt termini en individus amb infart agut de miocardi amb elevació del ST (85) i amb mortalitat cardiovascular i mortalitat total en persones amb IRC en hemodiàlisi (86). La discrepància de resultats ens porta a concloure que fan falta estudis prospectius que aclareixin el paper potencial d'aquests dos marcadors (sTWEAK i sCD163) en l'aterosclerosi i el seu valor predictiu.

Disfunció endotelial i diabetis mellitus tipus 1. Diferències de gènere i relació amb l'increment de rigidesa arterial.

En el context dels mecanismes fisiopatològics de l'arteriosclerosi s'accepta que la disfunció endotelial precedeix el desenvolupament de l'arteriosclerosi i que la hiperglucèmia promou el dany vascular, incrementant el risc d'episodis cardiovasculars. Per tant, la detecció precoç de disfunció endotelial pot ser important en la DM1, abans del desenvolupament de malaltia cardiovascular clínica establerta. En el nostre treball, hem descrit per primera vegada, en adults amb DM1 i sense malaltia cardiovascular prèvia, la presència de disfunció endotelial mesurada per pletismografia arterial perifèrica. Addicionalment, hem observat que la DM1 anul·la les diferències de gènere existents en població sana (on s'ha descrit que els homes presenten més disfunció endotelial que les dones), suggerint que les dones amb DM1 serien més propenses a la disfunció endotelial que les dones sanes.

Estudis previs realitzats en població pediàtrica, en els que es va utilitzar l'índex RH-PAT, van observar que les persones amb DM1 presentaven *scores* inferiors en comparació amb el grup control (268; 269). No obstant, en cap d'aquests estudis es van avaluar les possibles diferències entre sexes. Posteriorment, un estudi publicat al

mateix temps que el nostre treball, ha avaluat les possibles diferències entre sexes en un grup d'adolescents amb DM1, i ha objectivat que únicament les adolescents amb DM1 presenten més disfunció endotelial en comparació amb les adolescents sanes (270). En concordança amb aquests resultats, hem observat que el principal determinant de l'índex RH-PAT és la presència de DM1, tot i que només en dones. Estudis realitzats prèviament en població general mostren que els homes tenen *scores* de l'índex RH-PAT més baixos que les dones, reflectint, per tant, una major disfunció endotelial (102). En el nostre estudi hem observat que, aquest efecte protector propi de les dones de la població general, desapareixia en el nostre grup de persones amb DM1, en el que la disfunció endotelial era similar entre homes i dones. Alguns estudis suggereixen que els estrògens estimularien de forma directa la producció i alliberació d'ON en les dones (271). Per tant, les diferències existents pel que fa a les hormones sexuals entre tots dos sexes serien un dels mecanismes implicats en les diferències pel que fa als valors de disfunció endotelial. En aquest sentit, un estudi realitzat en persones amb DM2, en què s'avaluava la vasodilatació depenent d'endoteli (mitjançant la mesura de la variació del flux sanguini en resposta a la infusió intraarterial a nivell femoral de clorur de metacolina), va demostrar que la presència de DM2 abolia aquestes diferències entre homes i dones (272). Els nostres resultats serien concordants amb aquestes troballes i suggeririen que les dones amb DM1 són més propenses a la disfunció endotelial en comparació amb les dones de la població control. No obstant, les dades disponibles actualment en DM1 són escasses i contradictòries (273). Per tant, fan falta més estudis per aclarir les potencials diferències de gènere en l'aparició de disfunció endotelial en la DM1 i, addicionalment, clarificar la possible contribució de les hormones sexuals en la patogènesi de la malaltia cardiovascular en la DM1.

Estudis previs han demostrat que la DM1 s'acompanya d'un increment de les concentracions sèriques de marcadors de disfunció endotelial (114) i que aquest increment s'associa al desenvolupament de complicacions micro i macrovasculars (63; 116). En el nostre estudi hem objectivat també que les persones amb DM1 presentaven unes concentracions sèriques superiors d'ICAM-1 i E-Selectina en comparació amb el grup control. Per contra, no vam objectivar cap associació entre els diferents paràmetres de disfunció endotelial avaluats i la presència de complicacions

microangiopàtiques. No obstant, tal i com s'ha esmentat en apartats anteriors, avaluar aquesta possible associació no era l'objectiu del nostre treball i per tant no estava dissenyat per això. Probablement, el nombre d'individus amb complicacions és massa reduït per trobar cap associació, fet que justificaria aquesta manca d'associació.

Tal i com hem esmentat anteriorment, els possibles mecanismes de l'increment de RA en la DM1 probablement reflecteixen una complexa interacció entre canvis estructurals i funcionals de la paret arterial (140). La disfunció endotelial es caracteritza per una disminució de la biodisponibilitat de vasodilatadors com l'ON i un increment de la producció de vasoconstrictors com la ET-1 (95), que conduirien a una rigidesa funcional de la paret arterial. La relació entre la disfunció endotelial i la RA no està ben establerta. Alguns estudis han demostrat una clara associació entre ambdues, tant en població sana com en persones amb malaltia cardiovascular prèvia (238-242). No obstant, altres estudis no han objectivat cap associació entre les dues, especialment en aquelles situacions en què ja existeix un procés d'aterosclerosi més avançat (274; 275). Els estudis en DM1 que han avaluat la relació entre la disfunció endotelial i la RA són escassos. Per ara només coneixem un estudi que ha objectivat una associació positiva entre la VOPa i les concentracions sèriques d'ICAM-1 (243), però dos estudis més han avaluat la vasodilatació depenent d'endoteli mitjançant la *FMD* no han objectivat cap associació entre els dos paràmetres (244; 245). Cal remarcar però que cap d'aquests dos últims estudis va avaluar la RA mitjançant la VOPa, sinó que van utilitzar mesures de RA sistèmica en el primer cas (244) i l'IA en el segon cas (245). L'índex RH-PAT és una mesura dinàmica, que reflexa fluctuacions agudes (més que cròniques) de la funció endotelial, mentre que la VOPa reflexa els efectes dels factors de risc cardiovascular sobre la paret arterial durant un període de temps molt més llarg. A més a més, cal tenir en compte que els individus del nostre estudi eren més joves en comparació amb els inclosos en els estudis que han trobat una associació entre disfunció endotelial i RA. Aquests fets podrien justificar la manca d'associació que hem observat en el nostre estudi.

Limitacions

Cal tenir present que el nostre treball no està exempt de limitacions. La seva limitació principal és el seu disseny transversal, ja que no ens permet establir relacions

de causalitat. A més a més, al tractar-se d'un estudi observacional, tampoc no ens permet assegurar el control de tots els possibles factors de confusió existents i que ens siguin desconeguts. Per altra banda, tant els marcadors d'ISBG com els de disfunció endotelial es van mesurar una sola vegada, fet que podria haver infraestimat l'associació entre ells i l'increment de la RA, tot i que aquest fet ja es va intentar pal·liar mitjançant el càlcul dels respectius *scores* (tal i com s'ha explicat al corresponent apartat de mètodes). Addicionalment, cal tenir present que només es va mesurar una selecció dels potencials marcadors que podien haver-se avaluat, especialment en referència als de disfunció endotelial; per tant, els nostres resultats no es poden extrapolar a la resta de marcadors. Pel que fa a la mesura de la disfunció endotelial, hagués estat de gran interès poder utilitzar la mesura del diàmetre de l'artèria braquial. Tot i que l'índex RH-PAT s'ha associat a mesures de funció endotelial tant a nivell braquial com coronari (100; 101), la *FMD* continua sent la tècnica més validada i de la que disposa de més experiència pel que fa a dades prospectives i al seu valor pronòstic. No obstant, aquesta tècnica no estava disponible en el centre on es van portar a terme les avaluacions.

Interès científic i noves perspectives del present treball

Segons les dades obtingudes, hem objectivat que les persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia ja presenten un increment de la RA respecte a la població control i que la ISBG pot estar associada a aquest increment. Per tant, creiem que aquest projecte obre les següents noves perspectives:

- creiem que la determinació de la VOPa (prova econòmica i no invasiva) podria millorar l'estratificació del risc cardiovascular dels malalts amb DM1. Això permetria la intensificació terapèutica d'aquells amb un risc cardiovascular més elevat.
- creiem que obre noves perspectives en l'estudi de la fisiopatologia de la RA en la DM1 que ens podrien permetre avançar en la seva prevenció i tractament, actuant principalment sobre la ISBG.
- creiem que el següent pas seria estudiar si un increment de la RA s'associa també a una afectació preclínica de la circulació coronària; és a dir, amb una afectació coronària significativa abans del primer episodi coronari. Aquest aspecte podria ser

9. Discussió

decisiu per prevenir millor el risc d'episodis cardiovasculars en aquestes persones, especialment pel que fa a l'associació de la DM amb la isquèmia miocardíaca silent.

- per últim, creiem que planteja la necessitat de realitzar estudis prospectius per tal d'establir el valor de la VOPa com a predictor independent d'episodis cardiovasculars a la DM1.

10. Conclusions

10. Conclusions

1. Les persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia presenten un increment de la VOPa en comparació amb els subjectes controls sans, emparellats per edat i sexe, i aquest augment és independent de la resta de factors de risc cardiovascular clàssics.
2. Els homes amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia presenten una major ISBG en comparació amb els homes controls sans, emparellats per edat. Aquest augment està associat independentment amb l'increment de la VOPa. Aquestes troballes no s'han pogut confirmar en el sexe femení.
3. Les persones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia presenten una disminució de les concentracions sèriques de sTWEAK en comparació amb els subjectes controls sans, emparellats per edat i sexe. No obstant, la disminució de les concentracions sèriques de sTWEAK no s'associa amb l'increment de la VOPa en aquesta població.
4. Els homes amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia presenten un augment de les concentracions sèriques de sCD163 en comparació amb els homes controls sans, emparellats per edat. Aquestes troballes no s'han pogut confirmar per al sexe femení. Les concentracions sèriques de sCD163 no s'associen amb l'increment de la VOPa en aquesta població.
5. Les dones amb DM1 sense malaltia cardiovascular prèvia presenten més disfunció endotelial en comparació amb les dones controls sanes, emparellades per edat. No obstant, la disfunció endotelial no s'associa amb l'increment de la VOPa en aquesta població (homes i dones).

A la llum d'aquestes conclusions creiem que la determinació de la VOPa podria ser d'utilitat en la predicció individual d'episodis cardiovasculars en la DM1 i que podria permetre una millor intensificació terapèutica d'aquells amb un risc cardiovascular més elevat tot i que tot això s'ha de confirmar amb la realització d'estudis prospectius.

11. Bibliografia

11. Bibliografia

1. Vehik K, Dabelea D. The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof? *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27:3-13.
2. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet* 2006;367:847-858.
3. Orchard TJ, Costacou T. When are type 1 diabetic patients at risk for cardiovascular disease? *Curr Diab Rep* 10:48-54.
4. Krolewski AS, Kosinski EJ, Warram JH, et al. Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 1987;59:750-755.
5. Orchard TJ, Olson JC, Erbey JR, et al. Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2003;26:1374-1379.
6. Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Toeller M, et al. Risk factors for coronary heart disease in type 1 diabetic patients in Europe: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care* 2004;27:530-537.
7. Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, Orchard TJ. The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. *Diabetes* 2006;55:1463-1469.
8. Soedamah-Muthu SS, Fuller JH, Mulnier HE, Raleigh VS, Lawrenson RA, Colhoun HM. High risk of cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes in the U.K.: a cohort study using the general practice research database. *Diabetes Care* 2006;29:798-804.
9. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia* 2003;46:760-765.
10. Libby P, Nathan DM, Abraham K, et al. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on Cardiovascular Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation* 2005;111:3489-3493.
11. Soedamah-Muthu SS, Fuller JH, Mulnier HE, Raleigh VS, Lawrenson RA, Colhoun HM. All-cause mortality rates in patients with type 1 diabetes mellitus compared with a non-diabetic population from the UK general practice research database, 1992-1999. *Diabetologia* 2006;49:660-666.
12. Colhoun H. Coronary heart disease in women: why the disproportionate risk? *Curr Diab Rep* 2006;6:22-28.
13. Dahl-Jorgensen K, Larsen JR, Hanssen KF. Atherosclerosis in childhood and adolescent type 1 diabetes: early disease, early treatment? *Diabetologia* 2005;48:1445-1453.
14. Jarvisalo MJ, Jartti L, Nanto-Salonen K, et al. Increased aortic intima-media thickness: a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation* 2001;104:2943-2947.
15. Jarvisalo MJ, Putto-Laurila A, Jartti L, et al. Carotid artery intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;51:493-498.

