



Universitat Autònoma de Barcelona

TESIS DOCTORAL

**BIOMARCADORES DE LA INFLAMACIÓN EN
LA DIABETES MELLITUS TIPO 2:
EFECTO DEL CONTROL GLUCÉMICO Y DEL
FENOTIPO DE LAS LDL**

Programa de Doctorado en Medicina.

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona.

2014

Directores de Tesis:

Dr. Antonio Pérez Pérez

Prof. Alberto de Leiva Hidalgo

Doctoranda:

Irene Vinagre Torres

A mis grandes amores: Carles, Martina y Carlota. Por el tiempo que os he podido quitar.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Antonio Pérez, Director de Unidad del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital de Sant Pau, por contagiarme su entusiasmo por la diabetes desde que empecé la residencia, porque gracias a él he aprendido a entenderla y a disfrutarla. Por darme la oportunidad de colaborar en sus trabajos y por las ganas de que este proyecto saliera adelante. También agradecerle la paciencia que ha tenido estos 6 años que ha durado el periplo, el tiempo dedicado a la corrección de cada uno de los artículos incluidos en esta tesis doctoral y de las distintas versiones de la misma. Él es el verdadero creador de la esencia de esta tesis.

Al Prof. Alberto de Leiva, Director del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital de Sant Pau, Catedrático de Medicina y Co-Director de esta tesis doctoral, por las aportaciones constructivas realizadas en la fase final de esta tesis doctoral.

Al Dr. José Luís Sánchez-Quesada por la ayuda con las determinaciones de los parámetros lipídicos e inflamatorios y por su incalculable ayuda en la escritura de los artículos incluidos en esta tesis. Sin él esta tesis no se habría podido llevar a cabo.

Al Dr. Juan Sánchez por su colaboración en el análisis estadístico de gran parte de los trabajos incluidos en esta tesis doctoral y por los momentos dedicados a resolver las dudas que me han ido surgiendo al respecto.

A cada uno de los residentes del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital de Sant Pau con los que he compartido la residencia. Por los buenos y menos buenos momentos pasados mientras aprendíamos y trabajábamos duro, por el grupo tan unido que formábamos.

A los pacientes que aceptaron participar en los trabajos incluidos en esta tesis y a todos los profesionales que me ayudaron a atenderlos.

Al Dr. Josep Vidal, jefe del Servicio de Endocrinología del Hospital Clínic, por darme una oportunidad en el momento que la necesitaba y por confiar en mí.

Al resto de mis compañeros del Servicio de Endocrinología del Hospital Clínic, sobretodo a mis compañeros de despacho, Ignacio y Marga, por acompañarme estos últimos 4 años y por animarme a acabar con este largo proyecto en los momentos bajos.

A mis padres por acompañarme en estos 35 años, por estimularme a aprender cada día y a ser un poco mejor que el día anterior. Porque sin ellos y sus consejos hoy yo no estaría aquí. Mi eterno agradecimiento.

A mi hermana porqué sé que siempre estará ahí. A mis amigos, por estar ahí cuando les necesito.

A mi tío Miguel por ser el espejo en el que me he querido mirar siempre. Gracias a él me interesé por la profesión y he avanzado en ella con respeto y dedicación.

A Carles, por compartir su vida a mi lado, ayudándome desinteresadamente siempre que ha sido necesario con sus consejos y sus actos. Y a mis hijas, Martina y Carlota, por ser el verdadero motor que me mueve cada día. Os quiero.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
<hr/>	
INTRODUCCIÓN	19
<hr/>	
1 PREVALENCIA Y PATOGENIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2	21
2 RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA DM2. PAPEL DE LA DISLIPEMIA ATEROGÉNICA	25
2.1 Riesgo cardiovascular en la DM2.....	25
2.2 Dislipemia aterogénica. Concepto y prevalencia	27
2.3 Dislipemia aterogénica y riesgo cardiovascular en el paciente con DM2	29
3 INFLAMACIÓN Y DM2.....	35
3.1 Proteína C reactiva	36
3.2 Factor de necrosis tumoral alfa.....	37
3.3 Adiponectina.....	38
3.4 Factor transformante del crecimiento beta 1.....	38
3.5 Interleucina-6	39
3.6 Otras citocinas proinflamatorias	39
4 CONTROL GLUCÉMICO EN LA DM2	42
4.1 Objetivos de control y situación actual en nuestro entorno	42
4.2 Estrategias terapéuticas en la DM2.....	45
<hr/>	
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO	47
<hr/>	
1 JUSTIFICACIÓN	49
2 HIPÓTESIS DE TRABAJO	51
<hr/>	
OBJETIVOS	53
<hr/>	
1 OBJETIVO GENERAL	55

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
MATERIAL Y MÉTODOS	57
1 ESTUDIOS INCLUIDOS.....	59
1.1 Estudio 1: “ <i>Factibilidad y eficacia de un programa de optimización del control glucémico con pauta de insulina bolo-basal en pacientes con DM2 de larga evolución y mal control glucémico</i> ”	59
1.2 Estudio 2: “ <i>Características antiaterogénicas de las partículas de HDL y LDL en pacientes con DM2 y mal control glucémico: efecto del control glucémico</i> ”	59
1.3 Estudio 3: “ <i>Estado inflamatorio en los pacientes con DM2 y mal control glucémico: efecto del control glucémico</i> ”	60
2 METODOLOGÍA	62
2.1 Historia clínica	62
2.3 Medidas antropométricas y de tensión arterial	62
2.4 Determinaciones analíticas.....	62
- Determinación de la HbA _{1c}	63
- Determinación de los parámetros lipídicos	63
- Determinación de los parámetros inflamatorios y adipoquinas	66
2.5 Test de calidad de vida	66
2.6 Análisis estadístico	66
RESULTADOS	69
1 ESTUDIO 1: “ <i>Factibilidad y eficacia de un programa de optimización del control glucémico con pauta de insulina bolo-basal en pacientes con DM2 de larga evolución y mal control glucémico</i> ”	71
1.1 Comunicaciones a congresos derivadas de este estudio	76
1.2 Publicaciones derivadas de este estudio	76
2 ESTUDIO 2: “ <i>Características antiaterogénicas de las partículas de HDL y LDL en pacientes con DM2 y mal control glucémico: efecto del control glucémico</i> ”	83

2.1 Estudio transversal: Modificaciones de las LDL, composición de las HDL y distribución de la Lp-PLA2 en la DM2. Impacto del fenotipo de las subfracciones de las LDL	84
2.2 Estudio longitudinal: Efecto del control glucémico en pacientes con DM2 sobre el tamaño de las LDL, LDL(-) y distribución de la Lp-PLA2	92
2.3 Comunicaciones a congresos derivadas de estos estudios	97
2.4 Publicaciones derivadas de estos estudios	98
3 ESTUDIO 3: “Estado inflamatorio en los pacientes con DM2 y mal control glucémico: efecto del control glucémico”	113
3.1 Estudio transversal	114
3.2 Estudio longitudinal	118
3.3 Comunicaciones a congresos derivadas de este estudio	121
3.4 Publicaciones derivadas de este estudio	121
DISCUSIÓN	129
1 ESTUDIO 1: “Factibilidad y eficacia de un programa de optimización del control glucémico con pauta de insulina bolo-basal en pacientes con DM2 de larga evolución y mal control glucémico”	133
2 ESTUDIO 2: “Características antiaterogénicas de las partículas de HDL y LDL en pacientes con DM2 y mal control glucémico: efecto del control glucémico”	137
2.1 Estudio transversal: Modificaciones de las LDL, composición de las HDL y distribución de la Lp-PLA2 en la DM2. Impacto del fenotipo de las subfracciones de las LDL	137
2.2 Estudio longitudinal: Efecto del control glucémico en pacientes con DM2 sobre el tamaño de las LDL, LDL(-) y distribución de la Lp-PLA2	142
3 ESTUDIO 3: “Estado inflamatorio en los pacientes con DM2 y mal control glucémico: efecto del control glucémico”	145
3.1 Inflamación sistémica en los sujetos con DM2	145
3.2 El efecto del control glucémico sobre los marcadores inflamatorios en DM2	146
3.3 El posible papel de TGF- β_1 en la nefropatía diabética	147

CONCLUSIONES	149
1 CONCLUSIÓN GENERAL	151
2 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	152
BIBLIOGRAFÍA	153

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS:

ADA: American Diabetes Association
AGL: ácidos grasos libres
ApoA-I: apolipoproteína A-I
ApoB: apolipoproteína B
ARA-II: antagonistas de los receptores de la angiotensina II
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol
cHDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad
cLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad
CT: colesterol total
cVLDL: lipoproteínas de muy baja densidad
DQoL: Diabetes Quality of Life
DM: diabetes mellitus
GLP-1: glucagon-like peptide-1
Gpx: glutatión peroxidasa
FG: filtrado glomerular
GBA: glucemia basal alterada
HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada
HPLC: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
ICAM-1: moléculas de adhesión intracelular tipo 1
IOG: intolerancia oral a la glucosa
IL-1b: interleucina-1b
IL-6: interleucina-6
IL-8: interleucina-8
IMC: índice de masa corporal
LCAT: lecitin-colesterol acil transferasa
LDL(-):LDL electronegativa
LDLgl: LDL glicada
LDLox: LDL oxidada
LPL: lipoprotein lipasa
Lp-PLA2: fosfolipasa A2 asociada a las lipoproteínas
MCP1: proteína quimiotáctica de monocitos 1
NCEP: National Cholesterol Education Program
NHANES: National Health And Examination Survey
NICE: National Institute for Health and Clinical Excellence

NGT: tolerancia normal a la glucosa

NPH: Neutral Protamine Hagedorn

NPL: Neutral Protamine Lispro

PAF-AH: actividad acetilhidrolasa del factor activador plaquetario

PCR: proteína C reactiva

PON1: paraoxonasa/arilesterasa 1

SAA: proteína sérica amiloide A

SCORE: Systematic Coronary Risk Evaluation

TG : triglicéridos

TGF- β : factor transformante del crecimiento beta

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

INTRODUCCIÓN

1. PREVALENCIA Y PATOGENIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2):

La diabetes mellitus (DM) representa un conjunto de enfermedades metabólicas que se caracterizan por presentar una hiperglucemia provocada por defectos en la secreción de insulina, en la acción de la misma o por ambas causas. La hiperglucemia crónica de la DM se asocia a la presencia a largo plazo de lesiones a nivel ocular, renal, nervioso, cardíaco y vascular.

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) representa el 90% de todos los casos de diabetes, con una prevalencia entorno al 13,8% en población mayor de 18 años y con todavía un 6% de los sujetos sin diagnosticar, según un estudio reciente realizado en España [1]. Como es bien conocido, esta prevalencia está en aumento y la DM2 se está convirtiendo en una auténtica epidemia, sobretodo en países desarrollados, debido al importante incremento de la obesidad, al sedentarismo y al progresivo envejecimiento de la población. La estimación de crecimiento de la prevalencia de la DM2 entre los años 2010 y 2030 supone un aumento del 72% en todo el mundo [2], lo que se asociará también a un incremento del gasto sanitario.

En la etiopatogenia de la DM2 intervienen factores ambientales y genéticos y se produce por la combinación de la resistencia a la acción de la insulina (por obesidad (**figura 1**), dieta rica en grasas, inactividad, envejecimiento o de base genética), que permanece relativamente estable durante el curso de la enfermedad, y por una pérdida progresiva de la función de la célula beta, que acaba con una inadecuada secreción de insulina (**figura 2**).

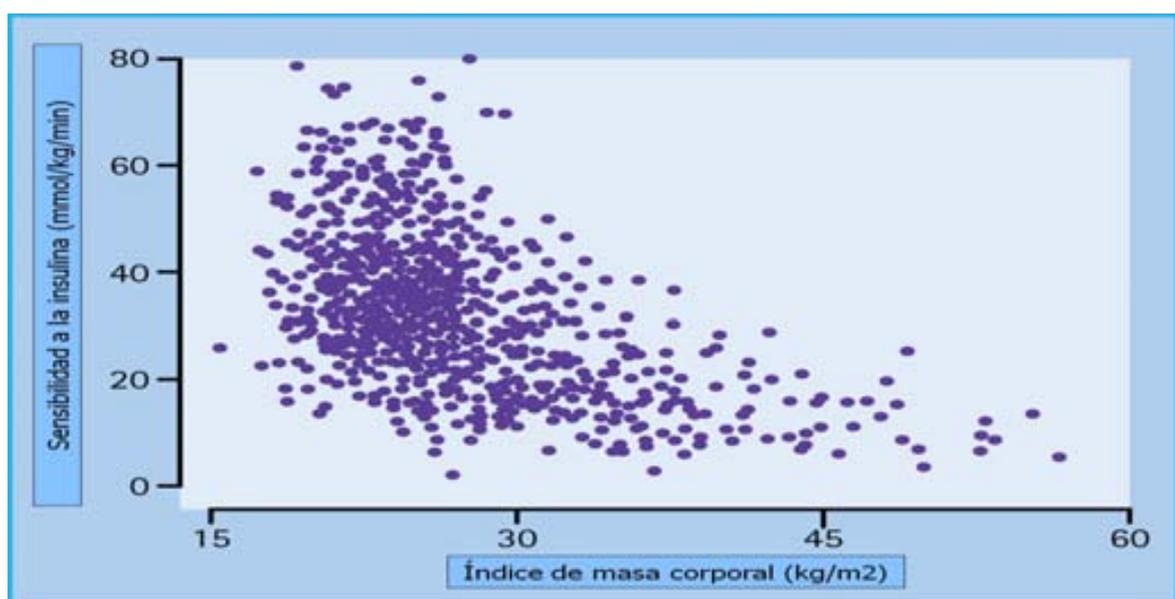


Figura 1: Relación entre índice de masa corporal y sensibilidad a la insulina en la DM2, observándose menor sensibilidad a la misma en sujetos con DM2 y obesidad.

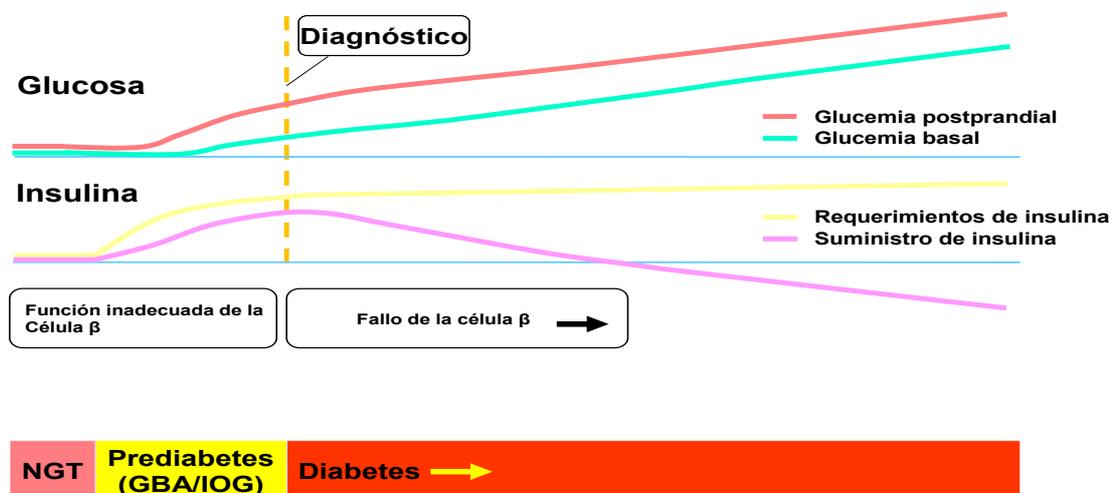


Figura 2: Función relativa de la célula beta pancreática: Relación entre insulinemia y resistencia a la insulina en la fisiopatología de la DM2. GBA: glucemia basal alterada; IOG: intolerancia oral a la glucosa; NGT: tolerancia normal a la glucosa.

Así, inicialmente existe un defecto en la acción de la insulina que resulta en una incapacidad de inhibir la producción hepática de glucosa o de facilitar la captación de glucosa por parte de los tejidos periféricos, fenómeno conocido con el nombre de resistencia a la acción de la insulina (insulinorresistencia). Concomitantemente, a nivel de la célula beta pancreática, existe un fenómeno de compensación de esta resistencia a la acción de la insulina, con una mayor secreción de esta hormona, que sería la denominada hiperinsulinemia. Mientras esta última es suficiente para contrarrestar la resistencia a la insulina, las cifras de glucemia en ayunas y posprandial se mantendrán normales. No obstante, diversos factores como la predisposición genética, la lipotoxicidad secundaria al incremento de ácidos grasos libres (AGL) y la misma glucotoxicidad sobre las células beta, acaban provocando el agotamiento de la célula beta pancreática a lo largo del tiempo. Éste incluye una primera fase de alteración de la pulsatilidad de la secreción de la insulina, con posterior pérdida de la respuesta insulínica de primera fase a una comida y, finalmente, una reducción de la secreción de la insulina, que contribuirá al progresivo deterioro del control glucémico [3] (**figura 3**). Gracias a los estudios realizados en indios Pima se ha demostrado que la disfunción de la célula beta es un importante factor independiente ya en el paso de la tolerancia normal a la glucosa a la intolerancia oral a la glucosa y a la DM2 [4;5]. Pero además, a medida que avanzan los años de evolución de la DM2, la disfunción secretora de la célula beta es cada vez más severa y cuando el déficit de insulina es suficientemente importante,

el sujeto requiere tratamiento sustitutivo con insulina, como sucede desde el debut en el sujeto con diabetes mellitus tipo 1 (DM1).

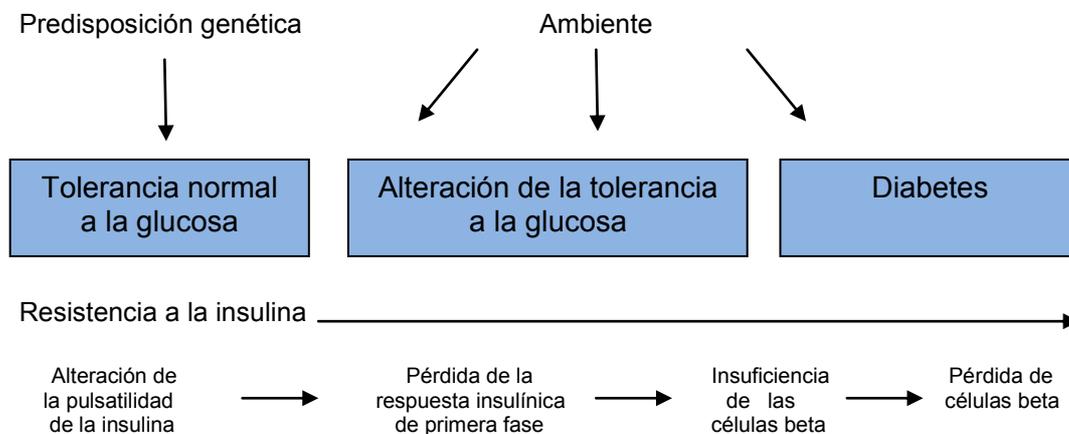


Figura 3: Esquema de la patología de la DM2.

Por otra parte, la predisposición genética asociada a una ingesta calórica excesiva y una falta de ejercicio físico, pueden contribuir también a la aparición de obesidad y adiposidad central. Se sabe que el incremento de peso provoca una disfunción del tejido adiposo por la infiltración por parte de los macrófagos, lo que conlleva a una secreción de citocinas como interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que a su vez, reducirán la expresión de Adiponectina. La elevación crónica de estos marcadores inflamatorios favorece la insulinresistencia a nivel del músculo esquelético y la disfunción endotelial a nivel vascular, así como la secreción de reactantes de fase aguda desde el hígado, como la proteína C reactiva (PCR) (**figura 4**, adaptada de La Calle [6]). Igualmente, el estado de hiperglucemia induce la producción de IL-6 desde el endotelio y los macrófagos, y con ello, se produce un empeoramiento de la liberación de insulina y de las cascadas de señalización. También es conocido que el estado de insulinorresistencia promueve la lipólisis, de tal forma que se incrementa la formación de partículas de LDL (lipoproteínas de baja densidad) pequeñas y densas [7], lo cual se asocia a un aumento del riesgo de arteriosclerosis [8] y, como consecuencia, también a un mayor riesgo de enfermedades cerebro y cardiovasculares. Además, la insulinorresistencia en la DM2 se asocia a disfunción endotelial por disminución de la disponibilidad del óxido nítrico, un potente vasodilatador, que también contribuiría al desarrollo de arteriosclerosis.

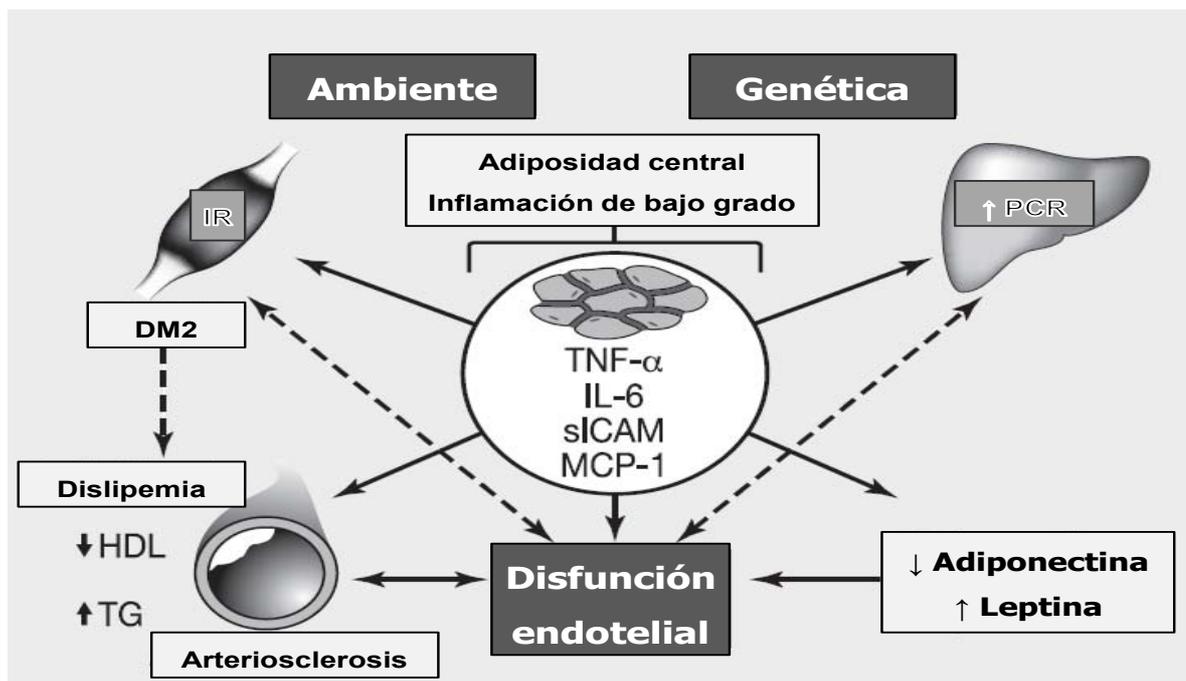


Figura 4: Relación entre los biomarcadores inflamatorios y la disfunción endotelial en varios órganos y tejidos del organismo. DM2: diabetes mellitus tipo 2; HDL: lipoproteínas de alta densidad; ICAM: moléculas de adhesión intracelular; IL-6: interleucina-6; IR: insulinorresistencia; MCP1: proteína quimiotáctica de monocitos 1; PCR: proteína C reactiva; TG: triglicéridos; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

2. RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA DM2. PAPEL DE LA DISLIPEMIA ATEROGÉNICA:

2.1 Riesgo cardiovascular en la DM2:

Las enfermedades cardiovasculares constituyen las complicaciones más prevalentes en los pacientes con DM2 y también son las que se asocian con mayor morbi-mortalidad. Según el estudio INTERHEART [9], que incluyó a 29.972 sujetos de 52 países diferentes, los factores más fuertemente predictores para sufrir un infarto agudo de miocardio fueron la dislipemia, el tabaquismo, la hipertensión arterial, la DM2, la obesidad central, los factores psicosociales y la falta de ejercicio físico regular. En los pacientes con DM2, el riesgo ya se inicia antes de alcanzarse los valores diagnósticos de la misma, tal como indica el mayor riesgo cardiovascular observado en situaciones de riesgo de diabetes, que incluyen la intolerancia oral a la glucosa, la glucemia basal alterada y la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) entre 5,7 y 6,4%.

El riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular es aproximadamente 2 veces superior en los pacientes con DM2, siendo ésta su principal causa de mortalidad (hasta un 40% debida a cardiopatía isquémica, un 15% debida a otras complicaciones cardíacas y un 10% debida a enfermedad cerebrovascular). Diferentes metanálisis han confirmado sobre una muestra total de cerca de 450.000 individuos de 37 estudios prospectivos, que el riesgo relativo de mortalidad coronaria es superior tanto en hombres (1,9) como en mujeres (2,5-3,1) con DM2 tras ajustar por edad, presión arterial sistólica, niveles lipídicos y hábito tabáquico [10;11]. Un hallazgo bastante constante en la mayoría de estudios es que el riesgo relativo es significativamente superior en mujeres postmenopáusicas con DM2 en comparación con los hombres.

El National Cholesterol Education Program (NCEP) [12] establece que los individuos con enfermedad coronaria confirmada presentan un riesgo de recidiva de infarto de miocardio y de muerte por enfermedad coronaria grave superior al 20% por cada período de 10 años. La mayoría de los pacientes con DM2 se considera que tienen un riesgo equivalente al de la enfermedad coronaria y son candidatos a la aplicación de un tratamiento tan intensivo y enérgico como el reservado para sujetos con enfermedad cardiovascular establecida. Las razones para esta categorización se basan en los datos que indican que en la mayoría de sujetos con DM2 el riesgo cardiovascular es muy elevado (superior al 20% a los 10 años), especialmente a partir de los 10 años de evolución de la diabetes, y que el pronóstico después de un episodio cardiovascular es mucho peor que el que tienen los sujetos sin DM2. Además, las tablas disponibles para la valoración del riesgo cardiovascular en la población general claramente infraestiman el riesgo cardiovascular en la población con diabetes y el beneficio obtenido con las medidas terapéuticas

indicadas para la prevención cardiovascular en los pacientes con DM2 es similar al observado en otras poblaciones con enfermedad cardiovascular establecida.

Sin embargo, tal como ocurre en otras poblaciones, los pacientes con DM son heterogéneos y la conclusión lógica de los diferentes estudios es que no todos los pacientes con DM2 tienen el mismo riesgo cardiovascular. Habrá pacientes con riesgo moderado, pero habrá otros con muy alto riesgo vascular y la diferencia podría explicarse, además de por diferencias metodológicas, por las diferencias que presentaban las distintas poblaciones analizadas en cuanto a la edad, sexo, duración previa de la diabetes y la presencia de síndrome metabólico en los sujetos analizados [13;14]. Según las recomendaciones de las Guías Europeas de Prevención Cardiovascular de 2012 [15], únicamente se puede estimar el riesgo con SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation) en los pacientes con DM1 sin lesión de órgano diana. El resto de los pacientes con diabetes se incluyen en las categorías de alto o muy alto riesgo cardiovascular. Aunque acorde con el concepto de riesgo equivalente, tal como se ha indicado previamente, está claro que no todos los pacientes con diabetes tienen el mismo riesgo vascular. Teniendo en cuenta las limitaciones de las de tablas de riesgo cardiovascular generales y específicas para la diabetes, probablemente la mejor estrategia, tal como recomiendan las guías de la American Diabetes Association (ADA) y de la National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE), es identificar clínicamente aquellos pacientes que no presentan riesgo elevado (corta evolución, ausencia de síndrome metabólico u otros factores de riesgo cardiovascular y sin complicaciones microangiopáticas).

Los mecanismos responsables del desarrollo acelerado de arteriosclerosis en la DM2 no se conocen con precisión, pero los factores de riesgo cardiovascular clásicos están implicados y el impacto de su reducción tiene igual o mayor repercusión que en los sujetos sin DM2. Los datos epidemiológicos del UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) en el momento del diagnóstico muestran que los pacientes con DM2, además de la edad y el género, presentan factores de riesgo potencialmente modificables: aumento del cLDL, cHDL (colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad) bajo, hiperglucemia, hipertensión arterial y tabaco [16]. Aunque la máxima significación estadística es para los lípidos plasmáticos y la hipertensión arterial (las *hazard ratio* fueron de 2,26 (1,70-3,00) para cLDL, 0,55 (0,41-0,73) para cHDL, 1,52 (1,15-2,1) para la HbA_{1c} y 1,82 (1,34-2,47) para la presión arterial sistólica, y 1,41 (1,06-1,88) para los fumadores), todos los factores son significativos y tienen una gran influencia en el desarrollo de eventos cardiovasculares. Por lo tanto, estos factores de riesgo cardiovascular clásicos, aunque no justifican en su totalidad el aumento del riesgo que tienen los pacientes con DM de padecer las manifestaciones de la arteriosclerosis, suelen estar incrementados y su efecto es superior en los pacientes con DM2. Además, los factores de riesgo en los pacientes con DM2 pueden tener

características específicas que les confieren mayor aterogenicidad, como es el caso de la dislipemia diabética o aterogénica, y frecuentemente se presentan asociados, constituyendo el denominado síndrome metabólico.

2.2 Dislipemia aterogénica. Concepto y prevalencia:

Una de las características más frecuentes en los pacientes con DM2 es la existencia de un perfil lipídico aterogénico, caracterizado por hipertrigliceridemia, HDL disminuídas, LDL pequeñas (diámetro < 25,5 nm) y densas y un aumento de la concentración de Apolipoproteína B (ApoB) (en general por encima de 120 mg/dl) [17;18]. En cambio, las concentraciones de colesterol total (CT) y cLDL no suelen estar aumentadas en estos pacientes con respecto a la población no diabética [19]. Otros hallazgos comunes de la dislipemia aterogénica son el aumento de las partículas VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) y de la actividad de las enzimas CETP (proteína transportadora de ésteres de colesterol) y LPL (lipoproteinlipasa) [19].

Aproximadamente un 80% de los sujetos con DM2 y exceso de grasa abdominal presentan insulinoresistencia, y éste parece ser el mecanismo clave de la dislipidemia en estos pacientes. La secuencia se inicia por la incapacidad de la insulina en condiciones de insulinoresistencia de suprimir la actividad de la lipasa del tejido adiposo, lo que se asocia a una mayor lipólisis, y liberación de ácidos grasos y glicerol. Así, el flujo aumentado de ácidos grasos al hígado estimularía la secreción de partículas de VLDL. La mayor concentración de ácidos grasos libres unidos a albúmina en el espacio vascular, incrementa su captación y transporte a nivel hepático y estimula su esterificación. Esto incrementa la síntesis y secreción de VLDL, ricas en ApoB [7], hecho que explicaría la hipertrigliceridemia en los sujetos con DM2. Posteriormente, el intercambio de triglicéridos desde VLDL hacia LDL y HDL a través de CEPT, conllevaría una pérdida de ésteres de colesterol y un enriquecimiento de triglicéridos. Estas partículas de LDL ricas en triglicéridos son el sustrato de la lipasa hepática, que las transforma en partículas de LDL pequeñas y densas [7], lo cual se asocia a un riesgo aumentado de enfermedad coronaria [8]. La predominancia de estas partículas LDL pequeñas y densas se conoce como fenotipo B de las LDL, en contraste con el fenotipo A, que se caracteriza por partículas de LDL grandes. El fenotipo A sería el predominante en los sujetos normolipémicos con bajo riesgo cardiovascular, mientras que el fenotipo B se asocia a enfermedades con elevado riesgo cardiovascular, incluyendo la DM2 [20]. Por otro lado, en los sujetos con DM2 también se ha descrito un aumento de la ApoB debido a un incremento de su síntesis hepática por la sobreproducción hepática de partículas VLDL y el enriquecimiento en triglicéridos de las mismas [21].

El enzima CEPT facilita el intercambio de triglicéridos entre VLDL y HDL, de modo que aumenta el contenido de triglicéridos (TG) en HDL. Igual que sucede con las partículas LDL, las HDL ricas en triglicéridos, se transforman en partículas HDL pequeñas y densas, potencialmente disfuncionales, gracias a la acción también de la lipasa hepática [7]. Además, las HDL enriquecidas en triglicéridos al ser hidrolizadas por la lipasa hepática sufren un proceso de disociación con liberación de la fracción apoproteica. Ésta es captada y excretada a nivel renal, lo que incrementa su catabolismo, traduciéndose en una reducción de los niveles de cHDL. Otro de los mecanismos propuestos que contribuye a las bajas concentraciones de cHDL es la disminución de la síntesis hepática de la apolipoproteína A-I (Apo A-I), la cual se ha descrito que podría estar inhibida por la presencia de citocinas proinflamatorias, especialmente por el TNF- α [22].

Este complejo metabolismo de las partículas transportadoras de colesterol se puede observar en la siguiente figura (**figura 5**)

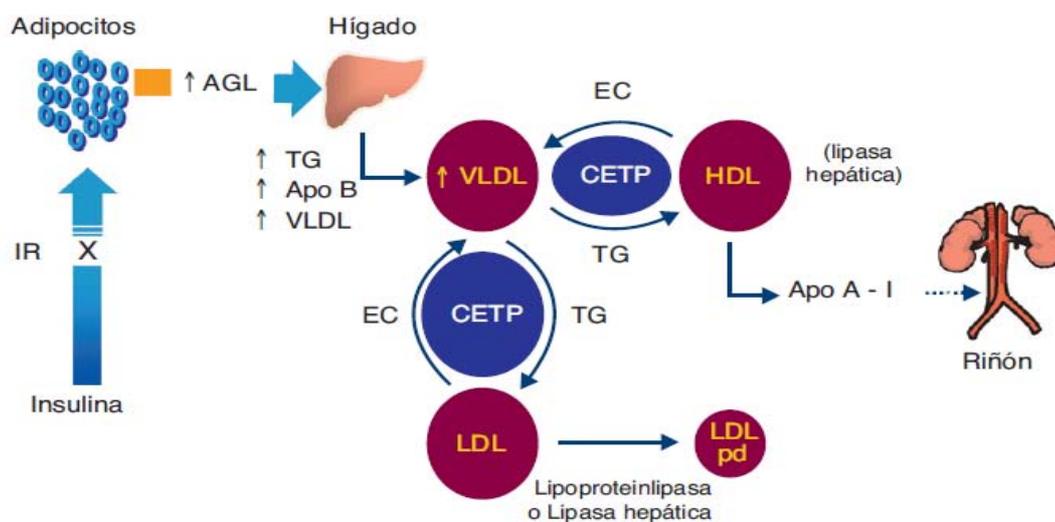


Figura 5: Mecanismos de producción de la dislipidemia diabética. AGL: ácidos grasos libres; Apo: apolipoproteína; CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol; EC: ésteres de colesterol; HDL: lipoproteínas de alta densidad; IR: insulinorresistencia; LDL: lipoproteínas de baja densidad; pd: pequeñas y densas; TG: triglicéridos; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

En el estudio BOTNIA, realizado en una población de 2.500 pacientes con DM2, alrededor del 50% de los sujetos presentaron concentraciones de triglicéridos superiores a 150 mg/dl y un 25% por encima de 200 mg/dl. Asimismo, el 84% de los varones y el 88,7% de las mujeres presentaron niveles de cLDL superiores a 100 mg/dl [23]. Otro estudio clásico como el de Framingham

evidenció que la prevalencia de hipercolesterolemia (> percentil 90) en varones y mujeres no diabéticos (9 y 15%, respectivamente) era similar a la de los sujetos con DM2 (11 y 16%, respectivamente), mientras que la frecuencia de hipertrigliceridemia (> percentil 90) y cHDL bajo (< percentil 10) sí era más del doble entre los sujetos diabéticos (18 y 23%, respectivamente) respecto a los no diabéticos (8,5 y 11%, respectivamente) [24]. Datos muy similares se publicaron posteriormente en el estudio UKPDS, a excepción de una mayor concentración de colesterol total y cLDL en las mujeres con DM2, respecto a las mujeres sin diabetes (225 ± 44 mg/dl vs 213 ± 43 mg/dl y 151 ± 43 mg/dl vs 139 ± 39 mg/dl, respectivamente) [25].

Datos más recientes publicados en nuestro medio sobre un total de 286.791 sujetos con DM2 en la práctica clínica habitual, muestran que las concentraciones medias de triglicéridos eran de $156,2 \pm 105$ mg/dl, siendo en el 60,4% de los sujetos superiores a 150 mg/dl y en el 20,3% superiores a 200 mg/dl, aunque sólo el 4,5% recibían tratamiento con fibratos. En cambio, el 45,3% de pacientes recibían tratamiento con estatinas y las concentraciones de cLDL evidencian una mejoría respecto a los estudios previos. Así, un 62,1% de sujetos con DM2 (58,7% en hombres y 65,8% en mujeres) presentaban unas concentraciones superiores a 100 mg/dl de cLDL, pero tan sólo un 27,6% tenían niveles superiores a 130 mg/dl, siendo el promedio de $112,5 \pm 32,4$ mg/dl. Las concentraciones medias de cHDL fueron de $49,3 \pm 13,2$ mg/dl ($46,2 \pm 12,3$ mg/dl en varones y $52,7 \pm 13,4$ mg/dl en mujeres), siendo inferiores a 40 mg/dl en el 21% de los hombres e inferiores a 50 mg/dl en el 30% de las mujeres [26].

2.3 Dislipemia aterogénica y riesgo cardiovascular en el paciente con DM2:

Como ya hemos indicado, dentro de los parámetros clásicos, el cLDL es el más potente predictor de enfermedad coronaria en los pacientes con DM2, incluso a concentraciones inferiores a 130 mg/dl, y es el principal objetivo terapéutico en el manejo de la dislipemia por las amplias evidencias en estudios experimentales, epidemiológicos y de intervención. Los resultados de los grandes estudios epidemiológicos prospectivos como el Framingham Heart Study y otros demuestran una relación lineal y curvilínea entre los niveles séricos de colesterol total y cLDL y la incidencia y mortalidad por cardiopatía isquémica [27] (**figura 6**, adaptada de Castelli [28]).

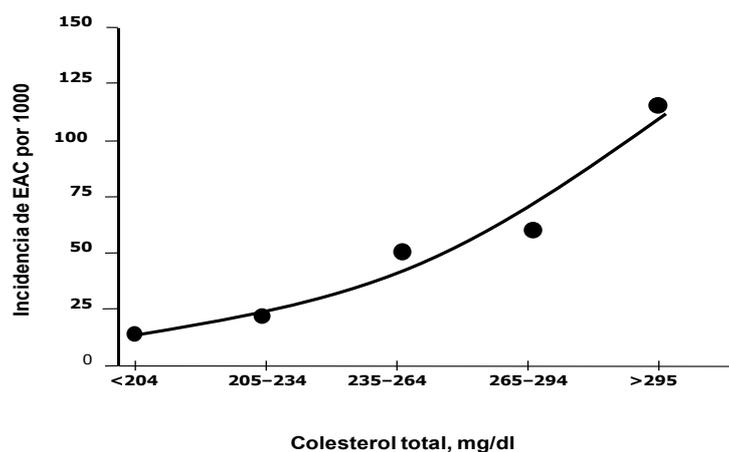


Figura 6: Relación entre el colesterol total y el riesgo de enfermedad arterial coronaria: Estudio Framingham. EAC: enfermedad arterial coronaria.

Disponemos además de amplia evidencia que establece de forma concluyente que la disminución del colesterol total y del cLDL se asocia con significativos descensos de la incidencia y la mortalidad por cardiopatía isquémica y enfermedad cardiovascular en general, tanto en prevención primaria como secundaria. Así, los estudios WOSCOPS (The West of Scotland Coronary Prevention Study) [29], AFCAPS (Air Force Coronary Atherosclerosis Prevention Study) [30], ALLHAT (The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial) [31] y CARDS (Collaborative Atorvastatin Diabetes Study) [32], realizados con distintos tipos de estatinas muestran resultados similares en cuanto a la reducción de la mortalidad coronaria y aparición de eventos coronarios mayores, en pacientes sin historia cardiovascular previa, pero con factores de riesgo cardiovascular como la DM2, la hipertensión arterial o el tabaquismo. Asimismo los estudios 4S (The Scandinavian Simvastatin Survival Study) [33] y LIPID (The Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease Study) [34], realizados sobre población afecta de cardiopatía isquémica y tasas de DM2 entre un 4,5-14,5%, muestran una reducción significativa de la mortalidad coronaria y de aparición de infarto agudo de miocardio con simvastatina o pravastatina respectivamente. También más recientemente, se han publicado varios estudios en los que el tratamiento con rosuvastatina ha demostrado una reducción en la progresión de la íntima media carotídea en pacientes de bajo riesgo (METEOR: the Measuring Effects on Intima-Media Thickness: an Evaluation of Rosuvastatin) [35], e incluso, una regresión de la placa de aterosclerosis en las arterias coronarias (ASTEROID: A Study to Evaluate the Effect of Rosuvastatin on Intravascular Ultrasound-Derived Coronary Atheroma Burden) [36]. De todos modos, el estudio JUPITER (Justification for the Use of statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin), en el que se incluyeron pacientes sin antecedentes de enfermedad

cardiovascular, con niveles de cLDL bajos y que presentaban un riesgo elevado únicamente por tener valores de PCR $\geq 2\text{mg/l}$, va más allá [37]. No sólo demuestra que al administrar rosuvastatina a pacientes aparentemente sanos, se reducen los valores de cLDL, PCR, triglicéridos y cHDL, comparado con el grupo placebo, sino también se reduce el riesgo de aparición de un primer evento cardiovascular mayor, de mortalidad total y de tromboembolismo venoso a los 2 años de seguimiento. Por tanto, este estudio sugiere que los niveles de PCR pueden ser útiles en la selección de los pacientes que se beneficiarían del tratamiento con estatinas y que podrían haber candidatos al mismo sin alteraciones del perfil lipídico.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los estudios con estatinas refuerzan el papel del cHDL bajo y de la hipertrigliceridemia como factores de riesgo cardiovascular independientes. El metaanálisis de 14 ensayos clínicos con estatinas del CTT (Cholesterol Treatment Trialists' Collaborators) [38], mostró que la presencia de cHDL bajo y/o triglicéridos elevados aumentan de forma considerable el riesgo cardiovascular. Además, aún cuando los niveles de cLDL alcanzados son $< 70\text{ mg/dL}$, la existencia de concentraciones de cHDL $< 35\text{ mg/dL}$ (estudio TNT: Treating to New Targets) [39] o de triglicéridos $> 200\text{ mg/dL}$ (estudio PROVE IT-TIMI 22: The Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy–Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Trial) [40] limita la reducción del riesgo cardiovascular, persistiendo un riesgo hasta un 40% superior en presencia de estas alteraciones. Esto sugiere que el tratamiento limitado al cLDL no consigue una reducción óptima del riesgo cardiovascular.

Así, los estudios epidemiológicos han establecido que la concentración del cHDL es un factor predictor independiente de la incidencia de enfermedad coronaria, tanto en pacientes con diabetes como sin diabetes. Se estima que por cada 1 mg/dl ($0,03\text{ mmol/l}$) que aumenta la concentración de cHDL, se reduce el riesgo de enfermedad coronaria en un 2-3% [41]. Aunque es difícil separar el efecto del aumento del cHDL de la reducción de los triglicéridos, los estudios de intervención que logran un aumento sostenido del cHDL sugieren un efecto beneficioso del mismo sobre el riesgo cardiovascular [42].