11. Bibliografia

16. Retnakaran R, Zinman B. Type 1 diabetes, hyperglycaemia, and the heart. *Lancet* 2008;371:1790-1799.
17. Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Poor glycemic control predicts coronary heart disease events in patients with type 1 diabetes without nephropathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1014-1019.
18. Zgibor JC, Piatt GA, Ruppert K, Orchard TJ, Roberts MS. Deficiencies of cardiovascular risk prediction models for type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:1860-1865.
19. Ruppert K, Roberts MS, Orchard TJ, Zgibor JC. Cardiovascular disease risk prediction in type 1 diabetes: accounting for the differences. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;78:234-237.
20. Ryden L, Standl E, Bartnik M, et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2007;28:88-136.
21. Toeller M, Buyken AE, Heitkamp G, de Pergola G, Giorgino F, Fuller JH. Fiber intake, serum cholesterol levels, and cardiovascular disease in European individuals with type 1 diabetes. EURODIAB IDDM Complications Study Group. *Diabetes Care* 1999;22 Suppl 2:B21-28.
22. Schoenaker DA, Toeller M, Chaturvedi N, Fuller JH, Soedamah-Muthu SS. Dietary saturated fat and fibre and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality among type 1 diabetic patients: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2012;55:2132-2141.
23. Herbst A, Kordonouri O, Schwab KO, Schmidt F, Holl RW. Impact of physical activity on cardiovascular risk factors in children with type 1 diabetes: a multicenter study of 23,251 patients. *Diabetes Care* 2007;30:2098-2100.
24. Salem MA, Aboelasar MA, Elbarbary NS, Elhilaly RA, Refaat YM. Is exercise a therapeutic tool for improvement of cardiovascular risk factors in adolescents with type 1 diabetes mellitus? A randomised controlled trial. *Diabetol Metab Syndr* 2010;2:47.
25. Tielemans SM, Soedamah-Muthu SS, De Neve M, et al. Association of physical activity with all-cause mortality and incident and prevalent cardiovascular disease among patients with type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2013;56:82-91.
26. Waden J, Forsblom C, Thorn LM, et al. Physical activity and diabetes complications in patients with type 1 diabetes: the Finnish Diabetic Nephropathy (FinnDiane) Study. *Diabetes Care* 2008;31:230-232.
27. Bishop FK, Maahs DM, Snell-Bergeon JK, Ogden LG, Kinney GL, Rewers M. Lifestyle risk factors for atherosclerosis in adults with type 1 diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 2009;6:269-275.
28. Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Witte DR, Stevens LK, Porta M, Fuller JH. Relationship between risk factors and mortality in type 1 diabetic patients in Europe: the EURODIAB Prospective Complications Study (PCS). *Diabetes Care* 2008;31:1360-1366.
29. Rodrigues TC, Veyna AM, Haarhues MD, Kinney GL, Rewers M, Snell-Bergeon JK. Obesity and coronary artery calcium in diabetes: the Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) study. *Diabetes Technol Ther* 2011;13:991-996.

30. Thorn LM, Forsblom C, Fagerudd J, et al. Metabolic syndrome in type 1 diabetes: association with diabetic nephropathy and glycemic control (the FinnDiane study). *Diabetes Care* 2005;28:2019-2024.
31. Pambianco G, Costacou T, Orchard TJ. The prediction of major outcomes of type 1 diabetes: a 12-year prospective evaluation of three separate definitions of the metabolic syndrome and their components and estimated glucose disposal rate: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. *Diabetes Care* 2007;30:1248-1254.
32. McGill M, Molyneaux L, Twigg SM, Yue DK. The metabolic syndrome in type 1 diabetes: does it exist and does it matter? *J Diabetes Complications* 2008;22:18-23.
33. Mayer-Davis EJ, Ma B, Lawson A, et al. Cardiovascular disease risk factors in youth with type 1 and type 2 diabetes: implications of a factor analysis of clustering. *Metab Syndr Relat Disord* 2009;7:89-95.
34. Thorn LM, Forsblom C, Waden J, et al. Metabolic syndrome as a risk factor for cardiovascular disease, mortality, and progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:950-952.
35. Purnell JQ, Hokanson JE, Marcovina SM, Steffes MW, Cleary PA, Brunzell JD. Effect of excessive weight gain with intensive therapy of type 1 diabetes on lipid levels and blood pressure: results from the DCCT. *Diabetes Control and Complications Trial. JAMA* 1998;280:140-146.
36. Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: "double diabetes" in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 2007;30:707-712.
37. National High Blood Pressure Education Program Working Group report on hypertension in diabetes. *Hypertension* 1994;23:145-158; discussion 159-160.
38. Collado-Mesa F, Colhoun HM, Stevens LK, et al. Prevalence and management of hypertension in type 1 diabetes mellitus in Europe: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabet Med* 1999;16:41-48.
39. Rossing P, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Predictors of mortality in insulin dependent diabetes: 10 year observational follow up study. *BMJ* 1996;313:779-784.
40. Orchard TJ, Forrest KY, Kuller LH, Becker DJ. Lipid and blood pressure treatment goals for type 1 diabetes: 10-year incidence data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2001;24:1053-1059.
41. Jenkins AJ, Lyons TJ, Zheng D, et al. Serum lipoproteins in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes intervention and complications cohort: associations with gender and glycemia. *Diabetes Care* 2003;26:810-818.
42. Groop PH, Thomas MC, Rosengard-Barlund M, et al. HDL composition predicts new-onset cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:2706-2707.
43. Guy J, Ogden L, Wadwa RP, et al. Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. *Diabetes Care* 2009;32:416-420.

11. Bibliografia

44. 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;329:977-986.
45. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005;353:2643-2653.
46. Nathan DM, Zinman B, Cleary PA, et al. Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2005). *Arch Intern Med* 2009;169:1307-1316.
47. Stettler C, Allemann S, Juni P, et al. Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: Meta-analysis of randomized trials. *Am Heart J* 2006;152:27-38.
48. Shankar A, Klein R, Klein BE, Moss SE. Association between glycosylated hemoglobin level and cardiovascular and all-cause mortality in type 1 diabetes. *Am J Epidemiol* 2007;166:393-402.
49. Prince CT, Becker DJ, Costacou T, Miller RG, Orchard TJ. Changes in glycaemic control and risk of coronary artery disease in type 1 diabetes mellitus: findings from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study (EDC). *Diabetologia* 2007;50:2280-2288.
50. Snell-Bergeon JK, Wadwa RP. Hypoglycemia, diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes Technol Ther* 2012;14 Suppl 1:S51-58.
51. Rana O, Byrne CD, Kerr D, et al. Acute hypoglycemia decreases myocardial blood flow reserve in patients with type 1 diabetes mellitus and in healthy humans. *Circulation* 2011;124:1548-1556.
52. Gill GV, Woodward A, Casson IF, Weston PJ. Cardiac arrhythmia and nocturnal hypoglycaemia in type 1 diabetes--the 'dead in bed' syndrome revisited. *Diabetologia* 2009;52:42-45.
53. Gruden G, Giunti S, Barutta F, et al. QTc interval prolongation is independently associated with severe hypoglycemic attacks in type 1 diabetes from the EURODIAB IDDM complications study. *Diabetes Care* 2012;35:125-127.
54. Koivikko ML, Karsikas M, Salmela PI, et al. Effects of controlled hypoglycaemia on cardiac repolarisation in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2008;51:426-435.
55. Gimenez M, Gilabert R, Monteagudo J, et al. Repeated episodes of hypoglycemia as a potential aggravating factor for preclinical atherosclerosis in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2011;34:198-203.
56. Gruden G, Barutta F, Chaturvedi N, et al. Severe hypoglycemia and cardiovascular disease incidence in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care* 2012;35:1598-1604.
57. Groop PH, Thomas MC, Moran JL, et al. The presence and severity of chronic kidney disease predicts all-cause mortality in type 1 diabetes. *Diabetes* 2009;58:1651-1658.

58. Kramer CK, Rodrigues TC, Canani LH, Gross JL, Azevedo MJ. Diabetic retinopathy predicts all-cause mortality and cardiovascular events in both type 1 and 2 diabetes: meta-analysis of observational studies. *Diabetes Care* 2011;34:1238-1244.
59. Lykke JA, Tarnow L, Parving HH, Hilsted J. A combined abnormality in heart rate variation and QT corrected interval is a strong predictor of cardiovascular death in type 1 diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68:654-659.
60. Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;169:203-214.
61. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Fuller JH, Stehouwer CD. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes--the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2005;48:370-378.
62. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk C, et al. Vascular risk factors and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care* 2003;26:2165-2173.
63. Astrup AS, Tarnow L, Pietraszek L, et al. Markers of endothelial dysfunction and inflammation in type 1 diabetic patients with or without diabetic nephropathy followed for 10 years: association with mortality and decline of glomerular filtration rate. *Diabetes Care* 2008;31:1170-1176.
64. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3171-3182.
65. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews* 2013;93:137-188.
66. Schultz DR, Arnold PI. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum* 1990;20:129-147.
67. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 2001;103:1813-1818.
68. Buckley DI, Fu R, Freeman M, Rogers K, Helfand M. C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: a systematic review and meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2009;151:483-495.
69. Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 2010;375:132-140.
70. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-1695.
71. Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:447-452.

11. Bibliografia

72. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:212-217.
73. Diez-Ruiz A, Tilz GP, Zangerle R, Baier-Bitterlich G, Wachter H, Fuchs D. Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. *Eur J Haematol* 1995;54:1-8.
74. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767-1772.
75. Tuomisto K, Jousilahti P, Sundvall J, Pajunen P, Salomaa V. C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha as predictors of incident coronary and cardiovascular events and total mortality. A population-based, prospective study. *Thromb Haemost* 2006;95:511-518.
76. Danesh J, Whincup P, Walker M, et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 2000;321:199-204.
77. Wiley SR, Winkles JA. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:241-249.
78. Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, Munoz-Garcia B, et al. Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:916-922.
79. Jelic-Ivanovic Z, Bujisic N, Spasic S, Bogavac-Stanojevic N, Spasojevic-Kalimanovska V, Kotur-Stevuljjevic J. Circulating sTWEAK improves the prediction of coronary artery disease. *Clinical Biochem* 2009;42:1381-1386.
80. Moreno JA, Dejouvencel T, Labreuche J, et al. Peripheral artery disease is associated with a high CD163/TWEAK plasma ratio. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1253-1262.
81. Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, et al. Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 2008;199:440-444.
82. Richter B, Rychli K, Hohensinner PJ, et al. Differences in the predictive value of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) in advanced ischemic and non-ischemic heart failure. *Atherosclerosis* 2010;213:545-548.
83. Yilmaz MI, Carrero JJ, Martin-Ventura JL, et al. Combined therapy with renin-angiotensin system and calcium channel blockers in type 2 diabetic hypertensive patients with proteinuria: effects on soluble TWEAK, PTX3, and flow-mediated dilation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1174-1181.
84. Urbonaviciene G, Martin-Ventura JL, Lindholt JS, et al. Impact of soluble TWEAK and CD163/TWEAK ratio on long-term cardiovascular mortality in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 2011;219:892-899.
85. Chorianopoulos E, Jarr K, Steen H, Giannitsis E, Frey N, Katus HA. Soluble TWEAK is markedly upregulated in patients with ST-elevation myocardial infarction and related to an adverse short-term outcome. *Atherosclerosis* 2010;211:322-326.

86. Carrero JJ, Ortiz A, Qureshi AR, et al. Additive effects of soluble TWEAK and inflammation on mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:110-118.
87. Bover LC, Cardo-Vila M, Kuniyasu A, et al. A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J Immunol* 2007;178:8183-8194.
88. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001;409:198-201.
89. Moller HJ, Peterslund NA, Graversen JH, Moestrup SK. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood* 2002;99:378-380.
90. Guetta J, Strauss M, Levy NS, Fahoum L, Levy AP. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* 2007;191:48-53.
91. Aristoteli LP, Moller HJ, Bailey B, Moestrup SK, Kritharides L. The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006;184:342-347.
92. Moreno JA, Munoz-Garcia B, Martin-Ventura JL, et al. The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009;207:103-110.
93. Levy AP, Purushothaman KR, Levy NS, et al. Downregulation of the hemoglobin scavenger receptor in individuals with diabetes and the Hp 2-2 genotype: implications for the response to intraplaque hemorrhage and plaque vulnerability. *Circ Res* 2007;101:106-110.
94. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-3561.
95. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:143-159.
96. Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 1998;105:32S-39S.
97. Stehouwer CD, Gall MA, Twisk JW, Knudsen E, Emeis JJ, Parving HH. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes* 2002;51:1157-1165.
98. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285-1295.
99. Korkmaz H, Onalan O. Evaluation of endothelial dysfunction: flow-mediated dilation. *Endothelium* 2008;15:157-163.
100. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr., Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2137-2141.

11. Bibliografia

101. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, et al. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 2003;146:168-174.
102. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117:2467-2474.
103. Kuvin JT, Mammen A, Mooney P, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Assessment of peripheral vascular endothelial function in the ambulatory setting. *Vasc Med* 2007;12:13-16.
104. Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, et al. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* 2010;31:1142-1148.
105. Hashimoto M, Kozaki K, Eto M, et al. Association of coronary risk factors and endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery. *Hypertens Res* 2000;23:233-238.
106. Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005;23:233-246.
107. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 2005;111:363-368.
108. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. *Int J Cardiovasc Imaging* 2010;26:631-640.
109. Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, et al. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000;342:454-460.
110. Johnson HM, Gossett LK, Piper ME, et al. Effects of smoking and smoking cessation on endothelial function: 1-year outcomes from a randomized clinical trial. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1988-1995.
111. Zhang L, Gong D, Li S, Zhou X. Meta-analysis of the effects of statin therapy on endothelial function in patients with diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2012;223:78-85.
112. Shahin Y, Khan JA, Samuel N, Chetter I. Angiotensin converting enzyme inhibitors effect on endothelial dysfunction: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Atherosclerosis* 2011;216:7-16.
113. Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:505-510.
114. Sibal L, Aldibbiat A, Agarwal SC, et al. Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria. *Diabetologia* 2009;52:1464-1473.
115. Costacou T, Lopes-Virella MF, Zgibor JC, et al. Markers of endothelial dysfunction in the prediction of coronary artery disease in type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *J Diabetes Complications* 2005;19:183-193.