El reconocimiento del papel independiente de los triglicéridos como predictor del riesgo cardiovascular es más reciente. Un metaanálisis de Sarwar y col. que incluye 29 estudios prospectivos (262.525 participantes; 10.158 con enfermedad coronaria) mostró que la hipertrigliceridemia estaba asociada de forma independiente con el riesgo coronario. La *odds ratio* ajustada para otros factores de riesgo fue de 1,72 (95% CI, 1,56-1,90) en los sujetos del tercil más alto (corresponde a $> 178\text{ mg/dL}$) frente a los del tercil más bajo (corresponde a $< 115\text{ mg/dL}$) de triglicéridos [43]. En los pacientes con DM2, la hipertrigliceridemia también es predictor de enfermedad coronaria y mortalidad en numerosos estudios. Los estudios de intervención en los

que existe un descenso de los triglicéridos muestran una disminución del riesgo de enfermedad coronaria y de la mortalidad. Así, se han realizado varios estudios randomizados para evaluar el efecto de los fibratos sobre la prevención primaria y secundaria de eventos cardiovasculares. El Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT) incluyó a 2.283 hombres con enfermedad coronaria establecida, niveles aceptables de cLDL (111 mg/dL), disminuidos de cHDL (32 mg/dL) y elevados de triglicéridos (161 mg/dL), a los que se les administró gemfibrocilo versus placebo y se les siguió durante 5 años [42]. Demostró que el tratamiento con gemfibrocilo disminuía el riesgo de nuevos eventos coronarios fatales o no fatales en un 22%, a pesar del modesto incremento de un 5% de cHDL, sobretodo a expensas de cHDL 3 (subfracción de HDL con una relación de lípidos/proteínas inferior y, por tanto, más densa, con más capacidad antiaterogénica y antioxidante). También se observó que los pacientes que presentaron mayor tasa de eventos cardiovasculares fueron aquellos con valores basales más bajos de cHDL, cifras superiores de triglicéridos y aquellos que tenían DM2 o hiperinsulinemia. En el estudio FIELD (Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes Study) realizado sobre población diabética con o sin cardiopatía isquémica, se les randomizó a seguir tratamiento con fenofibrato versus placebo durante 5 años [44]. Se observó una reducción no significativa del 11% en el objetivo primario (evento cardíaco fatal o no fatal) ($p=0,16$). No obstante, el total de eventos cardiovasculares correspondientes al objetivo secundario, se redujeron de forma estadísticamente significativa en el grupo tratado con fenofibrato en un 11%, sobretodo por disminución en la aparición de infartos agudos de miocardio no fatales y en la revascularización coronaria. Los efectos del tratamiento fueron mayores en los pacientes sin historia cardiovascular previa. Además, ajustando los resultados por la coadministración de estatinas, se evidenció igualmente una reducción del riesgo de eventos cardíacos estadísticamente significativa (19%). Finalmente, el estudio ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes) Lipid, primer gran ensayo clínico que compara los efectos cardiovasculares de la terapia combinada de fibratos y estatinas frente a la monoterapia con estatinas en pacientes con DM2, mostró que la terapia combinada comparada con simvastatina no redujo de forma significativa el objetivo primario combinado de mortalidad cardiovascular, infarto no fatal o ictus no fatal [45]. Igualmente, la terapia combinada tampoco redujo la incidencia de ninguno de los eventos previos por separado ni la de ninguno de los demás objetivos secundarios preespecificados (mortalidad total, ictus fatal, revascularización u hospitalización por insuficiencia cardíaca). Sin embargo, en el subgrupo pre-especificado de pacientes con DM2 y dislipemia aterogénica (triglicéridos ≥ 204 mg/dL y cHDL ≤ 34 mg/dl), el aumento del cHDL (12,9% frente a 7,3%) y la reducción de los triglicéridos (35% frente a 24,1%) fue superior que en la globalidad de los pacientes que recibieron fenofibrato. Además, el riesgo de desarrollar un episodio cardiovascular en este subgrupo fue comparable al existente en las personas con enfermedad cardiovascular previa (17,3% frente a 18,1%), tuvieron un 70% más de episodios cardiovasculares que el resto de pacientes (10,1%) y el tratamiento combinado con

simvastatina-fenofibrato consiguió reducir la tasa de episodios cardiovasculares un 31% en comparación con la simvastatina sola ($p = 0,057$). Así, los resultados de los estudios prospectivos indican que el tratamiento con fibratos reduce el riesgo cardiovascular en algunos estudios, pero no en otros. Sin embargo, el efecto beneficioso es unánime cuando se analizan los subgrupos de pacientes con DM2 y/o síndrome metabólico con dislipemia aterogénica. No obstante, en la mayor parte de estos estudios existen otros cambios lipídicos asociados, como el descenso del cLDL o el aumento del cHDL, que dificultan la interpretación de los resultados.

Por otro lado, el estudio INTERHEART mostró que la relación ApoB/ApoA-I, como medición surrogada del cociente LDL/HDL, era la variable con mayor poder predictivo para el desarrollo de infarto agudo de miocardio, hallazgo que sugiere que la intervención conjunta sobre el cHDL y el cLDL, tiene relevancia clínica [9]. También existen datos que sugieren que el predominio de las partículas de LDL pequeñas y densas aumenta el riesgo de enfermedad coronaria. En el Framingham Offspring Study se observó que la concentración de partículas de LDL pequeñas y densas era un mejor marcador de riesgo cardiovascular que la concentración total de cLDL [46]. No obstante, este fenotipo de distribución de las LDL suele acompañarse de otras alteraciones asociadas con riesgo cardiovascular, por lo que está por clarificar si constituye un factor de riesgo independiente. Finalmente, los fenotipos de dislipemia con aumento de la ApoB se acompañan de un riesgo cardiovascular equivalente al de los fenotipos con hipercolesterolemia, y el colesterol-noHDL (c-noHDL) y la ApoB son predictores más potentes de la incidencia de enfermedad cardiovascular que el cLDL en los hombres con DM2. Además, las concentraciones de la apoB son el mejor predictor de progresión de aterosclerosis coronaria en pacientes que reciben tratamiento hipolipemiante [47;48].

No obstante, en la DM2, además de las alteraciones cuantitativas de las lipoproteínas, existen alteraciones cualitativas de las partículas LDL y HDL, que pueden ser tanto estructurales como funcionales, y que pueden contribuir al mayor riesgo cardiovascular. Las partículas de HDL presentan una actividad antiaterogénica disminuida debido, por un lado, a una alteración en sus características físico-químicas, especialmente por el enriquecimiento en triglicéridos y la deplección en ésteres de colesterol [49] (subfracción HDL 2), y por otro lado, a una modificación en la unión a enzimas como la paraoxonasa/arilesterasa 1 (PON1) y la fosfolipasa A2 asociada a las lipoproteínas (Lp-PLA2), que le reducirán su capacidad antioxidante. PON1 está unida exclusivamente a HDL y tiene una función antioxidante al inactivar los lipoperóxidos transportados en las lipoproteínas. En cambio, la Lp-PLA2, también conocida como actividad acetilhidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH), puede unirse a HDL, LDL y VLDL y tiene una función anti o proinflamatoria, según su distribución relativa en las distintas lipoproteínas. Sin embargo, las partículas de LDL, especialmente las pequeñas y densas, presentan mayor proporción de formas

modificadas como la LDL glicada (LDLgl), la LDL oxidada (LDLox) y la LDL electronegativa (LDL(-)), con respecto a los sujetos normoglicémicos [50-52], que les confieren un mayor poder aterogénico y proinflamatorio [53].

3 INFLAMACIÓN Y DM2:

Múltiples estudios epidemiológicos han demostrado que en la DM2, igual que sucede en otras patologías como la obesidad o el síndrome metabólico, hay niveles aumentados de diversos marcadores inflamatorios [54], que le confieren un estado crónico de inflamación de bajo grado y, como consiguiente, un aumento del riesgo cardiovascular [55]. La inflamación sistémica de bajo grado se caracteriza por un incremento de 2 a 3 veces en la concentración sistémica de las citocinas plasmáticas, tales como el TNF- α , la IL-6 y la PCR. Otras moléculas como el factor transformante del crecimiento beta (TGF- β) [56], la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1) [57;58] o la Lp-PLA2 [59] también se encuentran en concentraciones elevadas en los sujetos con DM2.

La inflamación sistémica de bajo grado, además de su implicación en el aumento del riesgo cardiovascular [55], también se ha postulado como un factor importante adicional en la patogénesis de la insulinoresistencia, la IOG y la DM2. Algunos autores incluso han sugerido que la inflamación podría ser un componente del síndrome metabólico. Ahora bien, a pesar de que se han estudiado ampliamente múltiples marcadores inflamatorios, las asociaciones con la DM2 son variables y, a menudo, inconsistentes.

Como se ha comentado anteriormente, la predisposición genética asociada a una ingesta calórica excesiva y a una falta de ejercicio físico, pueden contribuir a la aparición de obesidad y adiposidad central. Ésta suele provocar una disfunción del tejido adiposo por infiltración por parte de los macrófagos, lo que conlleva una alteración en la secreción de citocinas [6]. La elevación crónica de estas citocinas proinflamatorias promueve la insulinoresistencia a nivel del músculo esquelético [60] y disfunción endotelial a nivel vascular [61], así como la secreción de reactantes de fase aguda desde el hígado, como la PCR [62]. El estado de hiperglucemia induce la producción de citocinas desde el endotelio y los macrófagos, y éstas producen un empeoramiento de la liberación de insulina y de las cascadas de señalización de la misma [63]. Incluso parece que los picos de hiperglucemia aumentan más la concentración de citocinas proinflamatorias que una hiperglucemia constante [64]. Por otro lado, se ha sugerido que la insulina tiene propiedades antiinflamatorias, a través de la inhibición de la expresión génica de citocinas [65], y que la insulinoresistencia incrementaría también los niveles de los biomarcadores de inflamación al atenuar este efecto [66]. Todo esto sugiere que la mejoría del control glucémico podría reducir el estado inflamatorio, apoyando el vínculo entre la inflamación y las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado. De todos modos, la correlación entre los parámetros inflamatorios y el control glucémico es significativo en algunos estudios [67;68], pero no en otros [69], y la información disponible acerca del efecto que tiene la mejoría del control glucémico sobre los biomarcadores

inflamatorios es todavía escasa [70;71]. Sin embargo, existen estudios que confirman que los cambios en el estilo de vida y determinados fármacos como las estatinas, los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II) y las glitazonas tienen un efecto beneficioso sobre los biomarcadores inflamatorios [72-75]. También un metaanálisis reciente en el que se incluyeron hasta 824 pacientes con DM2 demostró que el ejercicio físico reducía parámetros inflamatorios como la PCR y la IL-6 [76].

Las citocinas inflamatorias se sabe que son producidas por varios tipos de células y secretadas al torrente circulatorio, donde regulan los diferentes tejidos a través de sus acciones locales, centrales y periféricas. Son proteínas de pequeño tamaño (25 kDa), sintetizadas en respuesta a un estímulo activador y que inducen respuestas a través de la unión a receptores específicos. El tejido adiposo produce muchas moléculas proinflamatorias, que se denominan adipocinas, entre las que se incluyen la PCR, el TNF- α , la adiponectina, el TGF- β y la IL-6. Se han implicado en la insulinresistencia, sobretodo por estudios "in vitro" y estudios animales, pero también parece que tienen un papel importante en la promoción de arteriosclerosis y, como consecuencia, de la enfermedad cardiovascular [77]. A continuación, se resumirán los principales biomarcadores inflamatorios implicados en la DM2.

3.1 Proteína C reactiva (PCR):

La PCR es el biomarcador inflamatorio que se ha estudiado más ampliamente. Es una citocina sintetizada principalmente en el hígado tras el estímulo de IL-6 y TNF- α , pero que también puede ser sintetizada por adipocitos maduros tras un estímulo inflamatorio. La PCR aumenta la producción de las moléculas de adhesión intracelular tipo 1 (ICAM-1) y de citocinas proinflamatorias (IL-6, MCP1) por parte de las células endoteliales, las cuales están involucradas en el desarrollo de arteriosclerosis. Es por este motivo que concentraciones elevadas de PCR se han asociado a enfermedad coronaria, DM2, tabaquismo y sedentarismo, y de hecho, es conocido que los individuos diagnosticados de DM2 con niveles elevados de PCR tienen mayor riesgo cardiovascular [78]. También se han observado niveles elevados de PCR en sujetos obesos que se reducen paralelamente a la reducción de la adiposidad, y a la mejora de la sensibilidad a la insulina tras perder peso con cirugía bariátrica [66].

La PCR además estimula a monocitos y macrófagos a expresar el factor tisular, un potente procoagulante, y activa el complemento cuando se agrega. Estudios *in vitro* han demostrado que la PCR agregada se une a partículas de LDL y VLDL, promoviendo así una activación del

complemento y del inicio de la cascada de la coagulación, lo que explicaría en parte la conexión entre enfermedad cardiovascular y PCR [79].

Por otro lado, los motivos por los que la PCR determinada por métodos ultrasensibles emergió como un biomarcador en la práctica clínica habitual fueron su vida media larga y su estabilidad a lo largo del tiempo en sujetos sin infecciones agudas ni enfermedades inflamatorias [80]. De hecho, numerosos estudios han demostrado que es un predictor de riesgo y de enfermedad cardiovascular, incluso más potente que el cLDL [81]. Los resultados del ensayo clínico randomizado JUPITER ilustran este punto, dado que se observó una reducción del 44% de los eventos cardiovasculares en aquellos sujetos DM2 con cLDL < 130 mg/dl y PCR > 2 mg/l a los 2 años de recibir tratamiento con rosuvastatina [37]. Además, se sabe que existe una correlación significativa entre la PCR y determinadas características del síndrome metabólico, incluyendo la adiposidad, la hiperinsulinemia, la insulinoresistencia, la hipertrigliceridemia y el cHDL bajo [82-84]. Según múltiples estudios observacionales los sujetos con DM2 también presentan niveles elevados de PCR [85-87]. Además, en estos sujetos con DM2, los cambios en el estilo de vida y el tratamiento con estatinas han demostrado un efecto beneficioso sobre la reducción de PCR [73;74;88]. Por otro lado, es también conocido que hay una relación entre la PCR y el mal control glucémico en sujetos con DM2 [89] y, que la reducción de la HbA_{1c} está relacionada con un descenso de la PCR en estos sujetos [90].

3.2 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α):

El TNF- α es producido por macrófagos, células *natural killer* y linfocitos T. En el tejido adiposo, los macrófagos infiltrados son los que sintetizan TNF- α . En sujetos obesos éste es producido 7,5 veces más en el tejido adiposo, principalmente el visceral, que en los sujetos delgados. TNF- α tiene un papel importante en el proceso inflamatorio y de activación endotelial, de tal forma que a elevadas concentraciones puede promover la síntesis de interleucinas como la interleucina-8 (IL-8), IL-6 y MCP1, que contribuirían a la progresión de la arteriosclerosis [91]. El aumento crónico de TNF- α también está implicado en la obesidad y en las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado, de modo que puede reducir la sensibilidad a la insulina a través de varios mecanismos [92], como serían la atenuación de las vías de señalización del receptor de la insulina [61], la disminución del transportador de glucosa 4 en los adipocitos [92] y la supresión de la acción de la adiponectina [93].

Algunos estudios también han demostrado que la concentración plasmática de TNF- α se correlaciona positivamente con el índice de masa corporal y con los niveles de triglicéridos,

probablemente por un incremento de la concentración de AGL a través de la estimulación de la lipólisis [94], y negativamente con los niveles de cHDL [95].

3.3 Adiponectina:

La adiponectina es una proteína que se secreta mayoritariamente por los adipocitos del tejido adiposo, sobretodo del visceral, con características antiinflamatorias [96], anti-ateroscleróticas e insulinsensibilizadoras [97]. Paradójicamente, hay varios estudios que sugieren que la grasa de los omentos podría estar más implicada en los niveles de adiponectina circulante que la grasa subcutánea abdominal. Así, una reducción de este tejido se ha asociado a un aumento de la adiponectina [98], igual que a una mayor sensibilidad a la insulina y a un menor riesgo cardiovascular. Además, se ha descrito que una reducción superior al 10% del peso corporal total con dieta se asociaría a un incremento en la concentración de adiponectina [99]. En cambio, los estudios con ejercicio físico no han demostrado una clara modificación en las concentraciones de adiponectina [100]. Se sabe que esta citocina produce, vía inhibición de la enzima acetil-CoA carboxilasa, un aumento de la oxidación de los ácidos grasos. Esta oxidación de los AGL del músculo esquelético reduce el paso de AGL hacia el hígado, permitiendo una disminución de la síntesis de triglicéridos en este órgano y de la secreción de cVLDL [101]. Además esto se asocia a una reducción de la concentración de AGL en los tejidos periféricos, reduciéndose así la lipotoxicidad [102]. La adiponectina también reduce la producción hepática de glucosa por inhibición directa de las enzimas neoglucogénicas fosfenolpiruvato carboxicinas y glucosa-6 fosfato, mejorando así el control glucémico y la sensibilidad a la insulina [103].

Por el contrario, estudios epidemiológicos han demostrado que en la obesidad y la DM2 las concentraciones de adiponectina están disminuidas [104;105]. Esto es debido fundamentalmente a que en ambas patologías hay una disfunción del tejido adiposo por infiltración de los macrófagos, que produce una liberación de IL-6 y el TNF- α , citocinas que por su parte también reducen la expresión de adiponectina [106]. También se sabe que las concentraciones de adiponectina son inferiores en sujetos sanos que desarrollan DM2 respecto a los que no la desarrollan [107].

3.4 Factor transformante del crecimiento beta 1 (TGF- β_1):

TGF- β_1 pertenece a un grupo de factores responsables del crecimiento, diferenciación y migración celular, creación y degradación de matriz extracelular, y apoptosis [108]. De esta familia, TGF- β_1

es el mejor estudiado. Se sabe que es producido por células dendríticas, leucocitos y *natural Killer* y que estimula la formación de vasos sanguíneos y participa en la cicatrización de heridas y la reparación mediante el aumento de la producción de proteínas de la matriz extracelular, por lo que se considera un factor pro-fibrótico [109].

Concretamente en los riñones, TGF- β_1 puede activar la producción de matriz extracelular por parte de las células mesangiales y los fibroblastos intersticiales. Se ha observado que en los sujetos con DM2, TGF- β_1 se elimina a nivel renal, mientras que no se detecta excreción renal en sujetos sanos sin DM2 [110]. Además, también se ha demostrado que la expresión y actividad de TGF- β_1 en las células mesangiales está directamente influenciada por los niveles de glucosa [111] y que los pacientes con DM2 y nefropatía diabética tienen mayor expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del TGF- β_1 que aquellos sin nefropatía [112]. Por tanto, este factor de crecimiento probablemente contribuye a la manifestación de la enfermedad renal en la DM2, en la que se acaba produciendo una reducción del filtrado glomerular y un empeoramiento de la función renal [113;114].

También hay algunos estudios que demuestran que TGF- β_1 se encuentra elevado en pacientes con síndrome metabólico [115].

3.5 Interleucina-6:

Es una citocina proinflamatoria secretada predominantemente por los macrófagos estimulados, los fibroblastos y las células endoteliales, pero también por el tejido adiposo. Aunque la IL-6 se ha implicado en la patogénesis de la insulinoresistencia, los datos publicados son contradictorios. Así, algunos estudios van a favor de que en la DM2 se encuentran niveles elevados de IL-6, los cuales se correlacionan con los niveles de HbA_{1c} [116] y la progresión de la nefropatía diabética [117]. IL-6 también se ha estudiado en sujetos sanos. Así, un metaanálisis publicado recientemente que incluye 22 trabajos concluye que existe asociación entre los niveles de IL-6 y el riesgo de presentar DM2 y que es un factor predictor para el desarrollo de esta enfermedad, tanto en hombres como en mujeres [86].

3.6 Otras citocinas proinflamatorias:

A pesar de que el marcador de inflamación que más se ha estudiado es la PCR, otras moléculas como el fibrinógeno, dímero D, interleucina-1b (IL-1b), moléculas de adhesión, proteína sérica

amiloide A (SAA) o varias fosfolipasas presentan concentraciones séricas aumentadas en patologías asociadas a elevado riesgo cardiovascular [54;56-58;118]. Así por ejemplo, la Lp-PLA2 se ha asociado a un riesgo cardiovascular aumentado en población general y diabética [59;119;120]. Se ha sugerido que la distribución relativa de Lp-PLA2 entre LDL y HDL determina su acción pro o antiinflamatoria. De acuerdo con este supuesto, Lp-PLA2 en HDL sería antiinflamatoria, mientras que Lp-PLA2 unida a LDL sería proinflamatoria [121]. Por esta razón, la distribución relativa de Lp-PLA2, más que su actividad total, podría ser un mejor marcador de riesgo cardiovascular. Así, en los sujetos con DM2 parece que su distribución entre las lipoproteínas está alterada, de forma que en estos sujetos la Lp-PLA2 presentaría una mayor unión a las partículas LDL pequeñas y densas y LDL(-) y una menor unión a las partículas de HDL [122].

Por otro lado, se acepta generalmente que el estado proinflamatorio sistémico en pacientes con patología ateromatosa es debido a la expresión y liberación de mediadores inflamatorios desde las áreas de lesión a la circulación sanguínea. Sin embargo, además de los mediadores inflamatorios originados en la pared arterial, diversas moléculas circulantes pueden tener un papel relevante en la aparición de un estado sistémico proinflamatorio. Numerosas evidencias experimentales indican que las lipoproteínas son unas de estas moléculas. De manera general, se considera que las partículas de LDL juegan un papel proaterogénico y también proinflamatorio, mientras que las partículas de HDL son antiaterogénicas y además antiinflamatorias. El balance entre las propiedades pro y antiinflamatorias de las lipoproteínas depende de una serie de interrelaciones extremadamente complejas, donde juegan un papel determinante, no sólo las concentraciones absolutas de ambas lipoproteínas, sino también su concentración relativa (LDL/HDL).

Sin embargo, más allá de la relación LDL/HDL, los factores de tipo cualitativo son fundamentales para comprender la relación lipoproteínas-inflamación-arteriosclerosis. Por una parte el grado de modificación de las lipoproteínas que determina la mayor o menor presencia de diferentes lípidos, oxidados o no; por otra parte, la existencia de diferentes actividades enzimáticas asociadas total o parcialmente a las diferentes lipoproteínas que modulan, desactivando o generando, la presencia de estos lípidos inflamatorios. Algunas modificaciones de las LDL (LDL pequeñas, LDLox, LDLgl y LDL(-)) que son típicas de la DM2, se consideran proinflamatorias, aunque el papel sobre el estado inflamatorio sistémico aún no ha sido claramente establecido. Por otro lado, las partículas HDL tienen un efecto protector frente al riesgo cardiovascular. Además del papel de la HDL en el transporte reverso de colesterol, otro importante mecanismo de protección frente al riesgo cardiovascular es la inhibición de la oxidación de la LDL; éste es un mecanismo antiinflamatorio indirecto. La HDL transporta el enzima PON1 que juega un papel clave en la eliminación de los lipoperóxidos transportados en las lipoproteínas. Precisamente, la HDL es el principal reservorio

plasmático de lipoperóxidos y el lugar donde éstos son inactivados. Además, otros enzimas con actividad antioxidante como la Lp-PLA2, la lecitin-colesterol acil transferasa (LCAT) y la glutatión peroxidasa (Gpx) se encuentran presentes en la HDL. Estos enzimas confieren a la HDL una clara función antiinflamatoria inhibiendo la formación de productos de peroxidación lipídica, siendo la Lp-PLA2 la que tiene mayor relevancia fisiológica.

4 CONTROL GLUCÉMICO EN LA DM2:

4.1 Objetivos de control y situación actual en nuestro entorno:

Numerosos estudios han demostrado que la aparición de complicaciones microvasculares dependen principalmente del grado de control metabólico, mientras que las macrovasculares dependen sobretodo de la intensidad del control del resto de factores de riesgo cardiovascular. [123-125]. Asimismo, la reducción del riesgo cardiovascular como consecuencia del control glucémico es un tema de continua discusión e investigación. Estudios epidemiológicos han sugerido una relación entre el control glucémico y los eventos cardiovasculares; sin embargo, los resultados de estudios de intervención han sido menos concluyentes. El estudio UKPDS demostró el efecto del control glucémico intensivo sobre la reducción de las complicaciones microvasculares, pero sólo consiguió una reducción del 16% en el riesgo de infarto agudo de miocardio, que no llegó a ser estadísticamente significativa ($p=0,052$) [126]. Tampoco los resultados del estudio Kumamoto fueron del todo concluyentes [127]. En este estudio, la intensificación del tratamiento insulínico en una población de 110 pacientes japoneses con DM2, se asoció con una reducción significativa de las complicaciones microvasculares. También se observó una reducción del 50% de los eventos cardiovasculares a los 8 años, que aún siendo significativa, no permitió extraer grandes conclusiones dado que el número absoluto de eventos fue muy pequeño. Después, el estudio PROactive (The PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events) [128], en el que la adición de pioglitazona al tratamiento hipoglucemiante previo en un subgrupo de sujetos con DM2 y elevado riesgo cardiovascular mejoró la HbA_{1c}, pero tampoco consiguió hallar cambios en el end point primario (combinación de eventos cardiovasculares, mortalidad y otros). Posteriormente, llegaron los resultados de los grandes estudios ACCORD [129], ADVANCE (Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicon MR Controlled Evaluation) [130] y VADT (Veterans Affairs Diabetes Trial) [131], que se publicaron de forma consecutiva a lo largo de los años 2008 y 2009. En los 3 estudios se analizaron casi 25.000 sujetos con DM2 a los que se randomizó a realizar un tratamiento hipoglucemiante intensivo versus un tratamiento convencional, de cara a valorar si una HbA_{1c} inferior a 7% podía reducir el riesgo cardiovascular. Pero no sólo no se observó una reducción del riesgo cardiovascular, sino que además el estudio ACCORD se tuvo que interrumpir prematuramente por evidenciarse un exceso de mortalidad en el grupo de tratamiento intensivo, probablemente en relación a una mayor tasa de hipoglucemias severas. No obstante, en el subgrupo de pacientes sin historia de enfermedad cardiovascular previa, el tratamiento intensificado redujo el riesgo de presentar un evento cardiovascular. Igualmente, en el estudio VADT se observó que el riesgo relativo de presentar eventos cardiovasculares en el grupo de

tratamiento intensivo dependía del tiempo de evolución de la diabetes, de tal forma que aquellos sujetos con una DM2 de larga evolución presentaban más eventos cardiovasculares al intensificar el tratamiento. Esto podría explicarse por la memoria metabólica que deja un mal control glucémico de años de evolución, tras los cuales ya han aparecido las complicaciones crónicas. En la **figura 7** (adaptada de Duckworth) se encuentra esquematizada esta hipótesis.

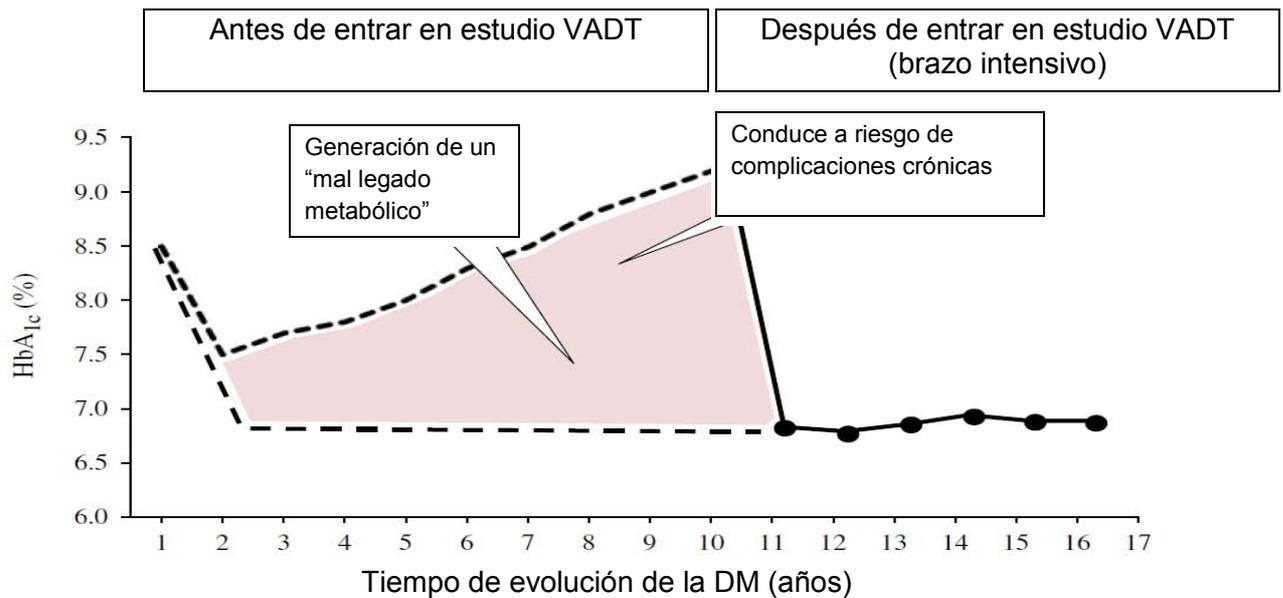


Figura 7: Representación hipotética de la historia natural de los pacientes DM2 reclutados en el estudio VADT. La línea punteada superior representa la evolución de la HbA_{1c} estimada. La línea punteada inferior representa la evolución ideal del control glucémico. La línea continua con puntos representa la evolución de la HbA_{1c} tras entrar en el brazo intensivo del estudio VADT. DM: diabetes mellitus; HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada.

Simultáneamente a estos estudios se publicó también el seguimiento a 10 años del estudio UKPDS. En éste se siguieron parte de los pacientes sin realizar intervención sobre la medicación, únicamente con el propósito de valorar si el efecto del buen control glucémico al debut persistía tras los años. El grupo de sujetos con DM2 originalmente randomizados a recibir tratamiento intensivo, a pesar de haberse perdido las diferencias de HbA_{1c} al año con respecto al grupo de tratamiento convencional, presentaron menor tasa de complicaciones microvasculares y una reducción de los infartos agudos de miocardio (reducción del riesgo relativo del 15%; $p=0,0014$) y de la mortalidad por cualquier causa (reducción del riesgo relativo del 13%; $p=0,007$) [125].

Es, por tanto, a raíz de estos estudios que se habla de la importancia que tiene el control glucémico estricto al debut de la enfermedad, dado que genera una memoria metabólica que confiere cierta protección contra la aparición o progresión de complicaciones crónicas. En cambio, en aquellos sujetos con complicaciones crónicas y mal control metabólico de años de evolución, estos estudios nos confirman que hay menos oportunidades de influir en la evolución de su enfermedad con un control glucémico estricto. Por otro lado, el hecho de que los pacientes con DM2 cada vez tengan mejor controlados el resto de factores de riesgo cardiovascular, hace que resulte más difícil evaluar la reducción del riesgo absoluto atribuible al control glucémico. En este sentido, los resultados del estudio Steno-2 confirman que el control multifactorial en este tipo de pacientes reduce el riesgo de mortalidad cardiovascular en un 53%, con una reducción también de la presencia de complicaciones microvasculares [123].

Acorde con estos datos, las guías más recientes sobre el manejo de la DM2 consideran esencial la individualización tanto del tratamiento como de los objetivos de control glucémico en función de las características de los sujetos. Como normal general, recomiendan la consecución de cifras de $HbA_{1C} \leq 7\%$ o incluso $6,5\%$ en sujetos jóvenes y poco evolucionados, sin presencia de hipoglucemias. En cambio, en aquellos sujetos con DM2 de larga evolución o complicaciones crónicas, los objetivos de control serían más laxos [132;133]. Por otro lado, la ADA recomienda que los sujetos con DM2 mantengan unas cifras de presión arterial $\leq 140/80$ mmHg, niveles de colesterol total ≤ 200 mg/dl, un cLDL ≤ 100 mg/dl en prevención primaria e ≤ 70 mg/dl en prevención secundaria, un cHDL > 50 mg/dl en mujeres y > 40 mg/dl en hombres y unos triglicéridos < 150 mg/dl [134], pero estos objetivos pueden variar en función de las guías clínicas consultadas. Lamentablemente, estudios recientes realizados en España [26;135-137] y otros países [138-141] demuestran todavía una discordancia entre estas recomendaciones y los resultados en la práctica clínica habitual. A pesar de que en el National Health And Examination Survey (NHANES) el porcentaje de pacientes con $HbA_{1C} < 7\%$ aumentó desde un 37% en el período 1999-2002 hasta un 56,8% en 2003-2004, las tasas de control glucémico subóptimo son especialmente altas en individuos con una diabetes de larga evolución o que están en tratamiento con insulina [135;142]. Lo mismo sucede con el resto de factores de riesgo cardiovascular, que una elevada proporción de sujetos con diabetes no consiguen todavía tenerlos controlados. No obstante, también se observa una mejoría desde el estudio NHANES 1999-2002, en que sólo el 7% de los pacientes con DM2 tenían una $HbA_{1C} < 7\%$, las cifras de presión arterial $< 130/80$ mmHg y el cLDL < 100 mg/dl, a los resultados publicados del estudio NHANES 2003-2004, en que este porcentaje había aumentado hasta un 13,2%. En nuestro medio, los datos actuales son similares, de modo que un 12,9% de los sujetos en prevención primaria y un 12,1% de los que se encuentran en prevención secundaria tienen controlados todos los factores de riesgo cardiovascular [26].

4.2 Estrategias terapéuticas en la DM2:

Debido a la evolución de la enfermedad anteriormente descrita, muchos pacientes con DM2 iniciarán tratamiento con cambios en el estilo de vida e hipoglucemiantes orales, pero acabarán teniendo un fracaso terapéutico a los mismos. De este modo, estos sujetos requerirán insulina en algún momento para conseguir los objetivos de control y mantener un adecuado control glucémico. Se calcula que en nuestro medio la proporción de pacientes que ya están insulinizados está en torno al 23,4% de los sujetos con DM2 tratados con medicación hipoglucemiante [26]. Así, muchos de estos pacientes con DM2 iniciarán un tratamiento con monodosis de insulina, pero cuando las glucemias preprandial y/o postprandial no estén correctamente controladas, el siguiente paso será la administración de dos dosis de insulina NPH (Neutral Protamine Hagedorn), NPL (Neutral Protamine Lispro) o premezclas, o bien una pauta con insulina basal y prandial (pauta bolo-basal). Los tratamientos con 2 dosis de insulina NPH/NPL o premezclas se usan para simplificar la terapia con insulina, pero tienen una limitada flexibilidad, requieren una rigidez en los horarios de las ingestas, limitan la posibilidad de ajustar las dosis de insulina y aumentan la posibilidad de sufrir hipoglucemias. Así, a pesar de que muchos pacientes conseguirán un control glucémico adecuado con este tipo de terapia [143], cuando la capacidad secretora de las células beta pancreáticas se pierda y haya un déficit severo de insulina, el control glucémico empeorará y se hará inestable [132;143]. Así pues, como en los sujetos con DM1, la terapia bolo-basal podría estar indicada en aquellos pacientes con DM2 con suficientes años de evolución que presenten un déficit severo de secreción de insulina o que no sean capaces de conseguir y mantener los objetivos de control glucémico con dos o tres dosis de insulina de acción intermedia [132;134]. Múltiples estudios han analizado el tratamiento con múltiples dosis de insulina en sujetos con DM2 y, aunque hay diferencias en la magnitud de la mejoría según los estudios, probablemente debido a las características basales de los pacientes, la superioridad de la terapia bolo-basal en pacientes seleccionados con enfermedad evolucionada, parece demostrada [144-148]. De todos modos, este tipo de tratamiento está infrutilizado, probablemente por el rechazo de los pacientes y de los propios médicos debido a la complejidad del mismo, así como a la información limitada que hay acerca de la factibilidad, especialmente en sujetos ancianos, y la eficacia en pacientes previamente tratados con dos dosis de insulina [145].

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. JUSTIFICACIÓN:

La DM2 es una enfermedad de gran relevancia sanitaria por su elevada prevalencia, la elevada morbimortalidad y los costes sanitarios derivados. Se caracteriza por una resistencia a la insulina, que permanece relativamente estable durante el curso de la enfermedad, y por una pérdida progresiva de la función de la célula beta, que obliga a la adaptación progresiva del tratamiento al estado fisiopatológico de la enfermedad. Por lo tanto, muchos pacientes con DM2 requerirán insulina en algún momento para conseguir y mantener un adecuado control glucémico. Cuando el déficit de insulina es severo, tal como sucede en los sujetos con DM1, la terapia bolo-basal puede ser necesaria en aquellos sujetos con DM2 que no consiguen los objetivos de control con otras pautas de insulina [132]. Sin embargo, este tipo de tratamiento está infrautilizado, probablemente por el rechazo de los pacientes y de los propios médicos debido a la complejidad del mismo, así como a la información limitada que hay acerca de su factibilidad [145]. Probablemente el deterioro del control glucémico observado en los individuos con una DM2 de larga evolución o que están en tratamiento con insulina está relacionado con estos aspectos [135;142;149].

Las enfermedades cardiovasculares constituyen las complicaciones más prevalentes en los pacientes con DM2 y son las que se asocian con mayor morbi-mortalidad. Los mecanismos responsables del desarrollo acelerado de arteriosclerosis en los pacientes con DM2 no se conocen con precisión, pero tanto la dislipemia aterogénica y la inflamación de bajo grado características de esta población están implicados.

El grado de control glucémico afecta a las características cuantitativas y cualitativas de las partículas de LDL y HDL y la inflamación sistémica de bajo grado parece depender en parte del grado de control glucémico. Estudios previos de nuestro grupo y otros, muestran que la hiperglucemia, la lipoperoxidación y la inflamación sistémica de la DM2 favorecen la formación de formas modificadas de LDL, como la LDL^{gl}, la LDL^{ox} y la LDL(-) y que éstas son más aterogénicas y tienen mayor acción proinflamatoria sobre las células endoteliales [150-153]. Uno de los mecanismos del efecto antiaterogénico de las partículas HDL es su acción antiinflamatoria, siendo el principal reservorio plasmático de lipoperoxidos y el lugar donde éstos son inactivados. La DM2 altera la función normal de las partículas de HDL, debido tanto a cambios en su composición relativa de lípidos y proteínas, como a modificaciones en su unión a enzimas como PON1 o Lp-PLA2 [154;155].

La información sobre la relación del grado de control glucémico con las características cualitativas de las partículas de LDL y HDL es escasa y se desconoce el efecto que puede tener la

optimización del control glucémico sobre las características cualitativas de las partículas de LDL y HDL y la distribución de Lp-PLA2 entre estas lipoproteínas. A diferencia de lo que ocurre con los cambios en el estilo de vida [156] y ciertos fármacos como las estatinas [73;74], los antagonistas del receptor de la angiotensina y las glitazonas [72], los estudios que tratan de determinar la correlación entre los parámetros inflamatorios y el control glucémico no son del todo concluyentes [67-69], y la información existente acerca del efecto que tiene la mejoría del control glucémico sobre los parámetros inflamatorios es también escasa [70;71].

Los trabajos desarrollados en esta tesis doctoral se centran en el estudio de la relación del control glucémico y las características cualitativas del perfil lipídico con los biomarcadores de la inflamación en pacientes con DM2, y tratan de determinar los efectos de la optimización del control glucémico sobre dichos parámetros.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Los sujetos con DM2 tienen un estado inflamatorio y unas características de las lipoproteínas desfavorables que contribuyen al mayor riesgo cardiovascular de esta población. Nuestra hipótesis es que la intensificación del control glucémico, además de los beneficios ya conocidos y directamente relacionados con la reducción de la HbA_{1C}, aporta beneficios relacionados con la modificación de los parámetros inflamatorios y los cambios cualitativos en las partículas de LDL y HDL y de la distribución de Lp-PLA₂, que podrían contribuir a disminuir el riesgo cardiovascular en los pacientes con DM2. Ello apoyaría un nexo de unión entre la hiperglucemia, las modificaciones del metabolismo lipídico y los procesos inflamatorios en la DM2.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL:

Estudiar en pacientes con DM2 la relación existente entre las características de esta enfermedad y las alteraciones cualitativas de las LDL y HDL con los biomarcadores de la inflamación, y evaluar el efecto del control glucémico sobre las modificaciones de las lipoproteínas y estos biomarcadores.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a. Evaluar en la práctica clínica habitual la factibilidad, eficacia y seguridad de un programa ambulatorio de optimización del control glucémico mediante pauta bolus-basal en pacientes con DM2 de larga evolución y mal controlados con otras pautas de insulina.
- b. Estudiar las modificaciones de las partículas de LDL y HDL en sujetos con DM2 en situación de mal control glucémico.
- c. Determinar el impacto del fenotipo de las lipoproteínas de baja densidad sobre las características cualitativas de las LDL y de las HDL en pacientes con DM2.
- d. Evaluar el efecto de la optimización del control glucémico en estos pacientes sobre el tamaño de las partículas de LDL, la proporción de LDL(-) y la distribución de Lp-PLA2 entre las partículas LDL y HDL.
- e. Determinar la relación entre los biomarcadores de la inflamación y las características clínicas de los pacientes con DM2.
- f. Estudiar la asociación entre los biomarcadores inflamatorios con el fenotipo de las lipoproteínas de baja densidad en pacientes con DM2.
- g. Investigar el efecto de la mejoría del control glucémico en pacientes con DM2 sobre los biomarcadores de la inflamación.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESTUDIOS INCLUIDOS:

En esta tesis doctoral se incluyen los datos y resultados de 3 estudios publicados, que fueron diseñados para dar respuesta a los objetivos mencionados.

1.1 Estudio 1: *“Factibilidad y eficacia de un programa de optimización del control glucémico con pauta de insulina bolo-basal en pacientes con DM2 de larga evolución y mal control glucémico”*.

- **Diseño:** Estudio longitudinal en pacientes con DM2 y mal control glucémico: los pacientes fueron incluidos en un programa de formación en diabetes para inicio de tratamiento con pauta bolo-basal, estructurado y ambulatorio, consistente en 3 sesiones semanales de 2 horas cada una en grupos de 5-8 pacientes. Se les realizó un seguimiento a 3 y 6 meses. Se analizaron los cambios en el control glucémico, antropométricos, del perfil lipídico y de la calidad de vida.
- **Pacientes:** Se incluyeron 37 pacientes con DM2 que, a criterio de su médico habitual, fueron transferidos a una pauta bolo-basal por mal control glucémico ($HbA_{1c} \geq 8,5\%$) o perfil lábil con otras pautas de insulina y que acudieron consecutivamente a la consulta externa de diabetes entre octubre de 2006 y octubre de 2007.

1.2 Estudio 2: *“Características antiaterogénicas de las partículas de HDL y LDL en pacientes con DM2 y mal control glucémico: efecto del control glucémico”*.

- **Diseño:**
 - Estudio transversal en pacientes con DM2 y sujetos control. Se les realizó una valoración clínica en una primera visita y una determinación analítica, analizando las características cuantitativas y cualitativas de los parámetros del perfil lipídico.
 - Estudio longitudinal en pacientes DM2 y con mal control glucémico. Los pacientes fueron estudiados antes y después de optimizar el control glucémico, mediante distintas estrategias terapéuticas, pero sin modificación del tratamiento hipolipemiante. Se analizaron los cambios cuantitativos y cualitativos del perfil lipídico tras la optimización del control glucémico.