116. Lin J, Glynn RJ, Rifai N, et al. Inflammation and progressive nephropathy in type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 2008;31:2338-2343.
117. Cleland SJ, Fisher BM, Colhoun HM, Sattar N, Petrie JR. Insulin resistance in type 1 diabetes: what is 'double diabetes' and what are the risks? *Diabetologia* 2013;56:1462-1470.
118. Williams KV, Erbey JR, Becker D, Arslanian S, Orchard TJ. Can clinical factors estimate insulin resistance in type 1 diabetes? *Diabetes* 2000;49:626-632.
119. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006;27:2588-2605.
120. McEniery CM. Novel therapeutic strategies for reducing arterial stiffness. *Br J Pharmacol* 2006;148:881-883.
121. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Clinical appraisal of arterial stiffness: the Argonauts in front of the Golden Fleece. *Heart* 2006;92:1544-1550.
122. Agabiti-Rosei E, Mancia G, O'Rourke MF, et al. Central blood pressure measurements and antihypertensive therapy: a consensus document. *Hypertension* 2007;50:154-160.
123. Bezie Y, Lamaziere JM, Laurent S, et al. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1027-1034.
124. Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension* 2005;45:1050-1055.
125. Boutouyrie P, Lacolley P, Girerd X, Beck L, Safar M, Laurent S. Sympathetic activation decreases medium-sized arterial compliance in humans. *Am J Physiol* 1994;267:H1368-1376.
126. Giannattasio C, Failla M, Lucchina S, et al. Arterial stiffening influence of sympathetic nerve activity: evidence from hand transplantation in humans. *Hypertension* 2005;45:608-611.
127. Giannattasio C, Failla M, Stella ML, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition and radial artery compliance in patients with congestive heart failure. *Hypertension* 1995;26:491-496.
128. Latham RD, Westerhof N, Sipkema P, Rubal BJ, Reuderink P, Murgu JP. Regional wave travel and reflections along the human aorta: a study with six simultaneous micromanometric pressures. *Circulation* 1985;72:1257-1269.
129. Boutouyrie P, Laurent S, Benetos A, Girerd XJ, Hoeks AP, Safar ME. Opposing effects of ageing on distal and proximal large arteries in hypertensives. *J Hypertens Suppl* 1992;10:S87-91.
130. Benetos A, Laurent S, Hoeks AP, Boutouyrie PH, Safar ME. Arterial alterations with aging and high blood pressure. A noninvasive study of carotid and femoral arteries. *Arterioscler Thromb* 1993;13:90-97.
131. Safar ME, van Bortel LM, Struijker-Boudier HA. Resistance and conduit arteries following converting enzyme inhibition in hypertension. *J Vasc Res* 1997;34:67-81.
132. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation* 2001;104:735-740.

11. Bibliografia

133. Struijker Boudier HA, Cohuet GM, Baumann M, Safar ME. The heart, macrocirculation and microcirculation in hypertension: a unifying hypothesis. *J Hypertens Suppl* 2003;21:S19-23.
134. Learoyd BM, Taylor MG. Alterations with age in the viscoelastic properties of human arterial walls. *Circ Res* 1966;18:278-292.
135. Hamilton PK, Lockhart CJ, Quinn CE, McVeigh GE. Arterial stiffness: clinical relevance, measurement and treatment. *Clin Sci (Lond)* 2007;113:157-170.
136. O'Rourke MF, Nichols WW, Safar ME. Pulse waveform analysis and arterial stiffness: realism can replace evangelism and scepticism. *J Hypertens* 2004;22:1633-1634; author reply 1634.
137. Pessina AC. Target organs of individuals with diabetes caught between arterial stiffness and damage to the microcirculation. *J Hypertens Suppl* 2007;25:S13-18.
138. Cavalcante JL, Lima JA, Redheuil A, Al-Mallah MH. Aortic stiffness: current understanding and future directions. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1511-1522.
139. McEniery CM, Wilkinson IB. Large artery stiffness and inflammation. *J Hum Hypertens* 2005;19:507-509.
140. Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:932-943.
141. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation* 2003;107:139-146.
142. Johnson CP, Baugh R, Wilson CA, Burns J. Age related changes in the tunica media of the vertebral artery: implications for the assessment of vessels injured by trauma. *J Clin Pathol* 2001;54:139-145.
143. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 2003;57:195-202.
144. Galis ZS, Khatra JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251-262.
145. Reiser K, McCormick RJ, Rucker RB. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J* 1992;6:2439-2449.
146. Bizbiz L, Alperovitch A, Robert L. Aging of the vascular wall: serum concentration of elastin peptides and elastase inhibitors in relation to cardiovascular risk factors. The EVA study. *Atherosclerosis* 1997;131:73-78.
147. Floege J, Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19 Suppl 5:V59-66.
148. Bailey AJ. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev* 2001;122:735-755.
149. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2000;275:39027-39031.

150. Konova E, Baydanoff S, Atanasova M, Velkova A. Age-related changes in the glycation of human aortic elastin. *Exp Gerontol* 2004;39:249-254.
151. Rojas A, Romay S, Gonzalez D, Herrera B, Delgado R, Otero K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products. *Circ Res* 2000;86:E50-54.
152. McEniery CM, Qasem A, Schmitt M, Avolio AP, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1975-1981.
153. Wilkinson IB, Qasem A, McEniery CM, Webb DJ, Avolio AP, Cockcroft JR. Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo. *Circulation* 2002;105:213-217.
154. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1141-1146.
155. O'Rourke MF, Staessen JA, Vlachopoulos C, Duprez D, Plante GE. Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values. *Am J Hypertens* 2002;15:426-444.
156. Pannier BM, Avolio AP, Hoeks A, Mancia G, Takazawa K. Methods and devices for measuring arterial compliance in humans. *Am J Hypertens* 2002;15:743-753.
157. Van Bortel LM, Duprez D, Starmans-Kool MJ, et al. Clinical applications of arterial stiffness, Task Force III: recommendations for user procedures. *Am J Hypertens* 2002;15:445-452.
158. Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, et al. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens* 2012;30:445-448.
159. Paini A, Boutouyrie P, Calvet D, Tropeano AI, Laloux B, Laurent S. Carotid and aortic stiffness: determinants of discrepancies. *Hypertension* 2006;47:371-376.
160. Isnard RN, Pannier BM, Laurent S, London GM, Diebold B, Safar ME. Pulsatile diameter and elastic modulus of the aortic arch in essential hypertension: a noninvasive study. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:399-405.
161. Laurent S, Hayoz D, Trazzi S, et al. Isobaric compliance of the radial artery is increased in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1993;11:89-98.
162. Laurent S, Caviezel B, Beck L, et al. Carotid artery distensibility and distending pressure in hypertensive humans. *Hypertension* 1994;23:878-883.
163. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, O'Rourke MF, Safar ME, Baou K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with central haemodynamics: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J* 2010;31:1865-1871.
164. Lehmann ED, Parker JR, Hopkins KD, Taylor MG, Gosling RG. Validation and reproducibility of pressure-corrected aortic distensibility measurements using pulse-wave-velocity Doppler ultrasound. *J Biomed Eng* 1993;15:221-228.
165. Asmar R, Benetos A, Topouchian J, et al. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension* 1995;26:485-490.

11. Bibliografia

166. Asmar RG, Topouchian JA, Benetos A, Sayegh FA, Mourad JJ, Safar ME. Non-invasive evaluation of arterial abnormalities in hypertensive patients. *J Hypertens Suppl* 1997;15:S99-107.
167. Dart AM, Gatzka CD, Kingwell BA, et al. Brachial blood pressure but not carotid arterial waveforms predict cardiovascular events in elderly female hypertensives. *Hypertension* 2006;47:785-790.
168. Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, et al. Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2010;121:505-511.
169. Chiu YC, Arand PW, Shroff SG, Feldman T, Carroll JD. Determination of pulse wave velocities with computerized algorithms. *Am Heart J* 1991;121:1460-1470.
170. Huybrechts SA, Devos DG, Vermeersch SJ, et al. Carotid to femoral pulse wave velocity: a comparison of real travelled aortic path lengths determined by MRI and superficial measurements. *J Hypertens* 2011;29:1577-1582.
171. DeLoach SS, Townsend RR. Vascular stiffness: its measurement and significance for epidemiologic and outcome studies. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:184-192.
172. Jiang B, Liu B, McNeill KL, Chowienczyk PJ. Measurement of pulse wave velocity using pulse wave Doppler ultrasound: comparison with arterial tonometry. *Ultrasound Med Biol* 2008;34:509-512.
173. Mackenzie IS, Wilkinson IB, Cockcroft JR. Assessment of arterial stiffness in clinical practice. *QJM* 2002;95:67-74.
174. Lemogoum D, Flores G, Van den Abeele W, et al. Validity of pulse pressure and augmentation index as surrogate measures of arterial stiffness during beta-adrenergic stimulation. *J Hypertens* 2004;22:511-517.
175. Verbeke F, Segers P, Heireman S, Vanholder R, Verdonck P, Van Bortel LM. Noninvasive assessment of local pulse pressure: importance of brachial-to-radial pressure amplification. *Hypertension* 2005;46:244-248.
176. Van Bortel LM, Struijker-Boudier HA, Safar ME. Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. *Hypertension* 2001;38:914-921.
177. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1318-1327.
178. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2007;28:1462-1536.
179. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J* 2010;31:2338-2350.
180. Roman MJ, Devereux RB, Schwartz JE, et al. Arterial stiffness in chronic inflammatory diseases. *Hypertension* 2005;46:194-199.

181. Safar ME. Arterial aging--hemodynamic changes and therapeutic options. *Nat Rev Cardiol* 2010;7:442-449.
182. Laurent S, Briet M, Boutouyrie P. Arterial stiffness as surrogate end point: needed clinical trials. *Hypertension* 2012;60:518-522.
183. Shokawa T, Imazu M, Yamamoto H, et al. Pulse wave velocity predicts cardiovascular mortality: findings from the Hawaii-Los Angeles-Hiroshima study. *Circ J* 2005;69:259-264.
184. Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Hofman A, et al. Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* 2006;113:657-663.
185. Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, et al. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation* 2006;113:664-670.
186. Anderson SG, Sanders TA, Cruickshank JK. Plasma fatty acid composition as a predictor of arterial stiffness and mortality. *Hypertension* 2009;53:839-845.
187. Wang KL, Cheng HM, Sung SH, et al. Wave reflection and arterial stiffness in the prediction of 15-year all-cause and cardiovascular mortalities: a community-based study. *Hypertension* 55:799-805.
188. Meaume S, Benetos A, Henry OF, Rudnichi A, Safar ME. Aortic pulse wave velocity predicts cardiovascular mortality in subjects >70 years of age. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:2046-2050.
189. Sutton-Tyrrell K, Najjar SS, Boudreau RM, et al. Elevated aortic pulse wave velocity, a marker of arterial stiffness, predicts cardiovascular events in well-functioning older adults. *Circulation* 2005;111:3384-3390.
190. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 2001;37:1236-1241.
191. Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension* 2002;39:10-15.
192. Laurent S, Katsahian S, Fassot C, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke* 2003;34:1203-1206.
193. Terai M, Ohishi M, Ito N, et al. Comparison of arterial functional evaluations as a predictor of cardiovascular events in hypertensive patients: the Non-Invasive Atherosclerotic Evaluation in Hypertension (NOAH) study. *Hypertens Res* 2008;31:1135-1145.
194. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation* 1999;99:2434-2439.
195. Shoji T, Emoto M, Shinohara K, et al. Diabetes mellitus, aortic stiffness, and cardiovascular mortality in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2117-2124.
196. Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Stiffness of capacitive and conduit arteries: prognostic significance for end-stage renal disease patients. *Hypertension* 2005;45:592-596.