- **Pacientes:**
 - Estudio transversal: 122 pacientes con DM2 y mal control glucémico ($HbA_{1C} > 8,5\%$) que acudieron consecutivamente a la consulta externa de diabetes durante los años 2007 y 2008 para optimización del control metabólico. Los criterios de exclusión fueron las infecciones agudas o crónicas, las enfermedades inflamatorias en fase aguda o el tratamiento con fármacos antiinflamatorios y también aquellos que presentaran unos valores de PCR superiores a 20 mg/l. Se seleccionaron además 54 sujetos sanos como grupo control, normoglucémicos y normolipémicos, que no estuvieran bajo tratamiento farmacológico crónico.
 - Estudio longitudinal: subgrupo ($n=42$) de los pacientes incluidos en el estudio transversal con $HbA_{1C} > 8,5\%$ y valores de cLDL normales o casi-normales ($< 3,4$ mmol/l o < 130 mg/dl) de acuerdo a las recomendaciones del National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III [12].

1.3 Estudio 3: *“Estado inflamatorio en los pacientes con DM2 y mal control glucémico: efecto del control glucémico”.*

- **Diseño:**
 - Estudio transversal en pacientes con DM2 y sujetos control. Se les realizó una valoración clínica en una primera visita y una determinación analítica, analizando los parámetros inflamatorios.
 - Estudio longitudinal en pacientes con DM2 y mal control glucémico. Los pacientes fueron estudiados antes y después de optimizar el control glucémico, mediante distintas estrategias terapéuticas, pero sin modificación del tratamiento hipolipemiante. Se analizaron los cambios en los parámetros inflamatorios tras la optimización del control glucémico.
- **Pacientes:**
 - Estudio transversal: 122 pacientes con DM2 y mal control glucémico ($HbA_{1C} > 8,5\%$) que acudieron consecutivamente a la consulta externa de diabetes durante los años 2007 y 2008 para optimización del control metabólico. Los criterios de exclusión fueron las infecciones agudas o crónicas, las enfermedades inflamatorias en fase aguda o el tratamiento con fármacos antiinflamatorios y también aquellos

que presentaran unos valores de PCR superiores a 20 mg/l. Se seleccionaron además 54 sujetos sanos como grupo control, normoglucémicos y normolipémicos, que no estuvieran bajo tratamiento farmacológico crónico.

- Estudio longitudinal: subgrupo (n=42) de los pacientes incluidos en el estudio transversal con HbA_{1c} > 8,5% y valores de cLDL normales o casi-normales (< 3,4 mmol/l o < 130 mg/dl) de acuerdo a las recomendaciones del National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III [12],

Todos los estudios fueron aprobados por el comité ético del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado.

2.METODOLOGÍA:

2.1 Historia clínica:

Se realizó la historia clínica de todos los pacientes con el objetivo de recoger datos acerca de los antecedentes personales y familiares, patologías concomitantes y medicación habitual.

2.2 Recogida de datos y creación de la base de datos:

La recogida de datos se realizó en el momento de la visita de estudio gracias a la creación previa de cuestionarios en papel. A posteriori, se traspasó la información a la base de datos para su posterior explotación con el programa SPSS versiones 15.0 y 16.0 (SPSS.Inc).

2.3 Medidas antropométricas y de tensión arterial:

Se recogieron el peso, la talla y el índice de masa corporal (calculado como $IMC = \text{peso (kg)}/\text{talla (m)}^2$). El perímetro de cintura se midió tomando la circunferencia en el punto medio entre la última costilla y el borde superior de la cresta ilíaca.

La tensión arterial se midió con esfigmomanómetro en 2 ocasiones separadas por 5 minutos y en posición de sedestación tras un descanso de 5 minutos.

2.4 Determinaciones analíticas:

Todas las determinaciones analíticas se realizaron tras ayuno nocturno, tanto para la obtención de la bioquímica general, los parámetros lipídicos y los inflamatorios. Se recogieron en tubos Vacutainer (BD, Franklin Lakes, New Jersey, NJ, EEUU) que contenían ácido etilendiaminotetraacético. El perfil lipídico básico y la analítica general se obtuvieron tras el análisis de muestras frescas. El resto de análisis se realizaron con muestras de plasma conservadas en ácido etilendiaminotetraacético y congeladas a -80°C durante menos de 4 meses. Para minimizar la variabilidad interensayo, las muestras del mismo sujeto se analizaron en la misma tanda experimental.

-Determinación de la HbA_{1C}:

La HbA_{1C} se determinó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC) (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany), con un rango de referencia de 4,6-5,8%.

-Determinación de los parámetros lipídicos:

El perfil lipídico incluyó los triglicéridos, el colesterol total, el cVLDL, el cLDL, el cHDL, los ácidos grasos libres (AGL), la Apolipoproteína B (ApoB), las apolipoproteínas AI (ApoA-I) y AII (ApoA-II). Todos los reactivos se adquirieron de Roche Diagnostics GmbH, basilea, Suiza, excepto los AGL, que fueron de Wako Chemicals, Neuss, Germany y la ApoA-II, que fue de Kamiya, Seattle, USA. El colesterol en las fracciones de lipoproteínas se midió utilizando un método directo para cuantificar cHDL (HDL-C plus; Roche Diagnostics GmbH) o mediante ultracentrifugación cuando la concentración de triglicéridos fue superior a 3 mmol/l, de acuerdo con las recomendaciones del NCEP (ATPIII) [12]. Todos los métodos se realizaron en un autoanalizador Hitachi 917.

Para la determinación de la composición de las partículas HDL, éstas se aislaron por ultracentrifugación secuencial en el intervalo de densidad de 1.063-1.210 g/ml, utilizando soluciones de KBr. Todas las etapas se realizaron a 4°C y todas las soluciones de KBr contenían 1 mmol/l EDTA y 2 µmol/l BHT para evitar la oxidación de las muestras. En la **figura 8** se muestra el proceso de esta ultracentrifugación secuencial. La composición de HDL se determinó midiendo el contenido de colesterol (Roche), triglicéridos (Roche), fosfolípidos (Wako), ApoA-I (Roche) y ApoA-II (Kamiya), usando métodos comerciales adaptados a un autoanalizador Hitachi 917.

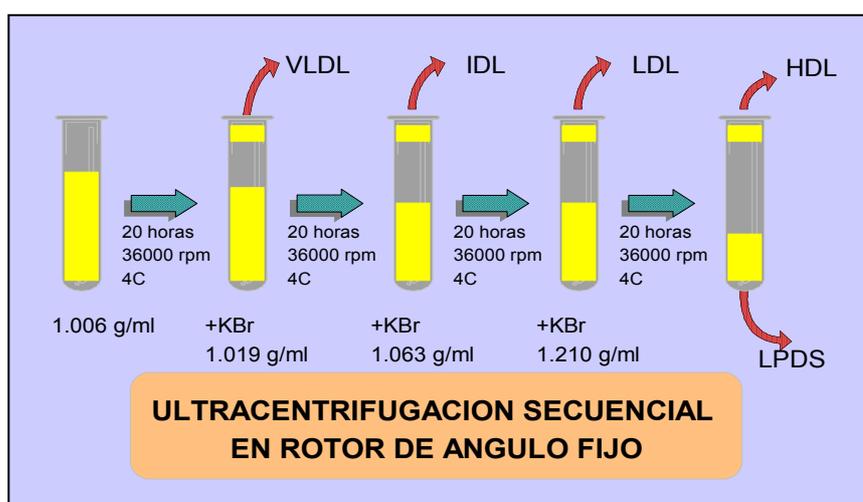


Figura 8: Proceso de ultracentrifugación secuencial utilizado para el aislamiento de las partículas HDL.

El tamaño de las LDL se determinó mediante un gel de electroforesis con gradiente de poliacrilamida no desnaturalizante (2% a 16%), usando como patrón una mezcla de suero con varias bandas de LDL de tamaño conocido, como se ha descrito previamente [157]. En la **figura 9** se muestra un ejemplo de electroforesis en poliacrilamida para determinar el tamaño de las partículas LDL.

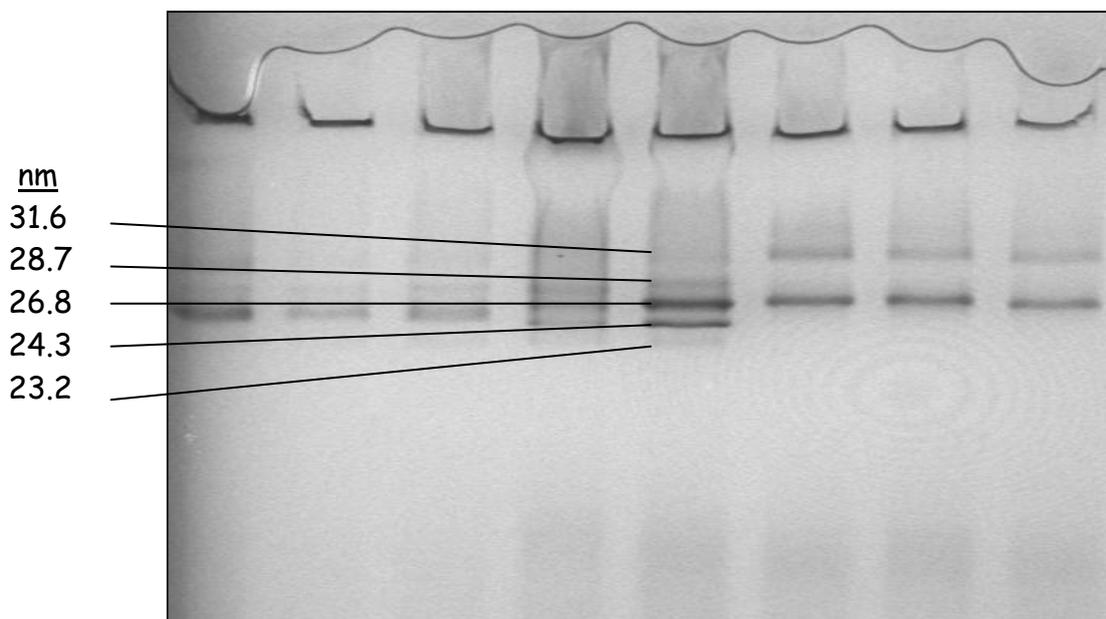


Figura 9: Electroforesis en gradiente (2-16%) de poliacrilamida utilizada en la determinación del tamaño de las partículas LDL.

El porcentaje de LDL(-) se determinó a partir de LDL total por cromatografía de intercambio aniónico en una columna MonoQ HR 5/5 (GE healthcare, Uppsala, Suecia), utilizando un gradiente de cloruro de sodio, tal como se ha descrito previamente [158] y se muestra en la **figura 10**. En breve resumen, las partículas LDL se dializaron frente a tampón A (1 mmol/L de EDTA y 10 mmol/L de Tris-HCL (pH 7,4)) mediante cromatografía de filtración en gel (Columna PD10, G25M; Pharmacia). El tampón A y un tampón B (constituido por 1 mol/L de NaCl, 1 mmol/L EDTA y 10 mmol/L de Tris-HCL (pH 7,4)), se utilizaron como eluyentes de la cromatografía. La LDL se eluyó a 1 ml/min durante 10 minutos con un gradiente lineal de 0-0,1 mol/L de NaCl, seguido por un procedimiento de gradiente de varios pasos: 10-20 minutos con NaCl a 0,25 mol/L, 20-28 minutos con NaCl a 0,6 mol/L, 28-35 minutos con NaCl a 1 mol/L y 35-40 minutos a NaCl 0 mol/L. Dos formas de LDL, una mayoritaria llamada LDL(+) (elución a 0,2 mol/l) y una forma minoritaria llamada LDL(-) (elución a 0,3 mol/L) difirieron en la carga y se identificaron a 280 nm. Su proporción relativa se cuantificó mediante la integración por picos [50;158].

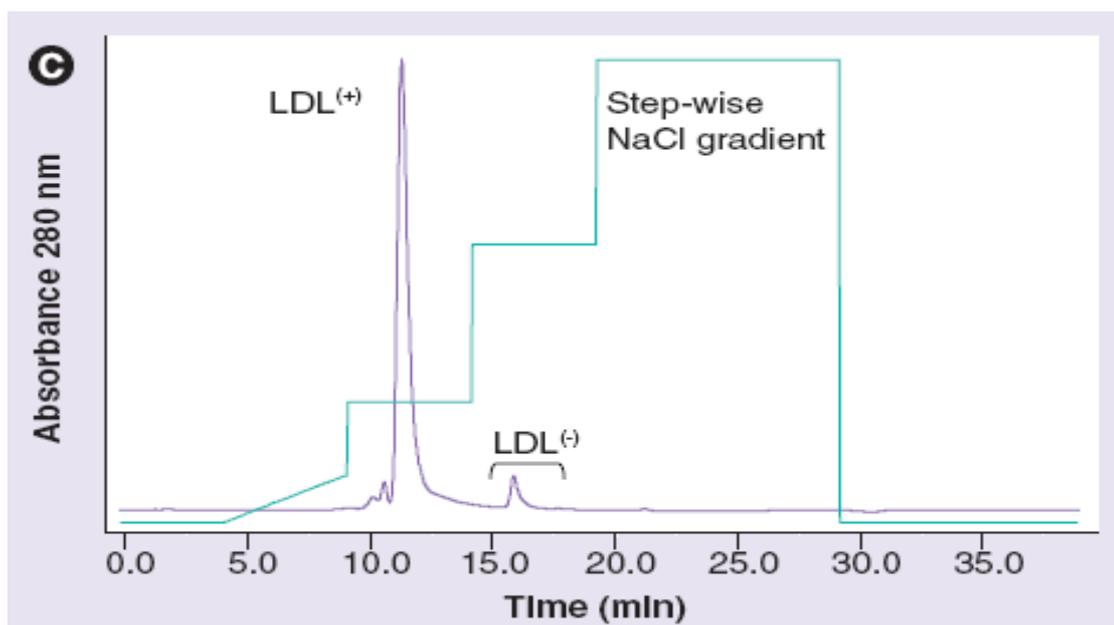


Figura 10: Cuantificación del porcentaje de LDL electronegativa en cromatografía de intercambio aniónico y utilizando un gradiente de cloruro de sodio.

La LDL oxidada (LDLox) y la LDL glicosilada (LDLgl) se cuantificaron mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (Oxidized LDL; Mercodia, Uppsala, Suecia y Glycacor; Exocell, Philadelphia USA, respectivamente), según las instrucciones del fabricante.

La lipoproteína a (Lpa) se midió mediante un ensayo turbidimétrico utilizando un método comercial (Quantia Lp(a), Abbott, Illinois, USA) con un límite de detección de 70 mg/L.

La actividad paroxonasa/arilesterasa 1 (PON1) se cuantificó a partir de muestras conservadas en EDTA y utilizando ácido fenilacético como sustrato. En breve resumen, 2 μL de suero se incubaron con 200 μL de tampón (20 mmol /L de Tris-HCl, 2 mmol /L CaCl_2 , pH 8,0) que contenía 3 mmol/L de ácido fenilacético (23 μl de ácido fenilacético en 50 mL de tampón de ensayo). Con este tampón se midió la actividad arilesterasa sensible a EDTA específica de PON1. No obstante, dado que existen en plasma otras actividades arilesterasa resistentes a EDTA, la actividad específica de PON1 se midió en paralelo, utilizando el mismo tampón pero con 2 mmol/L de EDTA en lugar de CaCl_2 . La cinética enzimática se monitorizó a 270 nm durante 10 minutos a 25°C (coeficiente de extinción molar a 270 nm del fenol $\epsilon_{270}=1,310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en placas de micro-titer de 96 pocillos para la detección en UV (Greiner). La actividad se calculó a partir de la ecuación $[(\Delta\text{abs}/\text{min}) * \text{final vol}] / (1,310 * \text{sample vol})$ y se expresó como $\mu\text{mol}/\text{min} * \text{mL}$.

La actividad Lp-PLA2 se midió utilizando el factor 2-tioactivador plaquetario (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan) como sustrato, de acuerdo con las instrucciones del fabricante [159]. Para determinar la distribución entre las fracciones lipoproteicas, las lipoproteínas que contenían Apo-B (LDL y VLDL) eran precipitadas desde el suero utilizando dextrano sulfato, como se ha descrito previamente [160]. Brevemente resumido, 200 μ l de suero se mezclaron con el reactivo de sulfato dextrano, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 g. Veinte μ l de sobrenadante (conteniendo HDL pero no LDL ni VLDL) se recogieron y se analizaron para determinar la actividad Lp-PLA2.

-Determinación de los parámetros inflamatorios y adipoquinas:

Las determinaciones de marcadores de inflamación y adipoquinas incluyeron la proteína C reactiva (PCR), interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1), factor de crecimiento transformante β_1 (TGF- β_1), leptina y adiponectina. La PCR se midió por un método comercial de alta sensibilidad (hsCRP, Roche Diagnostics) en un autoanalizador Hitachi 917. IL-6, MCP1, TGF, leptina y adiponectina se cuantificaron mediante ELISA de Bender Medsystems (IL-6, MCP1 y TGF- β_1) o de R&D (leptina y adiponectina).

2.5 Test de calidad de vida:

La calidad de vida se midió mediante un cuestionario enfermedad-específico adaptado a España [161] del Diabetes Quality of Life (DQoL) antes de iniciar el programa de optimización del control glucémico mediante la terapia bolo-basal y a los 6 meses del cambio [162].

2.6 Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó con los paquetes estadísticos SPSS 15.0 y 16.0 (SPSS Inc.).

La normalidad de los datos se analizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para muestras con más de 30 sujetos. En todos los casos se estableció como umbral de significación una $p < 0,05$. Las variables cualitativas se expresan como porcentaje (%) y número de casos (n). Las variables cuantitativas de distribución normal se expresan como media y desviación estándar y las de distribución no normal se expresan como mediana y rango. La relación entre variables cualitativas se analizó mediante la prueba Chi-cuadrado. Las pruebas T-Student (distribución normal) y Mann-Whitney (distribución no normal) se utilizaron para estudiar las diferencias entre muestras

independientes. En los casos en que se analizaron la relación entre dos variables cuantitativas, se utilizaron el coeficiente de Pearson o Spearman, en función de la distribución de las variables incluidas en el análisis.

Para estudiar la relación de varias variables independientes sobre una variable dependiente se utilizaron el análisis de regresión logística simple y múltiple (con método en pasos hacia atrás) y el análisis de la varianza (ANOVA) y de la covariancia (ANCOVA). Por otra parte, las variables de distribución no normal fueron transformadas a logaritmo (\log_{10}) previo a la inclusión en la ANOVA. Asimismo, se comprobó la normalidad de las variables incluidas en la ANOVA mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y se comprobó la homogeneidad de variancias mediante la prueba de contraste de Levène.

Finalmente, en el caso de los estudios longitudinales, se utilizó la prueba T para muestras pareadas, el test de Wilcoxon y los análisis de correlación de Spearman y de Pearson.

RESULTADOS

ESTUDIO 1:

Factibilidad y eficacia de un programa de optimización del control glucémico con pauta de insulina bolo-basal en pacientes con DM2 de larga evolución y mal control glucémico.

En este estudio se trató de dar respuesta al objetivo a, en el que se pretendía evaluar en la práctica clínica habitual la factibilidad, eficacia y seguridad de un programa ambulatorio de optimización del control glucémico mediante pauta bolo-basal en pacientes con DM2 de larga evolución y mal controlados con otras pautas de insulina.

Para ello, se intensificó el tratamiento de 37 pacientes con DM2 y mal o lábil control metabólico con otras pautas de insulina, mediante una pauta bolo-basal. Para ello, la dosis inicial de insulina glargina se calculó como el 50% de la dosis previa diaria total y la insulina prandial inicial (aspártica o lispro) como el restante 50% de la dosis total, la cual fue repartida en 3 para cubrir las tres comidas principales. Los pacientes que tomaban metformina antes del cambio de terapia y que no tenían contraindicación para la misma, la mantuvieron a la misma dosis. El resto de agentes orales hipoglucemiantes fueron retirados. En el tratamiento inicial, los hidratos de carbono se distribuyeron en las tres comidas principales, aunque a los pacientes no se les enseñó el conteo de los mismos mediante raciones.

Todos los pacientes asistieron a un programa de formación en diabetes, estructurado y ambulatorio, tal y como se ha mencionado previamente. Los pacientes aprendieron el manejo de la terapia bolo-basal y cómo ajustar las dosis de insulina basal, de acuerdo a la glucemia capilar en ayunas realizada por autocontrol. La dosis de insulina prandial fue ajustada según los valores de glucemia capilar preingesta, utilizando un algoritmo con dosis fijas de insulina de acción rápida. Estos sujetos realizaron visitas con enfermería al cabo de 1 y 3 semanas y de 3 y 6 meses, y con el endocrinólogo a los 2, 4 y 7 meses. Los datos antropométricos (peso, índice de masa corporal y perímetro de cintura), así como el tratamiento y las variables bioquímicas fueron obtenidos en el momento basal y a los 3 y 6 meses en todos los pacientes. Fueron cuantificados los requerimientos de insulina y el número de hipoglucemias severas (definidas como aquellas que requieren ayuda de una segunda persona para ser resueltas) por anamnesis y revisión de la libreta de los pacientes.

En la **tabla 1** se muestran las características clínicas basales de los pacientes estudiados. El 78% de los pacientes estaban en tratamiento previo con 2 dosis de insulina NPH o premezclas, 11% de los sujetos estaban tratados con agentes orales y monodosis nocturna de insulina (glargina, detemir o NPH/NPL) y el restante 11% de los pacientes recibían otros regímenes de insulino terapia con 3 dosis de insulina premezclada.