11. Bibliografia

197. Cruickshank K, Riste L, Anderson SG, Wright JS, Dunn G, Gosling RG. Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function? *Circulation* 2002;106:2085-2090.
198. Sehestedt T, Jeppesen J, Hansen TW, et al. Risk stratification with the risk chart from the European Society of Hypertension compared with SCORE in the general population. *J Hypertens* 2009;27:2351-2357.
199. Guerin AP, Blacher J, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness attenuation on survival of patients in end-stage renal failure. *Circulation* 2001;103:987-992.
200. Heilman K, Zilmer M, Zilmer K, et al. Arterial stiffness, carotid artery intima-media thickness and plasma myeloperoxidase level in children with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;84:168-173.
201. Urbina EM, Wadwa RP, Davis C, et al. Prevalence of increased arterial stiffness in children with type 1 diabetes mellitus differs by measurement site and sex: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *J Pediatr* 2010;156:731-737, 737 e731.
202. Palombo C, Kozakova M, Morizzo C, et al. Circulating endothelial progenitor cells and large artery structure and function in young subjects with uncomplicated type 1 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2011;10:88.
203. Lacy PS, O'Brien DG, Stanley AG, Dewar MM, Swales PP, Williams B. Increased pulse wave velocity is not associated with elevated augmentation index in patients with diabetes. *J Hypertens* 2004;22:1937-1944.
204. Manolis AJ, Iraklianos S, Pittaras A, et al. Arterial compliance changes in diabetic normotensive patients after angiotensin-converting enzyme inhibition therapy. *Am J Hypertens* 2005;18:18-22.
205. Sweitzer NK, Shenoy M, Stein JH, et al. Increases in central aortic impedance precede alterations in arterial stiffness measures in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:2886-2891.
206. Gordin D, Ronnback M, Forsblom C, Heikkila O, Saraheimo M, Groop PH. Acute hyperglycaemia rapidly increases arterial stiffness in young patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2007;50:1808-1814.
207. Anderson JM, Savvidou MD, Kaihura C, McEniery CM, Nicolaidis KH. Maternal arterial stiffness in pregnancies affected by Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2009;26:1135-1140.
208. Vastagh I, Horvath T, Nagy G, et al. Evolution and predictors of morphological and functional arterial changes in the course of type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2010;26:646-655.
209. Theilade S, Lajer M, Persson F, Joergensen C, Rossing P. Arterial stiffness is associated with cardiovascular, renal, retinal, and autonomic disease in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2013;36:715-721.
210. Westerbacka J, Uosukainen A, Makimattila S, Schlenzka A, Yki-Jarvinen H. Insulin-induced decrease in large artery stiffness is impaired in uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Hypertension* 2000;35:1043-1048.

211. Wilhelm B, Weber MM, Kreisselmeier HP, et al. Endothelial function and arterial stiffness in uncomplicated type 1 diabetes and healthy controls and the impact of insulin on these parameters during an euglycemic clamp. *J Diabetes Sci Technol* 2007;1:582-589.
212. Sommerfield AJ, Wilkinson IB, Webb DJ, Frier BM. Vessel wall stiffness in type 1 diabetes and the central hemodynamic effects of acute hypoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E1274-1279.
213. Gordin D, Ronnback M, Forsblom C, Makinen V, Saraheimo M, Groop PH. Glucose variability, blood pressure and arterial stiffness in type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;80:e4-7.
214. van Ittersum FJ, Schram MT, van der Heijden-Spek JJ, et al. Autonomic nervous function, arterial stiffness and blood pressure in patients with Type I diabetes mellitus and normal urinary albumin excretion. *J Hum Hypertens* 2004;18:761-768.
215. Jaiswal M, Urbina EM, Wadwa RP, et al. Reduced Heart Rate Variability Is Associated With Increased Arterial Stiffness in Youth With Type 1 Diabetes: The SEARCH Cardiovascular Disease Study. *Diabetes Care* 2013; Feb 22.
216. Schram MT, Chaturvedi N, Fuller JH, Stehouwer CD. Pulse pressure is associated with age and cardiovascular disease in type 1 diabetes: the Eurodiab Prospective Complications Study. *J Hypertens* 2003;21:2035-2044.
217. Gordin D, Waden J, Forsblom C, et al. Pulse pressure predicts incident cardiovascular disease but not diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes (The FinnDiane Study). *Diabetes Care* 2011;34:886-891.
218. Theilade S, Lajer M, Jorsal A, Tarnow L, Parving HH, Rossing P. Arterial stiffness and endothelial dysfunction independently and synergistically predict cardiovascular and renal outcome in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med* 2012;29:990-994.
219. Kampus P, Kals J, Ristimae T, Fischer K, Zilmer M, Teesalu R. High-sensitivity C-reactive protein affects central haemodynamics and augmentation index in apparently healthy persons. *J Hypertens* 2004;22:1133-1139.
220. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Mackenzie IS, Cockcroft JR, Wilkinson IB. C-reactive protein is associated with arterial stiffness in apparently healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:969-974.
221. Kullo IJ, Seward JB, Bailey KR, et al. C-reactive protein is related to arterial wave reflection and stiffness in asymptomatic subjects from the community. *Am J Hypertens* 2005;18:1123-1129.
222. Nagano M, Nakamura M, Sato K, Tanaka F, Segawa T, Hiramori K. Association between serum C-reactive protein levels and pulse wave velocity: a population-based cross-sectional study in a general population. *Atherosclerosis* 2005;180:189-195.
223. Kampus P, Kals J, Ristimae T, et al. Augmentation index and carotid intima-media thickness are differently related to age, C-reactive protein and oxidized low-density lipoprotein. *J Hypertens* 2007;25:819-825.

11. Bibliografia

224. Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, van der Meer IM, et al. C-reactive protein and arterial stiffness in older adults: the Rotterdam Study. *Atherosclerosis* 2004;176:111-116.
225. Nakhai-Pour HR, Grobbee DE, Bots ML, Muller M, van der Schouw YT. C-reactive protein and aortic stiffness and wave reflection in middle-aged and elderly men from the community. *J Hum Hypertens* 2007;21:949-955.
226. Mahmud A, Feely J. Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension. *Hypertension* 2005;46:1118-1122.
227. Kampus P, Muda P, Kals J, et al. The relationship between inflammation and arterial stiffness in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol* 2006;112:46-51.
228. Pietri P, Vyssoulis G, Vlachopoulos C, et al. Relationship between low-grade inflammation and arterial stiffness in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2006;24:2231-2238.
229. Tsioufis C, Dimitriadis K, Selima M, et al. Low-grade inflammation and hypoadiponectinaemia have an additive detrimental effect on aortic stiffness in essential hypertensive patients. *Eur Heart J* 2007;28:1162-1169.
230. Pirro M, Schillaci G, Savarese G, et al. Low-grade systemic inflammation impairs arterial stiffness in newly diagnosed hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 2004;34:335-341.
231. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, Adda H, Pannier B. Inflammation, arteriosclerosis, and cardiovascular therapy in hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl* 2003:S88-93.
232. Kim SM, Lee J, Ryu OH, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with inflammation and pulse wave velocity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:594-598.
233. Gonzalez-Clemente JM, Mauricio D, Richart C, et al. Diabetic neuropathy is associated with activation of the TNF-alpha system in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:525-529.
234. Gustavsson C, Agardh E, Bengtsson B, Agardh CD. TNF-alpha is an independent serum marker for proliferative retinopathy in type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2008;22:309-316.
235. Lopes-Virella MF, Carter RE, Gilbert GE, et al. Risk factors related to inflammation and endothelial dysfunction in the DCCT/EDIC cohort and their relationship with nephropathy and macrovascular complications. *Diabetes Care* 2008;31:2006-2012.
236. Marcovecchio ML, Giannini C, Widmer B, et al. C-reactive protein in relation to the development of microalbuminuria in type 1 diabetes: the Oxford Regional Prospective Study. *Diabetes Care* 2008;31:974-976.
237. Gonzalez-Clemente JM, Gimenez-Perez G, Richart C, et al. The tumour necrosis factor (TNF)-alpha system is activated in accordance with pulse pressure in normotensive subjects with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2005;153:687-691.
238. McEniery CM, Wallace S, Mackenzie IS, et al. Endothelial function is associated with pulse pressure, pulse wave velocity, and augmentation index in healthy humans. *Hypertension* 2006;48:602-608.

239. Malik AR, Kondragunta V, Kullo IJ. Forearm vascular reactivity and arterial stiffness in asymptomatic adults from the community. *Hypertension* 2008;51:1512-1518.
240. Jadhav UM, Kadam NN. Non-invasive assessment of arterial stiffness by pulse-wave velocity correlates with endothelial dysfunction. *Indian Heart J* 2005;57:226-232.
241. Wallace SM, Yasmin, McEniery CM, et al. Isolated systolic hypertension is characterized by increased aortic stiffness and endothelial dysfunction. *Hypertension* 2007;50:228-233.
242. McCall DO, McGartland CP, Woodside JV, Sharpe P, McCance DR, Young IS. The relationship between microvascular endothelial function and carotid-radial pulse wave velocity in patients with mild hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2010;32:474-479.
243. Stadler M, Theuer E, Anderwald C, et al. Persistent arterial stiffness and endothelial dysfunction following successful pancreas-kidney transplantation in Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2009;26:1010-1018.
244. Berry KL, Skyrme-Jones RA, Cameron JD, O'Brien RC, Meredith IT. Systemic arterial compliance is reduced in young patients with IDDM. *Am J Physiol* 1999;276:H1839-1845.
245. Tryfonopoulos D, Anastasiou E, Protogerou A, et al. Arterial stiffness in type 1 diabetes mellitus is aggravated by autoimmune thyroid disease. *J Endocrinol Invest* 2005;28:616-622.
246. Hallal PC, Victora CG. Reliability and validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ). *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:556.
247. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care* 34 Suppl 1:S11-61.
248. Gonzalez-Clemente JM, Vilardell C, Broch M, et al. Lower heart rate variability is associated with higher plasma concentrations of IL-6 in type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2007;157:31-38.
249. Llauro G, Gallart L, Tirado R, et al. Insulin resistance, low-grade inflammation and type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2012;49:33-39.
250. Jenkins AJ, Rothen M, Klein RL, et al. Cross-sectional associations of C-reactive protein with vascular risk factors and vascular complications in the DCCT/EDIC cohort. *J Diabetes Complications* 2008;22:153-163.
251. Kilpatrick ES, Keevil BG, Jagger C, Spooner RJ, Small M. Determinants of raised C-reactive protein concentration in type 1 diabetes. *QJM* 2000;93:231-236.
252. Mackness B, Hine D, McElduff P, Mackness M. High C-reactive protein and low paraoxonase1 in diabetes as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2006;186:396-401.
253. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 1997;349:462-466.
254. Lanza GA, Pitocco D, Navarese EP, et al. Association between cardiac autonomic dysfunction and inflammation in type 1 diabetic patients: effect of beta-blockade. *Eur Heart J* 2007;28:814-820.

11. Bibliografia

255. Nowak M, Wielkoszynski T, Marek B, et al. Antioxidant potential, paraoxonase 1, ceruloplasmin activity and C-reactive protein concentration in diabetic retinopathy. *Clin Exp Med* 2010;10:185-192.
256. Lilitkarntakul P, Dhaun N, Melville V, et al. Blood pressure and not uraemia is the major determinant of arterial stiffness and endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease and minimal co-morbidity. *Atherosclerosis* 2011;216:217-225.
257. Ferreira I, Boreham CA, Twisk JW, et al. Clustering of metabolic syndrome risk factors and arterial stiffness in young adults: the Northern Ireland Young Hearts Project. *J Hypertens* 2007;25:1009-1020.
258. Colhoun HM, Schalkwijk C, Rubens MB, Stehouwer CD. C-reactive protein in type 1 diabetes and its relationship to coronary artery calcification. *Diabetes Care* 2002;25:1813-1817.
259. Axelsson J, Moller HJ, Witasz A, et al. Changes in fat mass correlate with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD. *Am J Kidney Dis* 2006;48:916-925.
260. Lynch CN, Wang YC, Lund JK, Chen YW, Leal JA, Wiley SR. TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem* 1999;274:8455-8459.
261. Munoz-Garcia B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, et al. TWEAK-Fn14 interaction enhances plasminogen activator inhibitor 1 and tissue factor expression in atherosclerotic plaques and in cultured vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2011;89:225-233.
262. Munoz-Garcia B, Martin-Ventura JL, Martinez E, et al. Fn14 is upregulated in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and is expressed in human carotid atherosclerotic plaques: modulation by atorvastatin. *Stroke* 2006;37:2044-2053.
263. Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, Carrero JJ, et al. Vascular proteomics and the discovery process of clinical biomarkers: The case of TWEAK. *Proteomics Clin Appl* 2011;5:281-288.
264. Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, et al. TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell* 2005;123:931-944.
265. Moller HJ, Frikke-Schmidt R, Moestrup SK, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Serum soluble CD163 predicts risk of type 2 diabetes in the general population. *Clin Chem* 2011;57:291-297.
266. Gungor O, Kircelli F, Asci G, et al. Soluble TWEAK level: is it a marker for cardiovascular disease in long-term hemodialysis patients? *J Nephrol* 2013;26:136-143.
267. Koivisto T, Virtanen M, Hutri-Kahonen N, et al. Arterial pulse wave velocity in relation to carotid intima-media thickness, brachial flow-mediated dilation and carotid artery distensibility: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study and the Health 2000 Survey. *Atherosclerosis* 2012;220:387-393.
268. Haller MJ, Stein J, Shuster J, et al. Peripheral artery tonometry demonstrates altered endothelial function in children with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2007;8:193-198.