Tabla 1: Características clínicas basales de la población estudiada

Varón/mujer	14/23
Edad (años)	65 ± 8
Tiempo de evolución de DM (años)	18 ± 8
Tiempo desde la insulinización (años)	8 ± 7
Peso (kg)	78,2 ± 20,2
IMC (kg/m ²)	28,8 ± 6,2
Perímetro de la cintura (cm)	101 ± 16
HbA _{1c} (%)	9,0 ± 1,2
Requerimientos de insulina (UI/kg/día)	0,69 ± 0,3

Datos expresados como media ± desviación estándar.

IMC: índice de masa corporal

HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada

El 86,5% de los pacientes tenían una HbA_{1c} > 8% y el 51%, una HbA_{1c} ≥ 9%. Tras el cambio a terapia bolo-basal, la HbA_{1c} media disminuyó de 9,0 ± 1,2 % a 8,1 ± 1,2% (p<0,001) a los 3 meses y a 8,0 ± 1,2% a los 6 meses (p<0,001) (**figura 11**). El porcentaje de pacientes con una HbA_{1c} ≥ 9% se redujo de un 51% (19 sujetos) a un 13,8% y a un 18,9%, a los 3 y 6 meses, respectivamente.

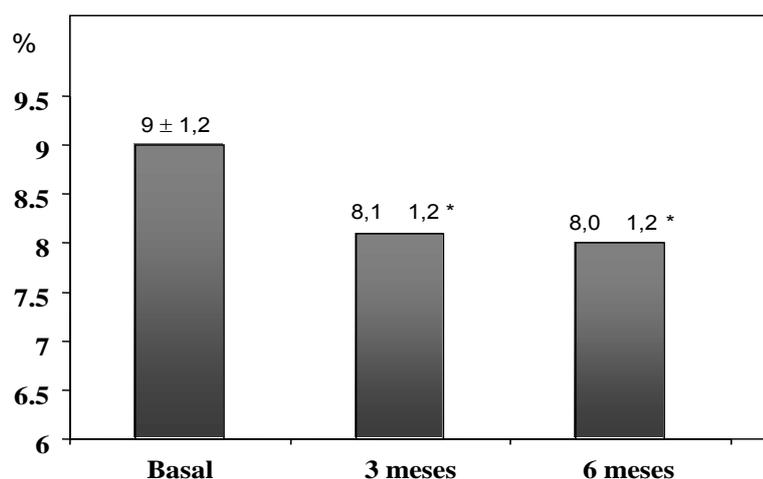


Figura 11: HbA_{1c} basal y a los 3 y 6 meses tras el cambio a pauta bolus-basal.

* p <0,001 comparada con la inicial

En la **figura 12** se muestra el porcentaje de pacientes con una HbA_{1c} < 7%, 7-8% y > 8% antes y después del cambio de tratamiento. Cinco de los 37 pacientes mostraron un empeoramiento de los valores de HbA_{1c} a los 6 meses.

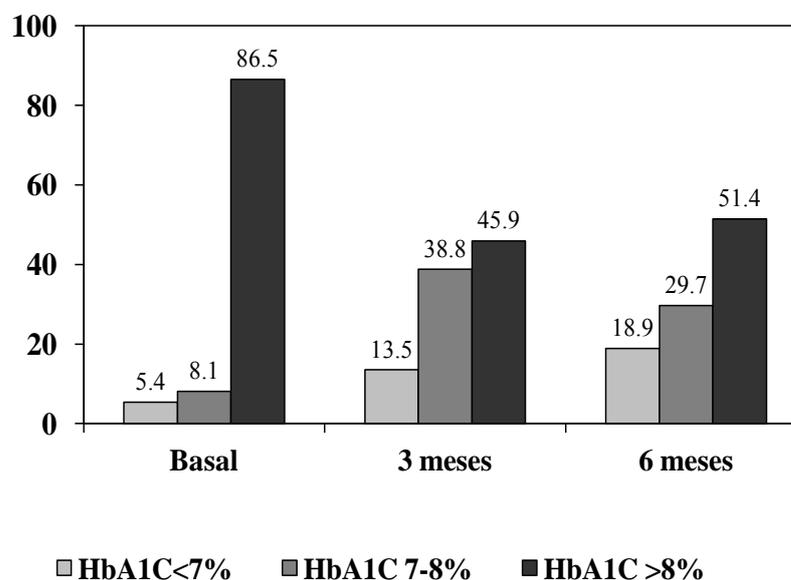


Figura 12: Porcentaje de pacientes con HbA_{1c} < 7%, 7-8% y > 8% al inicio, y a los 3 y 6 meses tras el cambio a pauta bolus-basal. HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada

Sólo hubo un episodio de hipoglucemia grave registrado, definida como aquella que requiere ayuda de una segunda persona para ser resuelta. A los 6 meses, todos los pacientes eran capaces de ajustar la dosis de insulina basal; sin embargo, sólo 10 de los 37 sujetos modificaban la dosis de insulina prandial de forma autónoma de acuerdo a los valores de glucemia capilar preprandial.

El peso, los requerimientos de insulina y los parámetros lipídicos al inicio y durante el seguimiento se muestran en la **tabla 2**. El peso se mantuvo estable durante los 6 meses de seguimiento y los requerimientos de insulina (UI/kg/día) no se modificaron a los 3 meses, aunque aumentaron ligeramente a los 6 meses. Respecto a los parámetros del perfil lipídico, no hubo cambios significativos tras la optimización del control glucémico a los 3 y 6 meses, a excepción de un aumento significativo del

tamaño de las partículas de LDL a los 3 ($25,77 \pm 0,48$ nm vs $25,98 \pm 0,5$ nm, $p < 0,05$) y también a los 6 meses ($25,77 \pm 0,48$ nm vs $25,94 \pm 0,44$ nm, $p < 0,05$).

Tabla 2: Cambios en los datos antropométricos, requerimientos de insulina, control glucémico y perfil lipídico a los 3 y 6 meses.

	Basal	3 meses	6 meses
Peso (kg)	$78,2 \pm 20,2$	$78,3 \pm 19,5$	$77,5 \pm 20,5$
IMC (kg/m^2)	$28,8 \pm 6,2$	$28,9 \pm 6,1$	$29,0 \pm 6,3$
Perímetro de la cintura (cm)	101 ± 16	105 ± 14	104 ± 15
HbA _{1c} (%)	$9,0 \pm 1,2$	$8,1 \pm 1,2$ *	$8,0 \pm 1,2$ *
Requerimientos de insulina (UI/kg/día)	$0,69 \pm 0,3$	$0,67 \pm 0,2$	$0,74 \pm 0,2$ *
Triglicéridos (mmol/l)	$1,4 \pm 0,96$	$1,26 \pm 0,6$	$1,22 \pm 0,61$
Colesterol total (mmol/l)	$4,43 \pm 0,95$	$4,55 \pm 1,05$	$4,36 \pm 0,82$
cHDL (mmol/l)	$1,26 \pm 0,34$	$1,29 \pm 0,3$	$1,28 \pm 0,29$
cLDL (mmol/l)	$2,57 \pm 0,76$	$2,72 \pm 0,96$	$2,53 \pm 0,7$
Apolipoproteína B (g/l)	$0,83 \pm 0,2$	$0,83 \pm 0,25$	$0,81 \pm 0,21$
Tamaño de LDL (nm)	$25,77 \pm 0,48$	$25,98 \pm 0,5$ *	$25,94 \pm 0,44$ *

* $p < 0,05$ comparado con el basal.

IMC: índice de masa corporal

HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada

cHDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad

cLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad

El cuestionario de calidad de vida relacionada con la diabetes (Diabetes Quality of Life (DQoL)) no mostró cambios a los 6 meses en los ítems de satisfacción (2,22 vs 2,14), impacto de la diabetes (2,28 vs 2,15), preocupación social (1,81 vs 1,75) y preocupación relacionada con la diabetes (2,69 vs 2,35).

1.1 Comunicaciones a congresos derivadas de este estudio (📍):

- Factibilidad y eficacia de las pautas bolus-basal en pacientes diabéticos tipo 2 de larga evolución. (Comunicación oral).

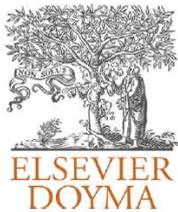
Vinagre I, Torrejón S, Biagetti B, María MA, Martín E, Úbeda J, Capel I, Pérez A. XIX Congreso de la Sociedad Española de Diabetes. Sevilla. 16-19 febrero 2008. Av Diabetol. 2008; 24 (Supl 1): 42.

1.2 Publicaciones derivadas de este estudio (📖):

Switching to basal-bolus insulin therapy is effective and safe in long-term type 2 diabetes patients inadequately controlled with other insulin regimens

Irene Vinagre, Juan Sánchez-Hernández, José Luis Sánchez-Quesada, Miguel Ángel María, Alberto De Leiva, Antonio Pérez

Endocrinol Nutr. 2013; 60 (5): 249-253



ORIGINAL ARTICLE

Switching to basal-bolus insulin therapy is effective and safe in long-term type 2 diabetes patients inadequately controlled with other insulin regimens

Irene Vinagre^{a,*}, Juan Sánchez-Hernández^b, José Luis Sánchez-Quesada^c, Miguel Ángel María^a, Alberto de Leiva^{a,d}, Antonio Pérez^{a,b}

^a Endocrinology and Nutrition Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^b CIBER of Diabetes and Metabolic Diseases (CIBERDEM), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

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

^d CIBER of Biomedicine, Biotechnology and Nanomedicine (CIBERBBN), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 4 July 2012; accepted 22 November 2012

Available online 22 March 2013

KEYWORDS

Basal-bolus regimen;
Diabetes training program;
Insulin therapy;
Quality of life;
Type 2 diabetes mellitus

Abstract

Aim: To assess in standard clinical practice the feasibility, efficacy, and safety of switching patients with long-standing type 2 diabetes (T2DM) and poor or unstable blood glucose control to basal-bolus insulin therapy.

Material and methods: This was a prospective, single center study including 37 patients with T2DM (age 65 ± 8 years, 62.2% men, body mass index 28.8 ± 6.2 kg/m², diabetes duration 18 ± 8 years) with poor or unstable glycemic control, who were switched to a basal-bolus insulin regimen with glargine and rapid-acting insulin analogue at the discretion of their physicians. After a group-structured outpatient diabetes training program, patients were followed in a clinical practice setting for 6 months. Clinical and biochemical variables were collected before switching and at 3 and 6 months.

Results: After switching to basal-bolus therapy, glycosylated hemoglobin (HbA1c) decreased from $9 \pm 1.2\%$ to $8.1 \pm 1.2\%$ ($p < 0.001$) at 3 months and to $8.0 \pm 1.2\%$ at 6 months ($p < 0.001$) without changing total daily insulin dose. The proportion of patients with $HbA1c \geq 9\%$ decreased from 51% to 13.8% at 3 months and to 18.9% at 6 months respectively. There was a single episode of severe hypoglycemia. No changes were seen in body weight and quality of life. The size of LDL (low density lipoprotein) particles significantly increased at 3 and 6 months, while all other lipid parameters remained unchanged.

Conclusions: Our study confirmed that basal-bolus insulin therapy is feasible, effective, and safe in patients with long-standing T2DM, and does not impair their quality of life.

© 2012 SEEN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail addresses: ivinagre@clinic.ub.es, irevin@hotmail.com (I. Vinagre).

1575-0922/\$ - see front matter © 2012 SEEN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2012.11.009>

PALABRAS CLAVE

Pauta bolus-basal;
Programa de educación en diabetes;
Tratamiento con insulina;
Calidad de vida;
Diabetes tipo mellitus tipo 2

El cambio a pautas bolus-basal es efectivo y seguro en pacientes diabéticos tipo 2 de larga evolución mal controlados con otras pautas de insulina

Resumen

Objetivo: Evaluar en la práctica clínica habitual la factibilidad, la eficacia y la seguridad de un programa ambulatorio de paso a pauta bolus-basal en pacientes diabéticos de tipo 2 (DM2) con mal o inestable control glucémico.

Material y métodos: Estudio prospectivo de 37 sujetos con DM2 (edad 65 ± 8 años, $62,2\%$ varones, índice de masa corporal $28,8 \pm 6,2$ kg/m², tiempo de evolución de la diabetes 18 ± 8 años) en los que se transfirió a una pauta bolus-basal (una dosis de glargina y 3 de aspártica o lispro) según el criterio de su médico. El tratamiento se instauró en un programa ambulatorio y el seguimiento se realizó durante 6 meses. Los parámetros clínicos y analíticos se recogieron a los 0, 3 y 6 meses.

Resultados: Tras el cambio a la pauta bolus-basal, la hemoglobina glucosilada (HbA1c) se redujo de $9 \pm 1,2\%$ al inicio a $8,1 \pm 1,2\%$ ($p < 0,001$) a los 3 meses y a $8,0 \pm 1,2\%$ a los 6 meses ($p < 0,001$) sin modificarse la dosis diaria total de insulina. El porcentaje de pacientes con HbA1c $\geq 9\%$ cayó del 51% inicial al 13,8% a los 3 meses y al 18,9% a los 6 meses, respectivamente. Se registró una hipoglucemia grave. El peso y la calidad de vida no mostraron cambios. El tamaño de las partículas de LDL (lipoproteínas de baja densidad) aumentó significativamente a los 3 y 6 meses, mientras que otros parámetros lipídicos no se modificaron.

Conclusión: Este estudio confirma que las pautas bolus-basal son factibles, eficaces y seguras en pacientes con DM2 de larga evolución y no alteran su calidad de vida.

© 2012 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is characterised by an insulin resistance, which remains relatively stable throughout the course of the disease, and a progressive loss of β -cell function with an inadequate insulin secretion. Due to this progressive evolution, most patients with T2DM will eventually require insulin to achieve and maintain glycemic control, using a stepwise approach beginning with basal insulin combined with oral agents. When pre-prandial and postprandial glycemia is not adequately controlled, a twice-daily insulin regimen with NPH (Neutral Protamine Hagedorn) or premixed insulin preparations is preferred as the next step. As in type 1 diabetic subjects, basal-bolus insulin therapy should be indicated in T2DM patients with severe insulin deficiency that are unable to achieve and maintain glycemic targets with twice-daily regimen.¹ However, this insulin regimen is clearly underused probably because of the reluctance of patients and physicians due to the complexity involved in its establishment as well as the limited information available about the feasibility, specially in elderly subjects, and its efficacy in patients previously treated with two insulin doses.²

In the present study, we evaluated the feasibility, effectiveness and safety of basal-bolus insulin therapy in patients with long-term type 2 diabetes and poor or unstable glycemic control.

Material and methods

In this prospective, single centre study, we enrolled 37 patients who were switched to basal-bolus insulin regimen from October 2006 to October 2007 and had had unstable or poor glycemic control (glycated hemoglobin (HbA1c) $\geq 8\%$)

in the prior six months, despite intervention to improve it. The study protocol was approved by the institutional ethics review boards and informed written consent was obtained from all patients.

In the initial treatment, carbohydrates were distributed throughout the three main meals. The initial insulin glargine dose was calculated as 50% of the previous total daily dose and the initial prandial insulin (aspart or lispro) as the remaining 50% of the total daily dose, which was divided equally to cover the three meals. Patients who were taking metformin before switching the therapy and did not have any contraindication to it, continued using it at the same dose. The other oral antidiabetic drugs were stopped.

All patients attended a structured out-patient diabetes training programme consisting of three 2-h group sessions in one week for 5–8 patients. In general, they were taught to follow a diet assuming qualitative carbohydrate intake at each meal, although for patients who wished to vary it, carbohydrate counting had to be done. Patients also learned the management of the basal-bolus therapy and how to adjust basal insulin doses according to fasting self-monitoring blood glucose (SMBG) every 7 days. Adjustment of prandial insulin dose was performed according to pre-meal values using a simple algorithm with set doses of rapid-acting insulin. Patients followed up visits provided by the nurse at 1 and 3 weeks, 3 and 6 months, and by the endocrinologist at 2, 4 and 7 months, where diet was checked and diary with SMBG values was reviewed to adjust insulin doses. Anthropometric data (weight, body mass index and waist circumference) as well as treatment and biochemical variables were obtained at baseline and at 3 and 6 months in all the patients. We quantified insulin requirements and the number of severe hypoglycemia (defined as requiring assistance) by anamnesis and a review of the patients' diaries.

HbA1c was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany), with a reference range of 4.6–5.8%. Cholesterol and triglycerides were determined by standardized enzymatic methods and high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) by a direct method (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) was estimated by the Friedewald formula (if triglyceride levels were < 3.39 mmol/l) or by ultracentrifugation. Apolipoprotein (Apo) B was determined by an immunoturbidimetric method (Tina-quant, Roche Diagnostics) and LDL size by electrophoresis (2–16%). Quality of life was measured using a disease-specific questionnaire adapted in Spain from the Diabetes Quality of Life (DCCT) at baseline and repeated at 6 months after basal-bolus insulin therapy.^{3,4}

Data were analyzed by the statistical programme SPSS 15.0 (SPSS Inc.). The changes in anthropometrical variables, HbA1c, insulin requirements and lipid profile were evaluated by *t* of Student test. They were considered significant values of $p \leq 0.05$.

Results

The baseline clinical characteristics are summarized in Table 1. Seventy-eight per cent of patients were under treatment with 2 doses of NPH or premixed insulin preparations, 11% of patients were taking oral drugs and bedtime insulin (glargine, detemir or NPH) and the remaining 11% of patients were using other regimens with 3 doses of NPH and regular insulin. Eighty-seven per cent of patients had an HbA1c concentration >8% and 51% had HbA1c >9%. After switching to basal-bolus therapy, HbA1c dropped from $9 \pm 1.2\%$ to $8.1 \pm 1.2\%$ ($p < 0.001$) at 3 months and to $8.0 \pm 1.2\%$ at 6 months ($p < 0.001$) (Table 1, Fig. 1). The percentage of patients with HbA1c $\geq 9\%$ fell from an initial 51% (19 subjects) to 13.8% and 18.9%, at 3 and 6 months respectively. Fig. 2 shows the proportion of patients with an HbA1c < 7%,

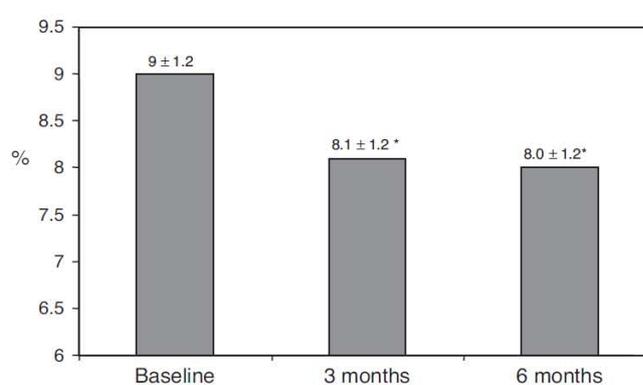


Figure 1 Glycated hemoglobin at baseline and 3 and 6 months after switching to basal-bolus regimen. * $p < 0.001$ compared to baseline. HbA1c: glycated hemoglobin.

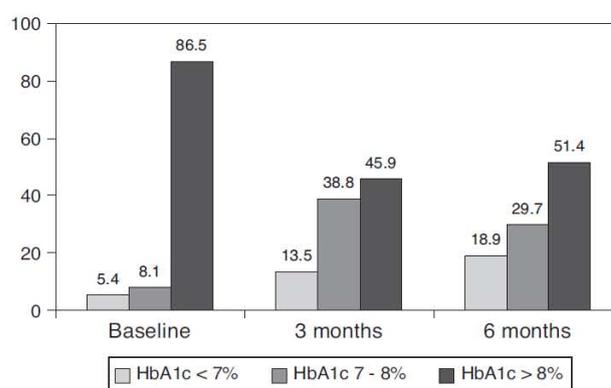


Figure 2 Percentage of patients with glycated hemoglobin < 7%, 7–8% and > 8% at baseline, and 3 and 6 months after switching to basal-bolus regimen.

Table 1 Baseline characteristics of the study population and change on anthropometric variables, insulin requirements, glycemic control and lipid profile at baseline and 3 and 6 months after switching to basal-bolus regimen.

	Baseline	3 months	6 months
Male/female	14/23	–	–
Age (years)	65 ± 8	–	–
Diabetes duration (years)	18 ± 8	–	–
Time with insulin (years)	8 ± 7	–	–
Weight (kg)	78.2 ± 20.2	78.3 ± 19.5	77.5 ± 20.5
Body mass index (kg/m ²)	28.8 ± 6.2	28.9 ± 6.1	29.0 ± 6.3
Waist circumference (cm)	101 ± 16	105 ± 14	104 ± 15
HbA1c (%)	9.0 ± 1.2	8.1 ± 1.2*	8.0 ± 1.2*
Insulin requirements (UI/kg/day)	0.69 ± 0.3	0.67 ± 0.2	0.74 ± 0.2*
Triglycerides (mmol/l)	1.4 ± 0.96	1.26 ± 0.6	1.22 ± 0.61
Total cholesterol (mmol/l)	4.43 ± 0.95	4.55 ± 1.05	4.36 ± 0.82
HDLc (mmol/l)	1.26 ± 0.34	1.29 ± 0.3	1.28 ± 0.29
LDLc (mmol/l)	2.57 ± 0.76	2.72 ± 0.96	2.53 ± 0.7
Apolipoprotein B (g/l)	0.83 ± 0.2	0.83 ± 0.25	0.81 ± 0.21
LDL size (nm)	25.77 ± 0.48	25.98 ± 0.5*	25.94 ± 0.44*

HbA1c: glycated hemoglobin; HDLc: high-density lipoprotein cholesterol; LDLc: low-density lipoprotein cholesterol.

* $p < 0.05$ compared to baseline.

7–8% and >8% before and after switching to basal-bolus therapy. Five of the patients showed a worsening in the HbA1c values. There was only one episode of severe hypoglycemia registered. At 6 months all patients were able to adjust the basal insulin dose but only 10 patients modified the prandial dose according to the patterns of SMBG autonomously.

Body weight, insulin requirements and lipid parameters at baseline and during follow-up are shown in Table 1. Body weight remained stable during the 6 months of follow-up and insulin requirements (UI/kg/day) did not change at 3 months and increased slightly at 6 months. The size of the LDL particles increased significantly at 3 (25.77 ± 0.48 nm vs 25.98 ± 0.5 nm, $p < 0.05$) and 6 months (25.77 ± 0.48 nm vs 25.94 ± 0.44 nm, $p < 0.05$), while the other lipidic parameters did not change.

The diabetes quality of life (DQOL) questionnaire showed no changes at 6 months in the scores for satisfaction (2.22 vs 2.14), impact of diabetes (2.28 vs 2.15), social concern (1.81 vs 1.75) and concern related to diabetes (2.69 vs 2.35).

Discussion

In the present study, we showed that basal-bolus insulin therapy allows glycemic control to improve without compromising security and quality of life in subjects with long-term type 2 diabetes, previously treated with one or more insulin doses. We also demonstrate the feasibility of the implementation of these insulin regimens through a structured out-patient training program.

Consensus guidelines for the management of type 2 diabetes consider that the primary goals of treatment are to achieve HbA1c concentrations as low as possible without causing unacceptable hypoglycemia, especially in older patients or with coronary disease, and to prevent the development of microvascular and macrovascular complications.^{1,5} Unfortunately, recent surveys indicate that a large proportion of patients with diabetes fail to meet the recommended glycemic goals.^{6,7} Although in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) the proportion of patients with HbA1c < 7% increased from 37% in 1999–2000 to 56.8% in 2003–2004, rates of suboptimal glycemic control are especially high in individuals with similar characteristics to those studied by us, who have long-standing diabetes or insulin treatment.^{6,7} Twice-daily dosing with NPH or premixed insulin are used to simplify insulin regimens, but have limited flexibility, require rigid adherence to regular mealtimes, limit the ability to adjust the dosages of the individual components and increase the possibility of hypoglycemia. Thus, although many patients initially will achieve adequate glycemic control with this regimen,⁸ when insulin secretory capacity of beta cells is lost and insulin deficiency is severe, glycemic control becomes poor and unstable as in most of the patients included in the present study.^{1,8} We showed that in patients with long-term type 2 diabetes, poorly controlled with other regimens of insulin and unstable profile, the basal-bolus insulin regimen reduces HbA1c one point over 6 months and the proportion of patients with HbA1c $\geq 9\%$ from 51% to 14% at 3 months and 19% at 6 months. This is probably because it is a more physiological therapy; while prandial insulin replaces first-phase endogenous insulin secretion,

basal insulin decreases the level of fasting hyperglycemia. Thus, in addition to the level of HbA1c⁹ the way treatment is intensified greatly alters the relative contributions of basal and postprandial hyperglycemia to the overall hyperglycemia of T2DM patients. Recently, Riddle et al.¹⁰ showed that after treatment intensification with insulin, the contribution of basal hyperglycemia drops but still accounts for about one-third of the remnant hyperglycemia. Hence, according to the findings of the present study, the use of insulin regimens combining basal with prandial insulin will often be needed to achieve glycemic goals. In fact, these findings are consistent with the vast evidence for the advantages of basal-bolus therapy in type 1 diabetes¹¹ and are supported by the limited data from observational studies in patients with type 2 diabetes switching from premix to basal-bolus glargine-based regimen^{12,13} and by a randomised comparison of a premix-based regimen versus a basal-bolus regimen in type 2 diabetic patients.^{2,14,15} In patients previously treated with glargine plus oral anti-diabetic drugs, the difference in HbA1c was 0.22% in favour of the basal-bolus glargine-based regimen, compared to a premixed insulin regimen¹⁵. In the PREFER study,¹⁴ the subgroup of patients previously on a basal insulin regimen showed a greater HbA1c reduction with detemir/aspart basal-bolus regimen compared to biphasic insulin aspart (-1.21% vs -0.75%). Finally, in premix treated type 2 diabetic patients, Fritsche et al. showed that a basal-bolus glargine/glulisine-based insulin regimen was superior to a premix insulin regimen in the reduction of HbA1c (-1.31% vs 0.8%).² Therefore, although there are differences in the magnitude of improvement between studies, probably due to the different baseline characteristics of the studied population, the superiority of a basal-bolus regimen in selected patients with long-standing disease seems demonstrated. The reduction of more than one point of HbA1c achieved by switching to a basal-bolus insulin regimen can be considered clinically significant because it may result in the reduction of clinical outcomes. Unfortunately, basal-bolus therapy is underused in patients with T2DM because physicians consider it complex to implement, it is time consuming and there are fears of the increased number of injections, risk of hypoglycemia, weight gain and worsening quality of life. In this and previous studies body weight and rate of severe hypoglycemia were not increased,^{2,12} which could be related to the more physiologic insulin substitution with basal-bolus regimen and the flexibility that this therapy may offer to patients. Thus, fear of hypoglycemia should not be a barrier to start this kind of therapy in T2DM, but it has to be considered in order to establish glycemic control targets as it can cause morbidity and increased mortality.¹⁶ Regarding the impact on quality of life, in concordance with the report of Ménard et al.,¹⁷ our study did not support the view that basal-bolus regimens lead to a decreased quality of life.

According to a previous report,¹² in the present study all patients were able to titrate their basal insulin dose according to the fasting SMBG of the last 3–7 days. In contrast, few patients were able to adjust prandial insulin doses according to the patterns of SMBG and most needed the support of a simple algorithm with set dose depending on premeal blood glucose. This is not surprising since establishing the optimal mealtime insulin dose often involves calculations that consider multiple factors and is difficult

for some patients. Moreover, using a simple algorithm to adjust mealtime rapid-acting insulin each week based on SMBG patterns is as effective as adjusting mealtime insulin using insulin-to-carbohydrate ratios in T2DM subjects.¹⁸

Limitations of the study are related to the prospective observational design and lack of control group. These aspects and the short follow-up of patients, difficult to interpret the findings and their applicability to patients with T2DM followed in other centers. However, although future studies in larger groups of patients should be performed to confirm these findings, the study provides information that can be useful for the management of a common and poorly treated clinical situation.

In conclusion, the present study demonstrated that a 9-hour out-patient program allowed long-duration T2DM patients poorly controlled with other insulin regimens to switch to basal-bolus insulin regimen. We also confirmed that basal-bolus insulin regimen is effective, safe and does not alter the quality of life in this subgroup of T2DM patients. Thus basal-bolus therapy might be offered to T2DM subjects inadequately controlled with other insulin strategies.

Conflict of interest

Irene Vinagre has received lecture fees from Eli Lilly, Novo Nordisk and Sanofi Aventis. Antonio Perez has received consulting and lecture fees from Eli Lilly, Novo Nordisk and Sanofi Aventis.

References

- Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al. Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*. 2009;52:17–30.
- Fritsche A, Larbig M, Owens D, Haring HU. Comparison between a basal-bolus and a premixed insulin regimen in individuals with type 2 diabetes—results of the GINGER study. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12:115–23.
- Millan M. Quality-of-life questionnaire designed for diabetes mellitus (EsDQOL). *Aten Primaria*. 2002;29:517–21.
- Reliability and validity of a diabetes quality-of-life measure for the diabetes control and complications trial (DCCT). The DCCT Research Group. *Diabetes Care*. 1988;11:725–32.
- Rodbard HW, Jellinger PS. The American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology (AAACE/ACE) algorithm for managing glycaemia in patients with type 2 diabetes mellitus: comparison with the ADA/EASD algorithm. *Diabetologia*. 2010;53:2458–60.
- Hoerger TJ, Segel JE, Gregg EW, Saaddine JB. Is glycemic control improving in U.S. adults? *Diabetes Care*. 2008;31:81–6.
- Arroyo J, Badia X, de la Calle H, Diez J, Esmatjes E, Fernandez I, et al. Management of type 2 diabetic patients in primary care in Spain. *Med Clin (Barc)*. 2005;125:166–72.
- Holman RR, Thorne KI, Farmer AJ, Davies MJ, Keenan JF, Paul S, et al. Addition of biphasic, prandial, or basal insulin to oral therapy in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2007;357:1716–30.
- Monnier L, Lapinski H, Colette C. Contributions of fasting and postprandial plasma glucose increments to the overall diurnal hyperglycemia of type 2 diabetic patients: variations with increasing levels of HbA(1c). *Diabetes Care*. 2003;26:881–5.
- Riddle M, Umpierrez G, DiGenio A, Zhou R, Rosenstock J. Contributions of basal and postprandial hyperglycemia over a wide range of A1C levels before and after treatment intensification in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34:2508–14.
- DCCT. 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;329:977–86.
- Davies M, Sinnassamy P, Storms F, Gomis R. Insulin glargine-based therapy improves glycemic control in patients with type 2 diabetes sub-optimally controlled on premixed insulin therapies. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;79:368–75.
- Sharplin P, Gordon J, Peters JR, Tetlow AP, Longman AJ, McEwan P. Switching from premixed insulin to glargine-based insulin regimen improves glycaemic control in patients with type 1 or type 2 diabetes: a retrospective primary-care-based analysis. *Cardiovasc Diabetol*. 2009;8:9.
- Liebl A, Prager R, Binz K, Kaiser M, Bergenstal R, Gallwitz B. Comparison of insulin analogue regimens in people with type 2 diabetes mellitus in the PREFER Study: a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11:45–52.
- Rosenstock J, Ahmann AJ, Colon G, Scism-Bacon J, Jiang H, Martin S. Advancing insulin therapy in type 2 diabetes previously treated with glargine plus oral agents: prandial premixed (insulin lispro protamine suspension/lispro) versus basal/bolus (glargine/lispro) therapy. *Diabetes Care*. 2008;31:20–5.
- Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, Crouse III JR, Leiter LA, Linz P, et al. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2010;362:1563–74.
- Menard J, Payette H, Dubuc N, Baillargeon JP, Maheux P, Ardilouze JL. Quality of life in type 2 diabetes patients under intensive multitherapy. *Diabetes Metab*. 2007;33:54–60.
- Bergenstal RM, Johnson M, Powers MA, Wynne A, Vljajnic A, Hollander P, et al. Adjust to target in type 2 diabetes: comparison of a simple algorithm with carbohydrate counting for adjustment of mealtime insulin glulisine. *Diabetes Care*. 2008;31:1305–10.

ESTUDIO 2:

Características antiaterogénicas de las partículas de HDL y LDL en pacientes con DM2 y mal control glucémico: efecto del control glucémico.

2.1 Estudio transversal: Modificaciones de las LDL, composición de las HDL y distribución de la Lp-PLA2 en la DM2. Impacto del fenotipo de las subfracciones de las LDL

Con este estudio se trató de dar respuesta a los objetivos b y c. Así, por un lado, estudiamos las modificaciones de las partículas de LDL y HDL en sujetos con DM2 en situación de mal control glucémico y, por otro lado, determinamos el impacto del fenotipo de las lipoproteínas de baja densidad sobre las características cualitativas de las LDL y de las HDL en pacientes con DM2.

Las características clínicas y antropométricas basales de los sujetos control y los pacientes con DM2 de este estudio transversal se resumen en la **tabla 3**. Una tercera parte de los sujetos con DM2 (n = 45) presentaban un fenotipo B de las partículas de LDL, en comparación con el grupo control en que todos los sujetos (n = 54) tenían fenotipo A de las LDL. Los pacientes con DM2 y fenotipo B eran más jóvenes, más obesos, tenían menor tiempo de evolución de la DM y la proporción con insulinoterapia era menor que los sujetos con DM2 y fenotipo A. Los pacientes con DM2 y fenotipo B también presentaban peor control glucémico y mayor prevalencia de complicaciones tardías.

El tratamiento hipoglucemiante de los pacientes con DM2 a la inclusión en el estudio consistía en: cambios en el estilo de vida (22%), hipoglucemiantes orales (21,1%), insulina combinada con agentes orales (29,4%) o insulina en monoterapia (27,5%). Por otro lado, la medicación hipolipemiante incluía monoterapia con estatinas (25,4%) o fibratos (4,1%), estatinas asociadas a fibratos (2,5%) y estatinas asociadas a ezetimibe (1,6%).

Tabla 3: Características clínicas y antropométricas basales de los pacientes con DM2, según fenotipo de las partículas LDL, y de los sujetos control

	DM2 Fenotipo A (N=77)	DM2 Fenotipo B (N=45)	Grupo control (n=54)	ANOVA P
Edad (años)	60 ± 11	56 ± 11 ^a	56 ± 14 ^a	0,108
Varones (%)	65,9	64,6	57,4 ^{a, b}	<0,001
IMC (kg/m ²)	29,6 ± 6,2	31,1 ± 4 ^a	25,9 ± 3,6 ^{a, b}	<0,001
Perímetro cintura (cm)	104 ± 15	108 ± 13 ^a	92 ± 11 ^{a, b}	<0,001
Tiempo de evolución DM (años)	12 ± 11	9 ± 8 ^a	-	
Insulinoterapia (%)	58	52 ^a	-	
Medicación hipolipemiente (%)	30	28	-	
HbA _{1c} (%)	9,1 ± 2,1	9,6 ± 2,3 ^a	5,3 ± 0,6 ^{a, b}	<0,001
Hipertensión arterial (%) ¹	69,4	68,2	-	
Retinopatía (%)	29,6	29,5	-	
Albuminuria (%)	24	29,6 ^a	-	
Enfermedad coronaria (%) ²	5,6	15,9 ^a	-	

Datos expresados como media ± desviación estándar.

^a, P<0,05 vs fenotipo A; ^b, P<0,05 vs fenotipo B.

¹ Hipertensión arterial fue definida como presión arterial sistólica ≥140 mmHg, presión arterial diastólica ≥90 mmHg o en aquellos que recibían medicación antihipertensiva en el momento de la visita. Enfermedad coronaria (EC) fue definida como EC con diagnóstico documentado, EC reportada por el paciente o ECG sugestivo de EC.

IMC : índice de masa corporal

HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada

En la **tabla 4** se muestran los resultados más relevantes del perfil lipídico en situación basal de los pacientes con DM2, en función del fenotipo de LDL, y de los sujetos control. Los pacientes con DM2 de ambos grupos tenían mayor concentración de TG, cVLDL, Apo-B, AGL y menor concentración de cHDL y ApoA-I, que los sujetos control. Además, como era de esperar, los pacientes con fenotipo B tenían un perfil lipídico más desfavorable que los pacientes con fenotipo A, con niveles superiores de CT, TG, cVLDL, cLDL, Apo-B e inferiores de cHDL y Apo-AI.

Tabla 4: Perfil lipídico basal de los pacientes con DM2, según fenotipo de las partículas LDL, y de los sujetos control

	DM2 Fenotipo A (N=77)	DM2 Fenotipo B (N=45)	Grupo control (n=54)	ANOVA p
Colesterol total (mmol/L)	4,78 ± 1,09	5,64 ± 1,53 ^a	5,00 ± 0,79 ^b	0,004
Triglicéridos (mmol/L)	1,46 ± 0,79	3,89 ± 3,30 ^a	0,87 ± 0,37 ^{a,b}	<0,001
cVLDL (mmol/L)	0,65 ± 0,30	1,43 ± 1,12 ^a	0,40 ± 0,17 ^{a,b}	<0,001
cLDL (mmol/L)	2,86 ± 0,95	3,10 ± 0,96 ^a	2,94 ± 0,66 ^b	0,281
cHDL (mmol/L)	1,28 ± 0,33	1,02 ± 0,27 ^a	1,64 ± 0,37 ^{a,b}	<0,001
AGL (mmol/L)	0,64 ± 0,29	0,90 ± 0,48	0,41 ± 0,19 ^{a,b}	<0,001
Apolipoproteína B (g/L)	0,93 ± 0,32	1,09 ± 0,28 ^a	0,80 ± 0,19 ^{a,b}	<0,001
Apolipoproteína A-I (g/L)	1,46 ± 0,24	1,37 ± 0,25 ^a	1,57 ± 0,31 ^{a,b}	0,001
Apolipoproteína A-II (g/L)	0,33 ± 0,07	0,34 ± 0,06	0,35 ± 0,05	0,081
Tamaño de LDL (nm)	26,0 ± 0,4	25,0 ± 0,4 ^a	26,3 ± 0,1 ^b	<0,001

Datos expresados como media ± desviación estándar.

^a, P<0,05 vs fenotipo A; ^b, P<0,05 vs fenotipo B.

cVLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de muy baja densidad

cLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad

cHDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad

AGL: ácidos grasos libres

En la **tabla 5** se muestran las modificaciones de las LDL, la composición de las HDL y actividad de la Lp-PLA2 en los pacientes con DM2 y en los sujetos control.

Respecto a las LDL modificadas, ambos grupos de pacientes con DM2 (fenotipo A y B) tenían concentraciones superiores de LDLox, LDLgl y LDL(-) que los sujetos control. Los pacientes con fenotipo B tenían, además, niveles superiores de LDLox y LDLgl respecto a los de fenotipo A, mientras que los de LDL(-) eran similares en ambos grupos. Por otro lado, se analizaron los niveles de LDL modificadas en función del sexo en los pacientes con DM2 y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tamaño de las LDL ni a la concentración de LDLox, LDLgl y LDL(-) entre ambos sexos (**tabla 6**).

Tabla 5: LDL modificadas, composición de HDL y actividad Lp-PLA2 en pacientes con DM2 y sujetos control

	DM2 Fenotipo A (N=77)	DM2 Fenotipo B (N=45)	Grupo control (n=54)	ANOVA P
LDL modificadas				
LDL oxidada (U/L)	61,4 ± 20,0	78,6 ± 26,7 ^a	51,2 ± 19,3 ^{a,b}	0,005
LDL glicada (mg/dL)	2,17 ± 0,94	2,77 ± 1,41 ^a	1,85 ± 0,73 ^{a,b}	0,030
LDL(-) (%)	7,6 ± 3,5	7,7 ± 3,1	6,1 ± 2,0 ^{a,b}	0,017
Composición de HDL				
Colesterol (%) ¹	17,1 ± 2,3	15,6 ± 3,0 ^a	17,3 ± 2,3 ^b	0,204
Triglicéridos (%)	4,3 ± 1,7	6,7 ± 1,9 ^a	3,1 ± 1,0 ^{a,b}	<0,001
Fosfolípidos (%)	33,5 ± 4,3	31,3 ± 3,3 ^a	32,8 ± 3,7	0,076
ApoA-I (%)	31,9 ± 5,8	32,8 ± 6,3	34,3 ± 5,7 ^{a,b}	0,193
ApoA-II (%)	13,2 ± 3,4	13,6 ± 2,6	12,5 ± 2,9 ^{a,b}	0,265
AGL (mol/mol apoA-I)	1,1 ± 0,6	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,9	0,907
Cociente lípidos/proteínas	1,20 ± 0,28	1,19 ± 0,27	1,16 ± 0,27 ^{a,b}	0,539
Cociente A-I/A-II	2,61 ± 0,92	2,54 ± 0,81	2,98 ± 1,12 ^{a,b}	0,112
Cociente colesterol/triglicéridos	4,65 ± 2,19	2,57 ± 0,91	6,32 ± 2,68 ^{a,b}	<0,001
Actividad PON1 (µmol/min/mL)	78,5 ± 25,5	82,6 ± 25,5	82,5 ± 23,1	0,152
Actividad de Lp-PLA2 (µmol/min/mL)				
Lp-PLA2 total	20,1 ± 6,6	23,0 ± 7,2 ^a	19,1 ± 6,2 ^b	0,627
HDL-Lp-PLA2	6,8 ± 2,7	7,1 ± 3,5	6,2 ± 2,6	0,995
Lp-PLA2 asociada a ApoB	13,3 ± 4,8	15,9 ± 4,6 ^a	12,9 ± 3,3 ^b	0,539
% HDL-Lp-PLA2	33,9 ± 10,5	30,9 ± 11,4 ^a	32,4 ± 10,6	0,510
% Lp-PLA2 asociada a ApoB	66,1 ± 19,4	69,1 ± 21,2 ^a	67,6 ± 19,8	0,510

Datos expresados como media ± desviación estándar.

^a, P<0,05 vs fenotipo A; ^b, P<0,05 vs fenotipo B.

¹ La composición representa el porcentaje de masa de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos, apoA-I y apoA-II.

LDL(-): lipoproteínas de baja densidad electronegativas

ApoA-I: apolipoproteína A-I

ApoA-II: apolipoproteína A-II

ApoB: apolipoproteína B

AGL: ácidos grasos libres

PON1: paraoxonasa/arilesterasa 1

Lp-PLA2: fosfolipasa A2 asociada a las lipoproteínas

Tabla 6: LDL modificadas en pacientes con DM2 en función del sexo

	Varones DM2 (N=80)	Mujeres DM2 (N=42)
Tamaño de LDL (nm)	25,6 ± 0,5	25,6 ± 0,7
LDL oxidada (U/L)	65,9 ± 23,7	71,1 ± 25,5
LDL glicada (mg/dL)	2,4 ± 1,1	2,5 ± 1,5
LDL(-) (%)	7,6 ± 3,3	8,3 ± 3,5

Datos expresados como media ± desviación estándar.

P n.s

LDL(-): lipoproteínas de baja densidad electronegativas

En cuanto al análisis de la composición de las partículas de HDL se observó que ambos grupos de pacientes tenían una composición anormal comparado con los sujetos control, siendo algunas de estas alteraciones superiores en los pacientes con fenotipo B, en los que destacaba menor porcentaje de colesterol y fosfolípidos y mayor porcentaje de TG en las HDL, respecto a los de fenotipo A. Las diferencias observadas entre los pacientes con fenotipo B y los del grupo control consistían en la presencia de un menor contenido de colesterol y ApoA-I y un porcentaje superior de TG y ApoA-II. Estas diferencias eran similares a las observadas entre los sujetos control y los DM2 con fenotipo A, excepto en el contenido de colesterol que era parecido en ambos grupos. Como consecuencia, el cociente ApoA-I/ApoA-II era inferior y el cociente lípidos/proteínas superior en HDL en ambos grupos de pacientes respecto al grupo control. Ambos cocientes eran similares en los dos grupos de pacientes con DM2.