269. Mahmud FH, Van Uum S, Kanji N, Thiessen-Philbrook H, Clarson CL. Impaired endothelial function in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr* 2008;152:557-562.
270. Pareyn A, Allegaert K, Asscherickx W, Peirsman E, Verhamme P, Casteels K. Impaired endothelial function in female adolescents with type 1 diabetes measured by peripheral artery tonometry. *Eur J Pediatr* 2013; Mar 23.
271. Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 1997;273:L119-126.
272. Steinberg HO, Paradisi G, Cronin J, et al. Type II diabetes abrogates sex differences in endothelial function in premenopausal women. *Circulation* 2000;101:2040-2046.
273. Chan NN, Vallance P, Colhoun HM. Endothelium-dependent and -independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: role of conventional risk factors, sex, and glycemic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1048-1054.
274. Kopec G, Podolec P, Podolec J, Rubis P, Zmudka K, Tracz W. Atherosclerosis progression affects the relationship between endothelial function and aortic stiffness. *Atherosclerosis* 2009;204:250-254.
275. Yokoyama H, Sone H, Saito K, Yamada D, Honjo J, Haneda M. Flow-mediated dilation is associated with microalbuminuria independent of cardiovascular risk factors in type 2 diabetes - interrelations with arterial thickness and stiffness. *J Atheroscler Thromb* 2011;18:744-752.

12. Annexes

12. Annexes

En aquest apartat s'exposen els altres dos articles que, tot i no formar part del cos principal de la tesi, han derivat també d'aquest treball:

- Llauradó G, Simó R, Villaplana M, Berlanga E, Vendrell J, González-Clemente JM. Can augmentation index substitute aortic pulse wave velocity in the assessment of central arterial stiffness in type 1 diabetes? *Acta Diabetol* 2012;49(Suppl 1):S253-7.

- Llauradó G, Ceperuelo-Mallafré V, Vilardell C, Simó R, Gil P, Cano A, Vendrell J, González-Clemente JM. Skin accumulation of advanced glycation end products is associated with arterial stiffness in type 1 diabetes: a case-control study. *En revisió*

12.1. Annex 1: Llauradó G, Simó R, Villaplana M, Berlanga E, Vendrell J, González-Clemente JM. Can augmentation index substitute aortic pulse wave velocity in the assessment of central arterial stiffness in type 1 diabetes? *Acta Diabetol* 2012;49(Suppl 1):S253-7.

Can augmentation index substitute aortic pulse wave velocity in the assessment of central arterial stiffness in type 1 diabetes?

Gemma Llauradó · Rafael Simó ·
Maria Villaplana · Eugenio Berlanga ·
Joan Vendrell · José-Miguel González-Clemente

Received: 6 May 2012 / Accepted: 18 September 2012
© Springer-Verlag Italia 2012

Abstract The aim of this study was to test whether the augmentation index adjusted for heart rate (AIx@HR75) can be used as a substitute for aortic pulse wave velocity (aPWV) in the measurement of arterial stiffness (AS) in type 1 diabetes. Sixty-eight patients with type 1 diabetes and 68 age- and sex-matched controls were evaluated. AS was assessed by aPWV and AIx@HR75 using applanation tonometry. Subjects with type 1 diabetes had higher aPWV compared to controls, but no differences were found between groups regarding AIx@HR75 [men: 10.75 % (2.63–20.75) vs. 8.25 % (4.00–11.38); $p = 0.462$. Women: 20.75 % (5.00–30.16) vs. 14.50 % (11.38–22.16); $p = 0.418$]. In

univariate analyses, aPWV correlated positively with AIx@HR75 in both groups (type 1: $r = 0.340$, $p = 0.005$; healthy subjects: $r = 0.451$, $p < 0.001$). However, AIx@HR75 was not associated with aPWV after adjustment for cardiovascular risk factors in multivariate models (type 1: $p = 0.342$; healthy subjects: $p = 0.976$). Our findings suggest that AIx@HR75 should not be used as a substitute for aPWV for measuring AS in type 1 diabetes.

Keywords Arterial stiffness · Pulse wave velocity · Augmentation index · Type 1 diabetes

Communicated by Antonio Secchi.

G. Llauradó · M. Villaplana · J.-M. González-Clemente (✉)
Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell, Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí (Universitat Autònoma de Barcelona), Parc Taulí s/n., 08208 Sabadell, Spain
e-mail: josmi.gonza@gmail.com

R. Simó
Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) and Diabetes and Metabolism Research Unit, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

E. Berlanga
Biochemistry Department, UDIAT, Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí (Universitat Autònoma de Barcelona), Sabadell, Spain

J. Vendrell
Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, Institut Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

Introduction

Cardiovascular disease is the major cause of morbidity and mortality in type 1 diabetes mellitus [1, 2]. Diabetes results in an accelerated atherosclerotic process, which is not fully explained by classical cardiovascular (CV) risk factors. Type 1 diabetes has been associated with increased arterial stiffness (AS) [3, 4]. AS is an early sign of atherosclerosis [5], and it has been associated with other measures of subclinical atherosclerosis such as intima-media thickness, common carotid artery diameter or coronary artery calcium in type 2 diabetes [6, 7].

Applanation tonometry is a noninvasive and relatively inexpensive technique that can be used in clinical settings to assess central AS [8]. The gold standard for measuring central AS is aortic pulse wave velocity (aPWV). The predictive value of aPWV for CV events has been demonstrated in the general population, in the elderly, in subjects with hypertension, in subjects with end-stage renal failure and in subjects with type 2 diabetes [9]. However, in type 1 diabetes, only central pulse pressure has been associated with the prediction of CV events, but no data on

aPWV have been previously reported [10]. Central pulse wave analysis (PWA) provides additional information concerning wave reflections. The derived PWA parameter used most frequently is the augmentation index (AIx). Its determination is technically less complex than the assessment of aPWV. For this reason, if AIx were a valid substitute for aPWV, it would be easier to assess AS in population studies. In fact, in type 1 diabetes, AIx has been used frequently instead of aPWV for AS evaluation [11, 12]. However, previous studies addressed the relationship between parameters, but the results yielded conflicting results [13–15]. aPWV is a direct measure of AS, while AIx would only be an indirect, surrogate measure of AS. The determinants of the parameters are different: AIx is dependent on pulse wave velocity, the amplitude of wave reflection, the reflectance point and the duration and pattern of ventricular ejection (being much more sensitive to the changes in heart rate), while aPWV represents intrinsically AS. Additionally, the influence of age differs between parameters, and some pathophysiological conditions and drugs may change AIx without altering aPWV [8]. Our main objective was to determine whether AIx could replace aPWV in AS measurement in patients with type 1 diabetes.

Patients and methods

The study population has been previously described elsewhere [4]. Briefly, sixty-eight patients with type 1 diabetes and 68 age- and sex-matched controls were evaluated. None of them had any clinical cardiovascular disease. Subjects with type 1 diabetes were consecutively recruited from our outpatient clinic and had at least 1-year evolution of diabetes. The following information was recorded using a pre-defined standardized form: age, gender, diabetes duration, body mass index (BMI), waist-to-hip ratio, systolic and diastolic blood pressure, mean arterial pressure (MAP), cigarette smoking, physical activity (IPAQ questionnaire [16]), insulin dose and the use of other drug treatment, microvascular complications, fasting plasma glucose, HbA1c and lipid profile. The study protocol was approved by our hospital Ethics Committee and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All subjects gave their informed consent before participating in the study.

aPWV was determined by sequential applanation tonometry at the carotid and femoral arteries gated to a three-lead ECG using the SphygmoCor® (AtCor, Sydney, Australia) and in accordance with the recommendations of the consensus in AS [8]. PWA was used to determine AIx adjusted for heart rate (AIx@HR75). The right radial artery pressure waveform was recorded using the tonometer and calibrated to brachial blood pressure. Waveforms were processed using the same device mentioned above. The

corresponding central aortic pressure waveform was automatically calculated using a transfer function. Measurements not achieving the automatic quality controls specified by the SphygmoCor® software were rejected. The mean of two aPWV and AIx@HR75 determinations (respectively) were taken in each subject for all calculations.

Data are presented as percentages, means (SD) for variables normally distributed or medians (interquartile range) for variables not normally distributed. All data were tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov test. Differences between patients with type 1 diabetes and controls were analyzed using the χ^2 test for comparisons of proportions, and unpaired t-tests or Mann–Whitney U tests for comparisons of quantitative variables as needed. The potential relationship between aPWV and AIx@HR75 was evaluated through univariate, nonparametric correlations and linear regression models to adjust for potential confounders. The IBM SPSS Statistics (v. 19 for Mac; SPSS, Inc, IBM Company) was used for all calculations. All *p* values were two-sided, and a *p* value <0.05 was considered statistically significant.

Results

The baseline characteristics are shown in Tables 1 and 2. Subjects with diabetes had higher aPWV compared to controls, but no differences were found regarding AIx@HR75 [men: 10.75 % (2.63–20.75) vs. 8.25 % (4.00–11.38); *p* = 0.462; women: 20.75 % (5.00–30.16) vs. 14.50 % (11.38–22.16); *p* = 0.418]. These results did not change after adjusting for CV risk factors (age, physical activity, smoking, alcohol intake, hypertension, dyslipidemia and BMI) (men: *p* = 0.017 and women: *p* = 0.023 for aPWV and men: *p* = 0.832 and women: *p* = 0.718 for AIx@HR75). There was no difference in aPWV between genders (type 1: *p* = 0.115; healthy subjects: *p* = 0.158). Women had higher AIx@HR75 compared to men in both groups (type 1: *p* = 0.024; healthy subjects: *p* < 0.001), but these differences disappeared after adjusting for height. In univariate analyses (stratifying for study group), aPWV correlated positively with AIx@HR75 in both groups (Fig. 1). However, after performing a regression model (stratifying for study group), which included the main determinants of aPWV (age, BMI and MAP), AIx@HR75 did not remain a significant determinant of aPWV (type 1: *p* = 0.342; healthy subjects: *p* = 0.976).

Discussion

The major finding of this study is that although patients with type 1 diabetes showed greater AS (assessed as

Table 1 Clinical characteristics of study population (men)

Men	Healthy controls (n = 34)	Type 1 diabetes (n = 34)	p
Age (years)	35.6 (9.0)	36.5 (8.9)	0.963
Alcohol intake (g/day)	2.9 (0–7.1)	5.7 (2.9–15.0)	0.008
Current smokers (n, %)	7 (20.6)	12 (35.3)	0.089
Physical activity (METS-min/week)	1395.0 (779.6–2265.8)	1903.0 (910.5–2776.5)	0.270
Diabetes duration (years)	–	14.00 (8.50–20.50)	–
Retinopathy (n, %)	–	5 (14.7)	–
Nephropathy (n, %)	–	6 (17.6)	–
Peripheral polyneuropathy (n, %)	–	0 (0)	–
Body mass index (kg/m ²)	25.0 (2.8)	26.1 (3.3)	0.138
Waist (cm)	91.0 (10.1)	90.6 (11.3)	0.862
Waist-to-hip ratio	0.90 (0.10)	0.91 (0.07)	0.532
Systolic blood pressure (mmHg)	124.9 (9.5)	131.7 (10.8)	0.008
Diastolic blood pressure (mmHg)	73.8 (8.0)	76.7 (7.0)	0.124
Mean arterial pressure (mmHg)	90.8 (8.1)	95.0 (7.3)	0.029
Fasting plasma glucose (mmol/L)	4.76 (0.57)	8.71 (3.76)	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	5.08 (1.54)	4.74 (0.82)	0.260
Triglycerides (mmol/L)	0.88 (0.69–1.29)	0.83 (0.69–1.14)	0.585
HDL cholesterol (mmol/L)	1.31 (1.13–1.49)	1.31 (1.11–1.76)	0.560
LDL cholesterol (mmol/L)	2.81 (2.26–3.59)	2.61 (2.23–3.13)	0.213
HbA1c (%)	5.4 (5.1–5.5)	7.3 (6.6–7.9)	<0.001
UAC ratio (mg/mmol)	0.39 (0.30–0.51)	0.28 (0.20–0.47)	0.125
aPWV (m/s)	6.3 (5.7–6.7)	6.9 (6.5–7.9)	<0.001
AIx@HR75 (%)	8.25 % (4.00–11.38)	10.75 % (2.63–20.75)	0.462

Data are given as percentages, mean (SD) or median (interquartile range)

UAC ratio urinary albumin-to-creatinine ratio

aPWV) compared to controls, AIx@HR75 did not detect any differences between groups. Additionally, AIx@HR75 was not associated with aPWV after adjusting for the CV risk factors that determine aPWV. Based on these results, AIx@HR75 should not be used as the sole measurement to assess AS in type 1 diabetes.

We previously reported that subjects with type 1 diabetes had higher aPWV compared to their age- and sex-

Table 2 Clinical characteristics of study population (women)

Women	Healthy controls (n = 34)	Type 1 diabetes (n = 34)	p
Age (years)	35.3 (11.4)	35.2 (11.2)	0.971
Alcohol intake (g/day)	1.4 (0–2.9)	0.0 (0.0–0.7)	0.001
Current smokers (n, %)	9 (26.5)	12 (35.3)	0.536
Physical activity (METS-min/week)	1386.0 (770.3–2079.0)	1386.0 (672.8–1686.0)	0.442
Diabetes duration (years)	–	12.00 (6.75–18.00)	–
Retinopathy (n, %)	–	5 (14.7)	–
Nephropathy (n, %)	–	3 (8.8)	–
Peripheral polyneuropathy (n, %)	–	0 (0)	–
Body mass index (kg/m ²)	23.0 (3.1)	25.3 (3.9)	0.009
Waist (cm)	76.3 (6.9)	80.0 (10.3)	0.092
Waist-to-hip ratio	0.80 (0.06)	0.81 (0.07)	0.529
Systolic blood pressure (mmHg)	116.3 (9.5)	118.3 (9.6)	0.379
Diastolic blood pressure (mmHg)	67.9 (7.8)	69.1 (7.9)	0.508
Mean arterial blood pressure (mmHg)	84.0 (7.9)	85.5 (7.5)	0.417
Fasting plasma glucose (mmol/L)	4.59 (0.48)	9.59 (3.55)	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	5.18 (1.11)	4.82 (0.92)	0.146
Triglycerides (mmol/L)	0.72 (0.56–0.93)	0.70 (0.53–0.84)	0.484
HDL cholesterol (mmol/L)	1.77 (1.46–1.99)	1.80 (1.49–2.20)	0.377
LDL cholesterol (mmol/L)	2.78 (2.18–3.48)	2.47 (1.90–2.97)	0.056
HbA1c (%)	5.3 (5.2–5.4)	7.8 (7.1–9.1)	<0.001
UAC ratio (mg/mmol)	0.38 (0.27–0.65)	0.47 (0.30–0.91)	0.315
aPWV (m/s)	6.0 (5.3–6.7)	6.4 (5.9–7.5)	0.023
AIx@HR75 (%)	14.50 % (11.38–22.16)	20.75 % (5.00–30.16)	0.418

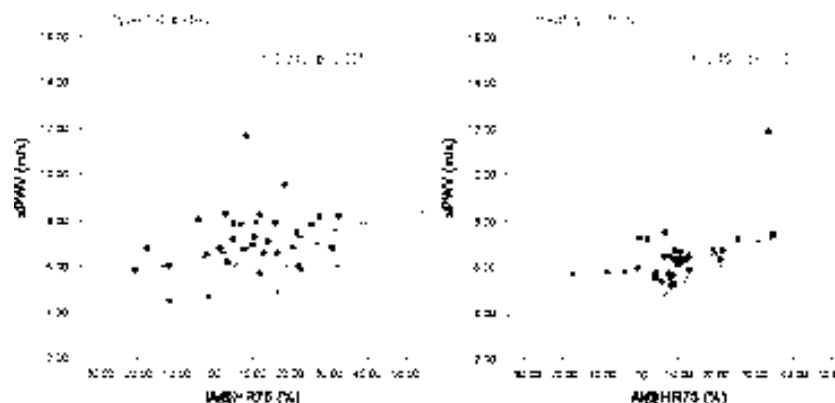
Data are given as percentages, mean (SD) or median (interquartile range).

UAC ratio urinary albumin-to-creatinine ratio

matched controls [4]. However, AIx@HR75 was not different between groups. Increased AIx has been reported in previous studies [12, 17] but not all [3, 18, 19]. Lacy et al. [3] found that adults with diabetes have higher aPWV but no differences in AIx@HR75 were found, according to our results.

In addition, we found a positive correlation between aPWV and AIx@HR75 in both groups. Previous studies

Fig. 1 Spearman correlation coefficients for the association between aPWV and AIx@HR75 parameters stratified for study group. *Black circles* men; *white circles* women



have observed similar associations [13, 14]. However, in our cohort, this relationship disappeared after adjusting for the remaining CV risk factors. One previous study in healthy subjects (designed to evaluate whether PWA could be used as a surrogate of aPWV) found that no derived PWA parameter was independently associated with aPWV [15]. The consensus on AS stated that aPWV is a direct measure of AS, while AIx would only be an indirect, surrogate measure of AS [8]. As mentioned before, the lack of association between parameters after adjusting for CV risk factors reinforces the independence of the main determinants regarding both aPWV and AIx as nonequivalent AS measurement tools [8].

Previous data support the evidence of gender differences in CV disease, especially in diabetes and even in prediabetes states [20–22]. In our study, aPWV values were similar for both genders while women had higher AIx@HR75 compared to men in both groups. This discrepancy has also been described in a healthy population [23]. Some authors have suggested that the higher AIx in women was predominantly due to differences in wave reflection rather than to differences in AS per se [23]. AIx is a composite measure that depends on both AS and the reflective properties of the arteries (the amplitude of the reflected wave and the reflectance point) [8]. Our study found that women, although less hypertensive, had lower height and higher heart rate than men. Taking all this into account and adjusting for these variables, gender differences disappeared. As such, our results are in agreement with previous data. Finally, other reports suggesting that AS was higher in women than in men [24] were performed with other techniques, using local determination of AS. Because the atherosclerotic process does not affect all territories equally, the use of regional measurements (aPWV) is recommended rather than local ones [8].

In summary, patients with type 1 diabetes showed greater AS (assessed as aPWV) compared to controls (and without

gender differences), but AIx@HR75 did not detect differences between subjects with type 1 diabetes and healthy controls. Therefore, AIx@HR75 should not be used as a substitute for aPWV for measuring AS in type 1 diabetic patients.

Acknowledgments Financial support was provided by: 1) Associació Catalana de Diabetis (Beca Gonçal Lloveras i Vallès 2008); 2) Fundació la Marató de TV3-2008 (Project N° 081410); 3) FIS PS09/01360. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain; and 4) Intensification Grant to José Miguel González-Clemente (Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

Conflict of interest None.

References

- Libby P, Nathan DM, Abraham K, Brunzell JD, Fradkin JE, Haffner SM, Hsueh W, Rewers M, Roberts BT, Savage PJ, Skarlatos S, Wassef M, Rabadan-Diehl C (2005) Report of the national heart, lung, and blood institute-national institute of diabetes and digestive and kidney diseases working group on cardiovascular complications of type 1 diabetes mellitus. *Circulation* 111(25):3489–3493
- Tarquini R, Lazzeri C, Pala L, Rotella CM, Gensini GF (2011) The diabetic cardiomyopathy. *Acta Diabetol* 48(3):173–181
- Lacy PS, O'Brien DG, Stanley AG, Dewar MM, Swales PP, Williams B (2004) Increased pulse wave velocity is not associated with elevated augmentation index in patients with diabetes. *J Hypertens* 22(10):1937–1944
- Llauradó G, Ceperuelo-Mallafre V, Vilardell C, Simó R, Freixenet N, Vendrell J, Gonzalez-Clemente JM (2012) Arterial stiffness is increased in patients with type 1 diabetes without cardiovascular disease. A potential role of low-grade inflammation. *Diabetes Care* 35(5):1083–1089
- Cavalcante JL, Lima JA, Redheuil A, Al-Mallah MH (2011) Aortic stiffness: current understanding and future directions. *J Am Coll Cardiol* 57(14):1511–1522
- Jung CH, Lee WY, Kim SY, Jung JH, Rhee EJ, Park CY, Mok JO, Oh KW, Kim CH, Park SW, Kim SW (2010) The relationship between coronary artery calcification score, plasma osteoprotegerin level and arterial stiffness in asymptomatic type 2 DM. *Acta Diabetol* 47(Suppl 1):145–152

7. Miyamoto M, Kotani K, Okada K, Fujii Y, Konno K, Ishibashi S, Taniguchi N (2012) The correlation of common carotid arterial diameter with atherosclerosis and diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 49(1):63–68
8. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H (2006) Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 27(21):2588–2605
9. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C (2010) Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 55(13):1318–1327
10. Gordin D, Waden J, Forsblom C, Thorn L, Rosengard-Barlund M, Tolonen N, Saraheimo M, Harjutsalo V, Groop PH (2011) Pulse pressure predicts incident cardiovascular disease but not diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes (The FinnDiane Study). *Diabetes Care* 34(4):886–891
11. Prince CT, Secrest AM, Mackey RH, Arena VC, Kingsley LA, Orchard TJ (2010) Pulse wave analysis and prevalent cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Atherosclerosis* 213(2):469–474
12. Gordin D, Waden J, Forsblom C, Thorn LM, Rosengard-Barlund M, Heikkilä O, Saraheimo M, Tolonen N, Hietala K, Soro-Paavonen A, Salovaara L, Makinen VP, Peltola T, Bernardi L, Groop PH (2012) Arterial stiffness and vascular complications in patients with type 1 diabetes: the Finnish Diabetic Nephropathy (FinnDiane) Study. *Ann Med* 44(2):196–204
13. Yasmin, Brown MJ (1999) Similarities and differences between augmentation index and pulse wave velocity in the assessment of arterial stiffness. *QJM* 92(10):595–600
14. Wimmer NJ, Townsend RR, Joffe MM, Lash JP, Go AS (2007) Correlation between pulse wave velocity and other measures of arterial stiffness in chronic kidney disease. *Clin Nephrol* 68(3):133–143
15. Gurovich AN, Beck DT, Braith RW (2009) Aortic pulse wave analysis is not a surrogate for central arterial pulse wave velocity. *Exp Biol Med* 234(11):1339–1344
16. Hallal PC, Victora CG (2004) Reliability and validity of the international physical activity questionnaire (IPAQ). *Med Sci Sports Exerc* 36(3):556
17. Wilkinson IB, MacCallum H, Rooijmans DF, Murray GD, Cockcroft JR, McKnight JA, Webb DJ (2000) Increased augmentation index and systolic stress in type 1 diabetes mellitus. *QJM* 93(7):441–448
18. Brooks B, Molyneaux L, Yue DK (1999) Augmentation of central arterial pressure in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 22(10):1722–1727
19. Siebenhofer A, Sutton AJ, Williams B (2000) Increased augmentation index and systolic stress in type 1 diabetes mellitus. *QJM* 93(12):839–841
20. Legato MJ, Gelzer A, Goland R, Ebner SA, Rajan S, Villagra V, Kosowski M (2006) Gender-specific care of the patient with diabetes: review and recommendations. *Gend Med* 3(2):131–158
21. Colhoun HM, Rubens MB, Underwood SR, Fuller JH (2000) The effect of type 1 diabetes mellitus on the gender difference in coronary artery calcification. *J Am Coll Cardiol* 36(7):2160–2167
22. Sipila K, Kahonen M, Salomaa V, Paivansalo M, Karanko H, Varpula M, Jula A, Kaaja R, Kesaniemi YA, Reunanen A, Moilanen L (2012) Carotid artery intima-media thickness and elasticity in relation to glucose tolerance. *Acta Diabetol* 49(3):215–223
23. McEniery CM, Yasmin Hall IR, Qasem A, Wilkinson IB, Cockcroft JR (2005) Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo-Cardiff collaborative trial (ACCT). *J Am Coll Cardiol* 46(9):1753–1760
24. Ahlgren AR, Astrand H, Sundkvist G, Lanne T (2005) Increased aortic stiffness is persistent in type 1 diabetic women: a follow-up study. *Diabetologia* 48(4):780–783

12.2. Annex 2: Llauradó G, Ceperuelo-Mallafre V, Vilardell C, Simó R, Cano A, Vendrell J, González-Clemente JM. Skin accumulation of advanced glycation end products is associated with arterial stiffness in type 1 diabetes: a case-control study. En revisió.

Title: Skin accumulation of advanced glycation end products is associated with arterial stiffness in type 1 diabetes

Gemma Llauradó¹, MD; Victòria Ceperuelo-Mallafre^{2,5}, MD, PhD; Carme Vilardell³, MD, PhD; Rafael Simó⁴, MD, PhD; Pilar Gil⁵, MD; Albert Cano¹, MD; Joan Vendrell⁵, MD, PhD; José-Miguel González-Clemente¹, MD, PhD.

¹Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell, Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí (Universitat Autònoma de Barcelona), Sabadell, Spain.

²Centro de Investigación Biomédica en Red-Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERObn). Hospital Clínico Virgen de la Victoria, Málaga, Spain.

³Diabetes, Endocrinology and Nutrition Unit, Hospital Sant Joan de Déu de Manresa, Xarxa Assistencial Althaia, Manresa, Spain.

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) and Diabetes and Metabolism Research Unit. Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón (VHIR). Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain.

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM). Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona. Institut Pere Virgili. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, Spain.

Corresponding author:

Dr. José-Miguel González-Clemente

Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition

Hospital de Sabadell. Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí.

Parc Taulí s/n. 08208 Sabadell. Spain.

Tel: 34 93 745 84 12. Fax: 34 93 716 0646.

E-mail: josmi.gonza@gmail.com

Abstract

Objective: To investigate the relationship between advanced glycation end products (AGEs) and arterial stiffness (AS) in subjects with type 1 diabetes without clinical cardiovascular (CV) disease.

Research, Design and Methods: Sixty-eight patients with type 1 diabetes and 68 age- and sex-matched healthy subjects were evaluated. AGEs were assessed by serum concentrations of N-carboxy-methyl-lysine (CML) and by skin autofluorescence (AGE Reader®). AS was assessed by aortic pulse wave velocity (aPWV), using applanation tonometry (Sphygmocor®).

Results: Subjects with diabetes had higher serum concentrations of CML (1.18 µg/ml vs. 0.96 µg/ml; $p=0.008$) and higher levels of skin autofluorescence (2.10 vs. 1.70; $p<0.001$) compared with healthy controls. These differences remained significant after adjusting for classical CV risk factors. Skin autofluorescence was positively associated with aPWV in the whole group ($r=0.390$; $p<0.001$) and in patients with type 1 diabetes ($r=0.370$; $p=0.003$). No association was found between CML and aPWV. Multiple linear regression analyses revealed that skin autofluorescence was independently and significantly associated with aPWV in type 1 diabetes ($\beta=0.380$; $p<0.001$) after adjusting for classical CV risk factors. Additional adjustments for HbA1c, disease duration and low-grade inflammation markers did not change these results.

Conclusion: Skin accumulation of autofluorescent AGEs is strongly associated with AS in subjects with type 1 diabetes and no previous clinical CV disease. These findings suggest not only that tissue AGEs accumulation may be involved in the development of AS but also that it could be used as a surrogate of AS in type 1 diabetes.

Cardiovascular (CV) disease is the major cause of mortality in type 1 diabetes (1). Diabetes mellitus results in an accelerated arteriosclerotic process, which is not fully explained by classical CV risk factors. As a result, the pathophysiological mechanisms underlying CV events in type 1 diabetes are not completely understood.

Arterial stiffness (AS) is an early sign of arteriosclerosis (2) and predicts CV events independently of classical CV risk factors in several populations (3). The exact mechanisms responsible for the increase in AS are not fully understood, but are likely to reflect a complex interaction between structural and functional changes in the arterial wall (4). The structural changes are characterized by an overproduction of abnormal collagen and diminished quantities of normal elastin induced by an inflammatory milieu (4). In this regard we have recently shown that low-grade inflammation is independently associated with an increase of AS in type 1 diabetes (5). However, other mechanisms such as the formation of advanced glycation end products (AGEs), are thought to be involved in the increase that occurs in diabetes (4).

AGEs are the result of non-enzymatic irreversible glycation and oxidation of proteins, lipids and nucleic acids. Hyperglycemia and oxidative stress accelerate the accumulation of AGEs (6), which have been involved in the development of micro- and macrovascular complications in type 1 diabetes (7; 8). AGEs can be assessed by chemical characterization; pentosidin and N-carboxy-methyl-lysine (CML) being some examples of well-characterized AGEs. Interestingly, certain dermal AGEs exhibit autofluorescent properties and the measurement of skin autofluorescence has been proposed as a novel marker of tissue accumulation of AGEs (9). AGEs can act through two primary mechanisms: via cross-linking formation or via its receptor (RAGE). The interaction of AGE with RAGE triggers multiple signalling cascades resulting in activation of nuclear transcription factors, secretion of proinflammatory cytokines and vascular adhesion molecules (10). AGEs formed on the arterial wall can cause cross-linking of collagen molecules, which may lead to loss of collagen elasticity and a subsequent reduction in arterial elasticity (11).

The gold standard for measuring central AS is aortic wave velocity (aPWV). Higher aPWV is reflective of AS. AGEs have been associated with an increase in aPWV in the healthy (12), in hypertensive individuals (13), in subjects with end stage renal failure (14) and in type 2 diabetes (15). In type 1 diabetes, AGEs have been associated

with an increase in pulse pressure (PP), a surrogate marker of central AS (16). However, it is unknown whether there is a relationship between AGEs and AS measured by aPWV in type 1 diabetic patients without clinical CV disease.

The main aim of the present study is to examine the relationship between AGEs assessed by skin autofluorescence and serum concentrations of CML and central AS, assessed by aPWV, in type 1 diabetic patients without clinical CV disease.

Research, Design and Methods

Sixty-eight patients with type 1 diabetes aged 18-65 years, and 68 age- and sex-matched healthy subjects were included in our study. None had any clinical CV disease. None had any condition associated with an inflammatory response (e.g. acute or chronic infectious diseases) or had received anti-inflammatory treatment in the previous 6 months. Subjects with type 1 diabetes were consecutively recruited from our outpatient clinic and all had at least one year of evolution. The control group was recruited from hospital staff members and their relatives and friends.

After an overnight fast, venous blood samples were taken and aliquots of plasma and serum were stored at -80°C until processing. In women, all measurements were done during the follicular phase of the menstrual cycle. The following information was recorded using a predefined standardized form: sex, age, diabetes duration, body mass index (BMI), waist-to-hip ratio (WHR), systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP) and mean arterial pressure (MAP) - defined as $1/3 \text{ SBP} + 2/3 \text{ DBP}$ -, physical activity (IPAQ questionnaire), cigarette smoking, alcohol intake, insulin dose or any other drug treatment, microvascular complications (assessed only in patients with type 1 diabetes as previously described (5)), HbA1c, lipid profile and serum concentrations of inflammatory-related serum proteins (high-sensitivity CRP -hsCRP-, IL-6, soluble fractions of the TNF- α receptors 1 and 2 - sTNF α R1 and sTNF α R2-), serum concentrations of endothelial dysfunction markers (soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin) and CML.

Hypertension was defined as having BP >140/90 (17) and/or being under antihypertensive treatment. Dyslipidemia was defined as having concentrations of total cholesterol >5.2mmol/L, triglycerides >1.7mmol/L, HDL-cholesterol

<1.03mmol/L, LDL-cholesterol >3.4mmol/L (18) and/or receiving drug treatment for dyslipidemia.

The study protocol was approved by our hospital's Ethics Committee, and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All subjects gave their written informed consent before participating in the study.

Skin autofluorescence

Skin autofluorescence was assessed by the AGE Reader® (DiagnOptics BV, Groningen, The Netherlands). Three measurements per patient were taken at room temperature on the forearm, at around 5-10 cm below the elbow fold, with patients in a sitting position. Briefly, the AGE Reader® illuminates approximately 1cm² of skin surface (guarded against surrounding light) with an excitation light source of 300 to 420nm. The light from the skin is measured with a spectrometer (model PC-1000 fiber optic spectrometer, Ocean Optics, Dunedin, The Netherlands) in the 300–600nm range, using a 200µm glass fiber (Farnell, Leeds, UK). Autofluorescence is calculated as the average light intensity per nanometer in the range between 420 and 600nm, divided by the average light intensity per nanometer in the range between 300 and 420nm (autofluorescence), multiplied by 100 and expressed as arbitrary units (AU). This technique has been previously validated in both type 1 and type 2 diabetes (9).

Assessment of arterial stiffness

Measurement of aortic pulse wave velocity (aPWV)

Subjects rested supine and measurements were taken in accordance with the recommendations of the recent consensus on AS (19). The method has been previously described elsewhere in detail (5). Briefly, aPWV was determined by sequential applanation tonometry (Millar tonometer: SPC-301; Millar Instruments Houston, Texas, USA) at the carotid and femoral arteries gated to a three-lead ECG using the SphygmoCor® device (SphygmoCor®; AtCor, Sydney, Australia). aPWV not achieving the automatic quality controls specified by the SphygmoCor® software were rejected. The mean of two aPWV measurements was taken for each subject for all calculations. Data were available for all the participants included in the study.

Laboratory analyses

HbA1c was determined by high-performance liquid chromatography (Menarini Diagnostics, Firenze, Italy). Total serum cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol were measured using standard enzymatic methods. High-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) was determined by immunonephelometry (Siemens, Munich, Germany). ELISA was used for the assessment of interleukin (IL)-6 (R&D Systems, Oxon, UK), soluble fractions of the tumor necrosis factor alpha receptor 1 (sTNF α R1) (Hycultbiotech, Uden, The Netherlands) and 2 (sTNF α R2) (R&D Systems, Oxon, UK), ICAM-1 (Boster Biological Technology, Wuhan, China), VCAM-1 (Boster Biological Technology, Wuhan, China), E-selectin (Boster Biological Technology, Wuhan, China) and CML (Cylex Co., Ltd, Nagano, Japan). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 5.2-7.4% and 4.7-15.2% (respectively) for CML.

Statistical Analyses

Data are presented as percentages, means (SD) for variables normally distributed or medians (interquartile range) for variables not normally distributed. All data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. To improve skewedness and kurtosis, variables not normally distributed were log transformed. Differences between patients with type 1 diabetes and controls were analysed using the χ^2 test for comparisons of proportions, and unpaired t-tests or Mann-Whitney U tests for comparisons of quantitative variables as needed. We assessed the potential relationships between all variables through univariate, non-parametric correlations. To assess the relationship between AGEs and AS, linear regression models were used to adjust for potential confounders, using aPWV as dependent variable. Independent variables for linear regression analyses were selected based on univariate correlation analyses and those variables known or likely to be associated with AGEs or AS. Because we measured inflammatory-related serum proteins and endothelial dysfunction markers only once, the association (if any) with AGEs and AS would tend to be underestimated. To address this issue, a Z-Score was calculated for each marker as follows: (value in the individual minus mean value in the study population) / SD. Subsequently, the low-grade inflammation general score was calculated as (Z-score of

hsCRP + Z-score of IL-6 + Z-score of sTNF α R1 + Z-Score of sTNF α R2)/4 and an ED general score was calculated as (Z-score of ICAM-1 + Z-score of VCAM-1 + Z-score of E-selectin)/3. The IBM SPSS Statistics (v. 19 for Mac; SPSS, Inc, IBM Company) was used for all calculations. All p values were two-sided and a p value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Sixty-eight patients with type 1 diabetes and 68 age- and sex-matched healthy subjects (n=136) were included in the study. Their clinical and analytical characteristics are shown in Table 1. Of 136 subjects, 8 were on antihypertensive drugs (7 patients), 15 were on statins (14 patients) and 6 were on antiplatelet drugs (all patients). Subjects with type 1 diabetes, compared with healthy subjects, were more hypertensive, had higher values of BMI, SBP, fasting plasma glucose, HbA1c and higher concentrations of inflammatory-related serum proteins. Additionally, subjects with type 1 diabetes presented lower concentrations of LDL-cholesterol, probably due to a great number of patients treated with statins.

Subjects with type 1 diabetes had higher serum concentrations of CML (1.18 μ g/ml (0.94-1.40) vs. 0.96 μ g/ml (0.77-1.23); p=0.008) and higher levels of skin autofluorescence (2.10 (1.80-2.30) vs. 1.70 (1.60-2.10); p<0.001) when compared with their respective controls (Table 1). These differences remained significant after adjusting for classical CV risk factors (age, gender, physical activity, smoking status, hypertension, dyslipidemia and BMI) (β =0.280; p=0.023 and β =0.341; p<0.001 for CML and skin autofluorescence respectively).

Tables 2 and 3 show univariate correlations between CML and skin autofluorescence with CV risk factors in the whole population, healthy subjects and patients with type 1 diabetes, respectively. In the whole population, CML was associated with the presence of dyslipidemia, type 1 diabetes, fasting plasma glucose and HbA1c (Table 2). Skin autofluorescence was associated with age, smoking status, the presence of hypertension and dyslipidemia, BMI, type 1 diabetes, fasting plasma glucose and HbA1c (Table 3). In healthy subjects, CML was only correlated with the presence of dyslipidemia (Table 2) while skin autofluorescence was positively correlated with age, smoking status, total and LDL-cholesterol and triglycerides (Table

3). In type 1 diabetes, univariate correlation did not show any association between serum concentrations of CML and cardiovascular risk factors or glycaemic control (Table 2). Skin autofluorescence was correlated with age, BMI and diabetes duration ($r=0.291$; $p=0.021$) (Table 3).

Patients with type 1 diabetes had higher aPWV compared with their respective controls (6.8 (6.0-7.9) vs. 6.1 (5.5-6.7); $p<0.001$). In univariate analyses, skin autofluorescence was positively associated with aPWV either in the whole group ($r=0.390$; $p<0.001$) or in type 1 diabetes ($r=0.370$; $p=0.003$) but not in healthy subjects ($r=0.186$; $p=0.233$). No association was found between CML and aPWV for any of the three groups. Multiple linear regression analyses revealed that skin autofluorescence was independently and significantly associated with aPWV only in type 1 diabetes and after adjusting for classical CV risk factors (Table 4). Additional adjustments for HbA1c, disease duration, low-grade inflammation and endothelial dysfunction did not change these results.

Conclusions

Non-invasive skin intrinsic fluorescence using certain collagen AGEs fluorescent properties, is gaining acceptance as a novel marker of AGEs accumulation. The main finding of the current study is that skin autofluorescence AGEs quantification is highly correlated with increased AS in patients with type 1 diabetes, before developing CV disease. Of note is that this association is independent of classical CV risk factors, glycaemic control, disease duration, low-grade inflammation and endothelial dysfunction. Likewise, these patients showed higher levels of circulating AGEs than their respective counterparts, despite no relationship existing between serum AGEs and skin fluorescence.

AGEs have been involved in the etiology of micro- and macrovascular complications in type 1 diabetes (7; 8). Additionally, skin autofluorescence has been associated with the presence of CV disease in both type 1 and type 2 diabetes (20; 21). Strikingly, serum levels of AGEs were predictive of CV events and all-cause mortality in a type 1 diabetes cohort (8). Our results would be in agreement with these results and suggest that increased tissue AGEs accumulation would be involved even in early stages of arteriosclerotic disease. Interestingly, skin autofluorescence remained

associated with AS after adjusting for classical CV risk factors, glycemic control, disease duration, low-grade inflammation and endothelial dysfunction. This observation leads us to propose that measurements of AGEs in skin may be a useful marker of arterial derangement in these patients, before clinical events appear.

There are two primary mechanisms by which the accumulation of AGEs can contribute to the development of AS (22). On the one hand, AGEs can cause cross-linking of collagen and elastin fibrils, which may lead to the loss of their distensibility properties resulting in increased AS. On the other hand, AGEs can act via its receptor (RAGE) triggering multiple signalling cascades resulting in activation of nuclear transcription factors, secretion of proinflammatory cytokines and vascular adhesion molecules. In contrast to skin autofluorescence, CML, a non-crosslinking AGE and a ligand for RAGE, was not associated in our study with aPWV. Therefore, the lack of association between CML and AS and the fact that the association between AS and skin autofluorescence was independent of low-grade inflammation and endothelial dysfunction markers, leads us to hypothesize that the effect of AGEs on AS may be mainly induced by cross-linking rather than the AGE-RAGE activating axis. However, the data in the literature is confusing on this point. Thus, some AGE-crosslink breakers, such as ALT-711, have been shown to decrease AS (23). However, other studies have shown association between non-crosslinking AGEs, such as CML, and AS (16). As such, further studies are needed to elucidate the specific role of the different types of AGEs in the vascular pathology of type 1 diabetes.

The cross-sectional design of this study does not permit us to infer causality regarding the role of tissue AGEs accumulation in the development of AS. Additionally, the skin autofluorescence technique has several limitations. Not all AGEs exhibit fluorescent properties and other tissue components that fluoresce in the same range might be confounders. In addition, fluorescence is a reactivity group but does not allow collection of quantitative information on the individual compounds responsible for it.

In conclusion, AGEs are increased in patients with type 1 diabetes without clinical CV disease. Skin autofluorescence is strongly associated with AS independently of classical CV risk factors, glycemic control, disease duration and low-grade inflammation. These findings suggest not only that tissue AGE accumulation

plays an important role in the development of AS in type 1 diabetes but also that skin autofluorescence could be used as a surrogate of AS in these patients.

Acknowledgements

Financial support was provided by: 1) Fundació la Marató de TV3-2008 (Project Nº 081410); 2) FIS PS09/01360. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain; 3) Beca Taulí Recerca 2010 (Project Nº 2011517); 4) Intensification Grant to José Miguel González-Clemente (Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

Author's contribution: G.L. researched data, wrote the manuscript, contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. V.CM. researched data. C.V. contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. R.S. contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. A.C. researched data. J.V. contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. JM.GC. wrote the manuscript, contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript.

JM.GC. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Disclosure

We confirm that none of the authors have any relevant conflict of interest regarding this manuscript.

References

1. Libby P, Nathan DM, Abraham K, et al. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on Cardiovascular Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation* 2005;111:3489-3493
2. Cavalcante JL, Lima JA, Redheuil A, Al-Mallah MH. Aortic stiffness: current understanding and future directions. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1511-1522
3. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1318-1327
4. Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:932-943
5. Llauro G, Ceperuelo-Mallafre V, Vilardell C, et al. Arterial Stiffness Is Increased in Patients With Type 1 Diabetes Without Cardiovascular Disease: A potential role of low-grade inflammation. *Diabetes Care* 2012;35:1083-1089
6. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001;44:129-146
7. Genuth S, Sun W, Cleary P, et al. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:3103-3111
8. Nin JW, Jorsal A, Ferreira I, et al. Higher plasma levels of advanced glycation end products are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes: a 12-year follow-up study. *Diabetes Care* 2011;34:442-447
9. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PH, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* 2004;47:1324-1330
10. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006;114:597-605
11. Sell DR, Monnier VM. Molecular Basis of Arterial Stiffening: Role of Glycation. *Gerontology* 2012;58:227-237
12. Semba RD, Najjar SS, Sun K, Lakatta EG, Ferrucci L. Serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, is associated with increased aortic pulse wave velocity in adults. *Am J Hypertens* 2009;22:74-79
13. McNulty M, Mahmud A, Feely J. Advanced glycation end-products and arterial stiffness in hypertension. *Am J Hypertens* 2007;20:242-247
14. Ueno H, Koyama H, Tanaka S, et al. Skin autofluorescence, a marker for advanced glycation end product accumulation, is associated with arterial stiffness in patients with end-stage renal disease. *Metabolism* 2008;57:1452-1457
15. Choi KM, Yoo HJ, Kim HY, et al. Association between endogenous secretory RAGE, inflammatory markers and arterial stiffness. *Int J Cardiol* 2009;132:96-101

16. Schram MT, Schalkwijk CG, Bootsma AH, Fuller JH, Chaturvedi N, Stehouwer CD. Advanced glycation end products are associated with pulse pressure in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Hypertension* 2005;46:232-237
17. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2007;28:1462-1536
18. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143-3421
19. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006;27:2588-2605
20. Meerwaldt R, Lutgers HL, Links TP, et al. Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:107-112
21. Lutgers HL, Gerrits EG, Graaff R, et al. Skin autofluorescence provides additional information to the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) risk score for the estimation of cardiovascular prognosis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2009;52:789-797
22. Ziemann SJ, Kass DA. Advanced glycation endproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. *Drugs* 2004;64:459-470
23. Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, et al. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation* 2001;104:1464-1470

Tables

Table 1 – Clinical characteristics of study population

	Healthy subjects (n=68)	Type 1 diabetes (n=68)	p
Age (years)	35.4 (10.2)	35.3 (10.1)	0.945
Gender (male) (n, %)	34 (50)	34 (50)	1.00
Current smokers (n, %)	16 (23.5)	24 (35.3)	0.252
Physical activity (METS-min/week)	1386.0 (784.5-2079.0)	1416.0 (713.3-2367.0)	0.791
Family history of CHD (n, %)	6 (8.8)	3 (4.4)	0.493
Family history of T2DM (n, %)	12 (17.6)	16 (23.5)	0.396
Family history of T1DM (n, %)	1 (1.5)	5 (7.4)	0.208
Hypertension (n, %)	3 (4.4)	17 (25.0)	0.001
Dyslipidemia (n, %)	34 (50)	32 (47.1)	0.732
Diabetes duration (years)	-	13.0 (7.3-19.0)	-
Microvascular complications (n, %)	-	16 (23.5)	-
Retinopathy (n, %)	-	10 (14.7)	-
None (n, %)	-	58 (85.3)	-
Non proliferative (n, %)	-	6 (8.8)	-
Proliferative (n, %)	-	4 (5.9)	-
Nephropathy (n, %)	-	9 (13.2)	-
Peripheral polyneuropathy (n, %)	-	0 (0)	-
BMI (kg/m ²)	24.0 (3.1)	25.7 (3.6)	0.003
Waist (cm)	83.7 (11.3)	85.3 (12.0)	0.429
WHR	0.85 (0.1)	0.86 (0.1)	0.465
Systolic blood pressure (mmHg)	120.6 (10.4)	125.0 (12.1)	0.025
Diastolic blood pressure (mmHg)	70.8 (8.4)	72.9 (8.3)	0.154
Mean arterial pressure (mmHg)	87.4 (8.6)	90.3 (8.7)	0.059
Fasting plasma glucose (mmol/L)	4.67 (0.53)	9.15 (3.66)	<0.001
Total Cholesterol (mmol/L)	5.16 (1.33)	4.80 (0.87)	0.070
Triglycerides (mmol/L)	0.80 (0.62-1.17)	0.78 (0.61-0.97)	0.422
HDL-Cholesterol (mmol/L)	1.50 (1.19-1.87)	1.70 (1.21-1.90)	0.369
LDL-Cholesterol (mmol/L)	2.81 (2.25-3.58)	2.52 (2.14-.11)	0.028
HbA1c (%)	5.3 (5.2-5.5)	7.5 (6.8-8.7)	<0.001
Urinary ACR (mg/mmol)	0.39 (0.28-0.57)	0.36 (0.24-0.69)	0.716
aPWV (m/s)	6.1 (5.5-6.7)	6.8 (6.0-7.9)	<0.001
hsCRP (mg/L)	0.8 (0.4-1.5)	1.3 (0.5-2.8)	0.038
IL-6 (pg/mL)	0.3 (0.2-0.5)	0.6 (0.3-1.1)	<0.001
sTNF α R1 (pg/mL)	1535.1(1190.0-2845.6)	2592.3(1560.8-3021.3)	0.014
sTNF α R2 (pg/mL)	2201.8(1880.2-2561.5)	2568.9(2153.9-3024.0)	0.001

12. Annexes

Low-grade Inflammation Score	-0.35 (-0.63-0.16)	0.12 (-0.20-0.55)	<0.001
ICAM-1 (ng/mL)	55.1 (48.3-62.7)	58.1 (51.8-69.0)	0.063
VCAM-1 (ng/mL)	715.8 (541.2-954.7)	782.6 (628.6-1090.2)	0.128
E-Selectin (ng/mL)	73.6 (50.9-99.1)	104.6 (68.5-184.9)	<0.001
Endothelial dysfunction Score	-0.28 (-0.58-0.02)	0.14 (-0.27-0.58)	<0.001
CML $\mu\text{g/ml}$	0.96 (0.77-1.23)	1.2 (0.9-1.4)	0.008
Skin AF	1.7 (1.6-2.1)	2.1 (1.8-2.3)	<0.001

Data are given as percentages, mean (SD) or median (interquartile range). CHD, coronary heart disease; ACR, urinary albumin/creatinine ratio.

Table 2 – Spearman correlation coefficients for the association between CML and classical CV risk factors.

	All	Healthy subjects	Type 1 diabetes
Age (years)	-0.092	-0.019	-0.178
Female gender	0.109	0.135	0.073
Diabetes mellitus (N/Y)	0.227**	-	-
Smoking (N/Y)	0.025	0.174	-0.178
Physical activity(METS-min/week)	-0.111	-0.085	-0.194
Hypertension (N/Y)	-0.147	-0.066	-0.207
Dyslipidemia	0.221**	0.255*	0.208
BMI (kg/m ²)	-0.008	-0.145	-0.033
Waist (cm)	-0.107	-0.209	-0.047
WHR	-0.063	-0.022	-0.141
SBP (mmHg)	-0.085	0.093	-0.189
DBP (mmHg)	-0.121	-0.049	-0.169
MAP (mmHg)	-0.124	-0.006	-0.227
Total Cholesterol (mmol/L)	0.095	0.120	0.121
Triglycerides (mmol/L)	0.052	0.031	0.066
HDL-Cholesterol (mmol/L)	0.044	0.032	0.025
LDL-Cholesterol (mmol/L)	0.055	0.089	0.087
FPG (mmol/L)	0.189*	0.042	0.041
HbA1c (%)	0.279**	0.152	0.151

SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure, MAP, mean arterial pressure; FPG, fasting plasma glucose. *p<0.05. **p<0.01.

12. Annexes

Table 3 – Spearman correlation coefficients for the association between skin autofluorescence and classical CV risk factors.

	All	Healthy subjects	Type 1 diabetes
Age (years)	0.444**	0.499**	0.494**
Female gender	0.178	0.199	0.221
Diabetes mellitus (N/Y)	0.390**	-	-
Smoking (N/Y)	0.362**	0.340*	0.241
Physical activity(METS-min/week)	-0.160	-0.124	-0.230
Hypertension (N/Y)	0.203*	0.120	0.098
Dyslipidemia	0.203*	0.247	0.184
BMI (kg/m ²)	0.274**	0.170	0.258*
Waist (cm)	0.222*	0.095	0.292*
WHR	0.116	0.034	0.142
SBP (mmHg)	0.108	0.041	0.035
DBP (mmHg)	0.123	0.041	0.014
MAP (mmHg)	0.138	0.077	0.046
Total Cholesterol (mmol/L)	0.175	0.467**	0.126
Triglycerides (mmol/L)	0.107	0.343**	-0.057
HDL-Cholesterol (mmol/L)	0.094	0.034	0.162
LDL-Cholesterol (mmol/L)	0.151	0.492**	0.097
FPG (mmol/L)	0.305**	0.019	0.049
HbA1c (%)	0.407**	0.133	0.193

SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure, MAP, mean arterial pressure; FPG, fasting plasma glucose. *p<0.05. **p<0.01.

Table 4. Association between skin autofluorescence and aPWV in subjects with type 1 diabetes.

log aPWV (R=0.737; R ² =0.543)	B	SD	β	95% CI	p
constant	0.178	0.094	-	-0.011-0.368	0.065
BMI	0.007	0.002	0.338	0.003-0.011	0.001
MAP	0.003	0.001	0.361	0.001-0.004	0.001
Total Cholesterol	0.001	0.000	0.287	0.000-0.001	0.006
Skin Autofluorescence	0.370	0.097	0.380	0.175-0.565	<0.001

Variables adjusted for into this model: age, gender, smoking, physical activity, hypertension (N/Y), dyslipidemia (N/Y), BMI, mean arterial blood pressure, total cholesterol, log triglycerides, logHDL-cholesterol, and skin autofluorescence. Only significant variables are shown in the table.