Por otro lado, la actividad de Lp-PLA2 total y la ligada a las lipoproteínas que contienen Apo-B fue superior en los pacientes con fenotipo B, comparada con la de los pacientes con fenotipo A y la de los sujetos controles (**figura 13A**). Como consecuencia, se observó que la distribución de Lp-PLA2 entre HDL y las lipoproteínas que contienen ApoB era diferente entre los pacientes con fenotipo A y B. Así, los pacientes con DM2 y fenotipo B tenían menor proporción de Lp-PLA2 en HDL y mayor proporción en LDL (**figura 13B**). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la actividad de Lp-PLA2 asociada a HDL.

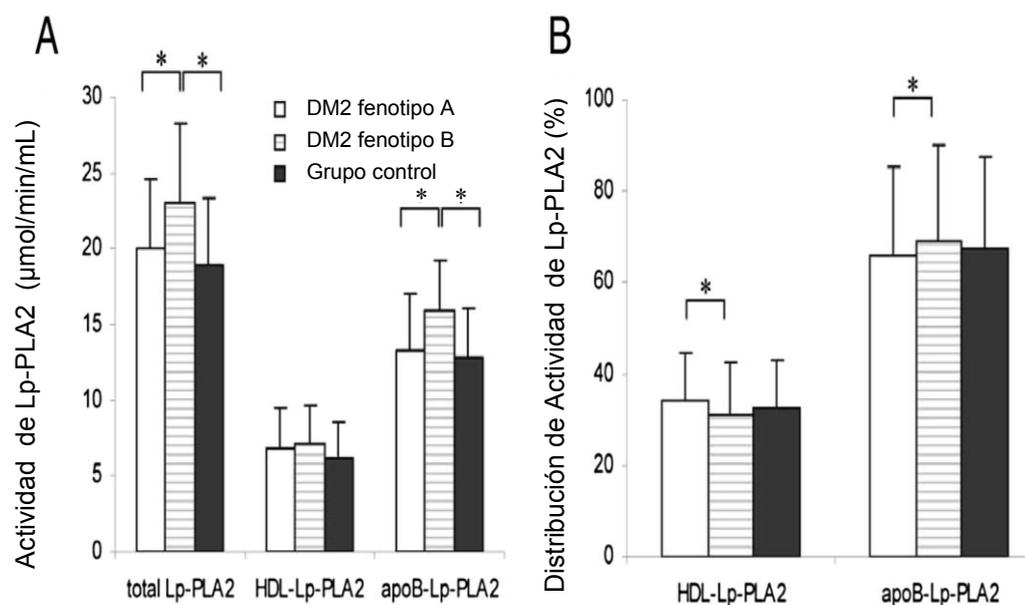


Figura 13: Actividad de Lp-PLA2 (A) y distribución relativa entre HDL y lipoproteínas que contienen ApoB (B) en sujetos control y pacientes DM2 según el fenotipo de LDL. * $P < 0,05$. Lp-PLA2: fosfolipasa A2 asociada a las lipoproteínas; HDL: lipoproteínas de alta densidad; ApoB: apolipoproteína B.

El análisis de covarianza (ANCOVA) mostró que las diferencias observadas en ApoB y LDLgl desaparecieron tras ajustar por triglicéridos. Las diferencias observadas en LDL(-) y LDLox también perdieron su significancia tras ajustarse por HbA_{1c} y TG. Estas asociaciones eran esperables y refuerzan la relación conocida entre LDL(-) y LDLox con la presencia de DM e hipertrigliceridemia, y de ApoB y LDLgl con la hipertrigliceridemia.

La **tabla 7** muestra el análisis de correlación del tamaño de las LDL con el perfil lipídico, las LDL modificadas, la composición de HDL y la actividad Lp-PLA2 en pacientes con DM2 y sujetos control. En los pacientes con DM2 el tamaño de LDL se correlacionaba negativamente con los TG, CT, cVLDL, ApoB y AGL y con LDLox y LDLgl, y positivamente con los niveles de cHDL y ApoA-I. Respecto a la composición de HDL, el tamaño de LDL se correlacionó positivamente con la composición de fosfolípidos, colesterol y Lp-PLA2, y negativamente, con el contenido de TG y ApoA-I. En cuanto a los sujetos control, el análisis de correlación mostró algunas diferencias con respecto a los pacientes con DM2, observándose una pérdida de la correlación

positiva entre el tamaño de LDL y el cHDL y de la negativa con los AGL y con LDLgl. También se pierde la correlación entre el tamaño de LDL y los diferentes componentes de HDL.

Tabla 7: Análisis de correlación del tamaño de LDL con el perfil lipídico, LDL modificadas, composición de HDL y actividad Lp-PLA2 en pacientes con DM2 y sujetos control

	Pacientes DM2		Sujetos control	
	R	P	R	P
HbA _{1c}	-0,160	0,071	-0,103	0,601
Insulina	-0,076	0,418	0,008	0,937
Colesterol total	-0,185	0,035	-0,326	0,016
Triglicéridos	-0,553	< 0,001	-0,427	0,001
cVLDL	-0,513	< 0,001	-0,423	0,001
cLDL	-0,152	0,083	-0,333	0,014
cHDL	0,407	< 0,001	0,096	0,491
AGL	-0,226	0,004	-0,042	0,765
ApoB	-0,246	0,005	-0,458	< 0,001
ApoA-I	0,264	0,002	-0,033	0,811
ApoA-II	-0,068	0,472	-0,099	0,476
LDL oxidada	-0,390	< 0,001	-0,472	< 0,001
LDL glicada	-0,273	0,003	-0,151	0,307
LDL(-)	-0,020	0,828	0,030	0,849
Colesterol en HDL	0,321	0,002	0,208	0,244
Triglicéridos en HDL	-0,398	< 0,001	-0,150	0,405
Fosfolípidos en HDL	0,437	< 0,001	0,067	0,712
ApoA-I en HDL	-0,205	0,047	0,086	0,635
ApoA-II en HDL	-0,169	0,103	-0,069	0,739
AGL en HDL	-0,010	0,925	0,086	0,635
PON1	0,016	0,867	0,024	0,872
Actividad total Lp-PLA2	-0,123	0,172	0,025	0,862
Actividad HDL-Lp-PLA2	0,030	0,745	0,061	0,680
% de HDL-Lp-PLA2	0,191	0,034	0,064	0,662

Las p en negrita indican la pérdida de significancia estadística en el grupo control comparado con los pacientes con DM2.

HbA_{1C}: hemoglobina glicosilada
cVLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de muy baja densidad
cLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad
cHDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad
AGL: ácidos grasos libres
ApoB: apolipoproteína B
ApoA-I: apolipoproteína A-I
ApoA-II: apolipoproteína A-II
LDL(-): lipoproteínas de baja densidad electronegativas
PON1: paraoxonasa/arilesterasa 1
Lp-PLA2: fosfolipasa A2 asociada a las lipoproteínas

2.2 Estudio longitudinal: Efecto del control glucémico en pacientes con DM2 sobre el tamaño de las LDL, LDL(-) y distribución de la Lp-PLA2

Con este estudio se trató de dar respuesta al objetivo d, de modo que evaluamos el efecto de la optimización del control glucémico en estos sujetos con DM2 y mal control glucémico sobre el tamaño de las partículas de LDL, la proporción de LDL(-) y la distribución de Lp-PLA2 entre las partículas LDL y HDL.

Así, en este estudio longitudinal, se optimizó el control glucémico en un subgrupo de 42 pacientes mediante distintas estrategias terapéuticas. Además de la intensificación de las medidas de estilo de vida, se aplicó intensificación farmacológica con hipoglucemiantes orales (metformina o metformina más sulfonilureas) en 6 pacientes, insulino terapia en 31 pacientes o ambos (insulina más metformina o insulina más metformina y sulfonilureas) en 5 pacientes. El porcentaje de pacientes insulinizados aumentó del 75% al 85,7%. La medicación hipolipemiente y antihipertensiva no se modificó en ninguno de los casos.

En la **tabla 8** se muestran las características clínicas y antropométricas de los pacientes con DM2 antes y después de la optimización del control glucémico (n = 42). Tras un seguimiento de 3 meses, la HbA_{1C} descendió de $9,5 \pm 1,8\%$ a $7,4 \pm 0,8\%$, sin modificaciones en el peso.

Tabla 8: Características clínicas y antropométricas de los pacientes con DM2 antes y después de la optimización del control glucémico (n= 42)

	Basal	Tras optimización del control glucémico
Varones/mujeres	27/15	-
Edad (años)	61 ± 12	-
Tiempo de evolución (años)	37 ± 14	-
Complicaciones crónicas:		
• Retinopatía (%)	59	-
• Nefropatía (%) ^a	51,3	-
• Enfermedad coronaria (%)	17,9	-
Insulino terapia (%)	75	85,7
Medicación hipolipemiente (%)	59,5	59,5
Peso (kg)	80,35 ± 19,52	80,02 ± 19,71
Indice de masa corporal (Kg/m ²)	29,0 ± 5,8	28,8 ± 6
HbA _{1C} (%)	9,5 ± 1,8	7,4 ± 0,8 *

Datos expresados como media \pm desviación estándar.

^a Nefropatía definida como insuficiencia renal crónica (FG < 60 ml/minuto) o 2 o más determinaciones urinarias de microalbuminuria \geq 20 mg/l o \geq 30 mg/g de creatinina.

*P <0,05, comparado con grupo control.

HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada

En la **tabla 9** se indican los cambios en el perfil lipídico y las características cualitativas de las LDL. Tras la optimización del control glucémico, se observó una reducción de los AGL y de la Apo-B, con el consiguiente incremento del tamaño de las partículas LDL, y una reducción de la proporción de LDL(-), sin modificarse las LDLox.

Tabla 9: Perfil lipídico y características cualitativas de las LDL en pacientes con DM2 antes y después de la optimización del control glucémico

	Basal	Tras optimización del control glucémico	P
Ácidos grasos libres (mmol/L)	0,72 \pm 0,33	0,59 \pm 0,25	0,018*
Triglicéridos (mmol/L)	1,88 \pm 1,77	1,37 \pm 0,74	0,059
Colesterol total (mmol/L)	4,94 \pm 1,23	4,72 \pm 1,13	0,192
cHDL (mmol/L)	1,24 \pm 0,39	1,27 \pm 0,40	0,270
cLDL (mmol/L)	2,91 \pm 0,95	2,81 \pm 1,00	0,448
Apolipoproteína A-I (g/L)	1,45 \pm 0,33	1,48 \pm 0,29	0,261
Apolipoproteína B (g/L)	0,94 \pm 0,27	0,87 \pm 0,26	0,036*
Tamaño de LDL (nm)	25,72 \pm 0,61	25,96 \pm 0,55	0,008*
LDL oxidada (U/L)	62,4 \pm 18,8	60,1 \pm 18,7	0,428
LDL (-) (%)	7,6 \pm 3,4	6,7 \pm 2,4	0,026*

Datos expresados como media \pm desviación estándar.

*P <0,05, comparado con el momento basal.

cLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad

cHDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad

LDL(-): lipoproteínas de baja densidad electronegativas

La reducción de HbA_{1c} se correlacionó positivamente con cambios en la concentración de triglicéridos (R=0,388, P=0,006) y negativamente con cambios en el cHDL (R=-0,552, P<0,001). El aumento del tamaño de LDL tras la mejoría del control glucémico también se correlacionó negativamente con la HbA_{1c} (R=-0,304, P=0,033) y con los triglicéridos plasmáticos (R=0,388, P=0,006), y positivamente con los cambios en el cHDL (R=0,552, P<0,001).

Por otro lado, se estudiaron los pacientes con fenotipo B de las LDL (diámetro inferior a 25,5 nm). Cinco de los 11 pacientes que inicialmente tenían un fenotipo B, presentaban un fenotipo A tras la mejoría del control glucémico. Este cambio se asoció a un aumento del cHDL en estos sujetos (de $1,34 \pm 1,15$ a $1,42 \pm 1,16$ mmol/L, $P < 0,001$) y a una reducción no significativa de los triglicéridos (de $1,89 \pm 2,04$ a $1,42 \pm 0,34$ mmol/L, $P = 0,488$).

Respecto a la actividad total de la Lp-PLA2, se observó una reducción del 10% de la misma tras la optimización del control glucémico, a expensas de la actividad ligada a las lipoproteínas que contienen Apo-B (**figura 14A**). Como consecuencia, la distribución relativa de Lp-PLA2 aumentó en HDL y se redujo en las lipoproteínas ricas en Apo-B (**figura 14B**).

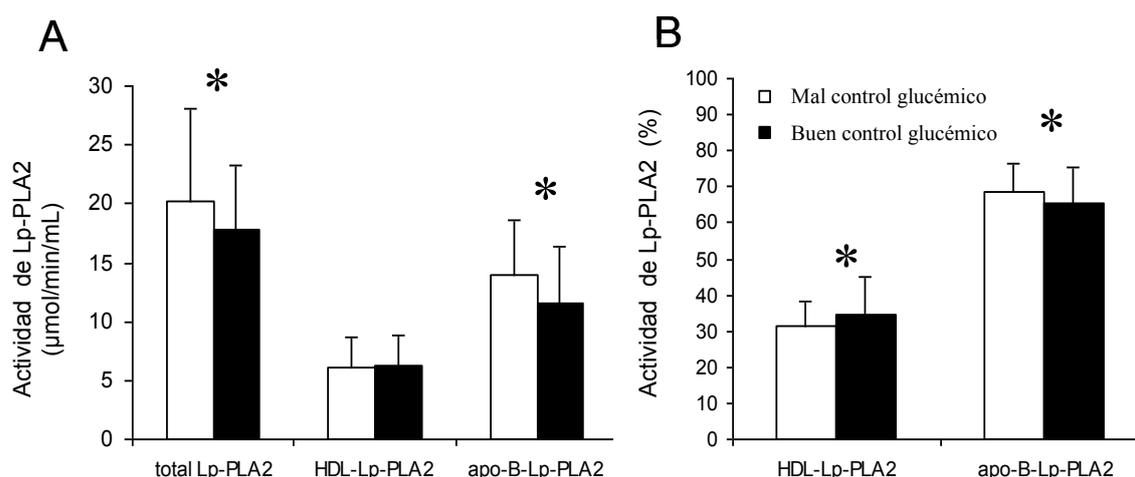


Figura 14: **A.** Actividad de Lp-PLA2 y distribución entre HDL y lipoproteínas ricas en LDL en pacientes con DM2 antes (barras blancas) y después de la optimización del control glucémico (barras negras). **B.** Porcentaje de actividad de Lp-PLA2 entre HDL y lipoproteínas ricas en LDL. * $P < 0,05$, comparado con el momento basal. ApoB: apolipoproteína B; HDL: lipoproteínas de alta densidad; Lp-PLA2: fosfolipasa A2 asociada a las lipoproteínas.

Aunque los pacientes que estaban en tratamiento hipolipemiante tenían un perfil lipídico basal de características más favorables que los pacientes sin tratamiento previo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, tal y como se observa en la **tabla 10**. Los cambios observados en las características cuantitativas y

cualitativas tras la optimización del control glucémico, fueron equiparables entre los dos grupos, observándose una reducción de ApoB (con el consiguiente aumento del tamaño de las LDL), de los AGL y de las LDL(-), estadísticamente significativas.

Tabla 10: Perfil lipídico y características cualitativas de las partículas LDL en pacientes con DM2, con o sin medicación hipolipemiente, antes y después de la optimización del control glucémico

	DM2 con medicación hipolipemiente (N=23)			DM2 sin medicación hipolipemiente (N=19)		
	Basal	Tras optimización del control glucémico	% cambio	Basal	Tras optimización del control glucémico	% cambio
AGL (mmol/L)	0,70±0,38	0,59±0,25 ^a	-19	0,73±0,27	0,60±0,26 ^a	-18
Triglicéridos (mmol/L)	1,52±1,11	1,17±0,63	-23	2,27±2,24	1,59±0,80	-30
Colesterol total (mmol/L)	4,62±1,06	4,47±0,80	-3,2	5,28±1,34	5,00±1,38	-5,3
cHDL (mmol/L)	1,26±0,33	1,28±0,30	1,6	1,22±0,44	1,27±0,48	4,1
cLDL (mmol/L)	2,69±0,94	2,59±0,76	-3,7	3,14±0,93	3,03±1,18	-3,5
Apolipoproteína A-I (g/L)	1,44±0,25	1,49±0,22	3,5	1,47±0,41	1,47±0,36	0
Apolipoproteína B (g/L)	0,89±0,26	0,82±0,21 ^a	-7,9	0,99±0,27	0,92±0,31 ^a	-7,1
Tamaño de LDL (nm)	25,73±0,53	25,97±0,46 ^a	0,1	25,71±0,70	25,95±0,66 ^a	0,1
LDL oxidada (U/L)	62,1±18,7	57,5±20,6	-7,4	62,0±18,4	60,6±18,2	-2,3
LDL(-) (%)	7,1±3,2	6,3±2,2 ^a	-11	8,0±3,8	7,1±2,3 ^a	-11

Datos expresados como media ± desviación estándar.

^a P <0,05, comparado con el momento basal.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con y sin medicación hipolipemiente previa.

AGL: ácidos grasos libres

cLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad

cHDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad

LDL(-): lipoproteínas de baja densidad electronegativas

Con respecto a la actividad Lp-PLA2, los pacientes que estaban bajo tratamiento con fármacos hipolipemiantes al inicio tenían menor actividad Lp-PLA2 y mayor contenido en HDL que aquellos que no estaban tomando esta medicación (**figura 15**). La intensificación del control glucémico redujo significativamente la actividad Lp-PLA2 e

incrementó la proporción de Lp-PLA2 en HDL en el grupo de pacientes sin medicación hipolipemiente, pero no lo hizo en el subgrupo que recibían fármacos hipolipemiantes.

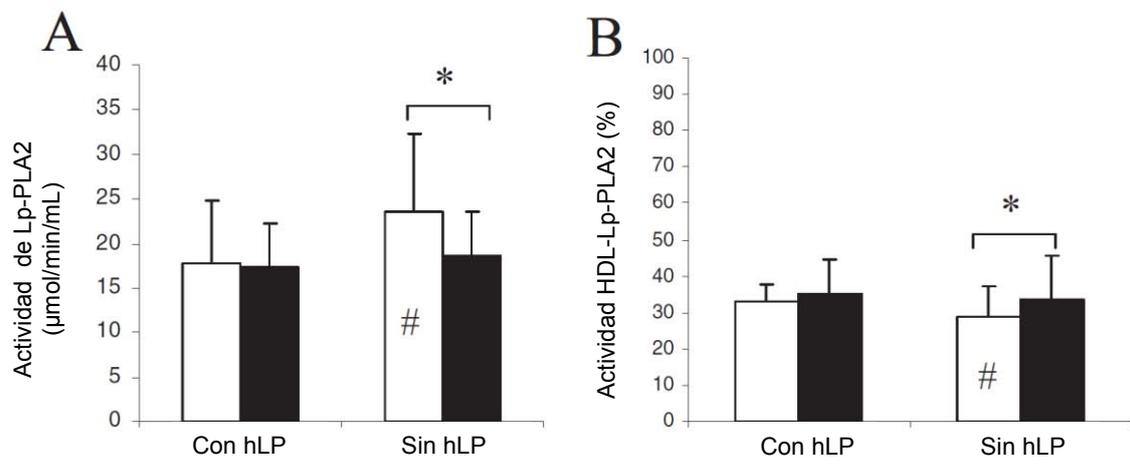


Figura 15: Actividad Lp-PLA2 (**A**) y proporción de Lp-PLA2 en HDL (**B**) en pacientes DM2 con (con hLP) y sin medicación hipolipemiente (sin hLP) previa antes (barras blancas) y después (barras negras) de optimizar el control glucémico. * P < 0,05, comparado con el momento basal. # P < 0,05 entre pacientes con o sin medicación hipolipemiente. Lp-PLA2: fosfolipasa A2 asociada a las lipoproteínas.

2.3 Comunicaciones a congresos derivadas de estos estudios (9):

- El control glucémico reduce la actividad acetilhidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH) en la diabetes mellitus tipo 2. (Comunicación Oral).
L.Santos Rey, **I.Vinagre Torres**, E. De Juan Franco, JL Sánchez Quesada, J. Sánchez Hernández, F. Blanco Vaca, J. Ordóñez Llanos, A. Pérez Pérez. 51 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición. Zaragoza. 20-22 mayo 2009. Endocrinol Nutr. 2009; 56 (Espec Cong): 1.
- Características cualitativas de LDL y HDL en la diabetes tipo 2. Efecto del control glucémico. (Póster).
José Luis Sánchez-Quesada, Juan Sánchez-Hernández, **Irene Vinagre**, Elena de Juan-Franco, Sara González, Jordi Ordóñez-Llanos, Antonio Pérez. XXI Congreso de la Sociedad Española de Diabetes. Barcelona. 15-18 abril 2010. Av Diabetol. 2010;26(Supl 2):34-105
- La mejoría del control glucémico en pacientes con diabetes tipo 2 reduce el tamaño de las partículas LDL y la LDL electronegativa y modifica la distribución de la fosfolipasa A2 asociada a las lipoproteínas. (Comunicación Oral).
I. Vinagre Torres, J.L. Sánchez Quesada, E. de Juan Franco, J. Sánchez Hernández, I. Miñambres Donaire, J.M. Cubero Marcos y A. Pérez Pérez. . XXII Congreso de la Sociedad Española de Diabetes. Málaga. 14-16 Abril 2011. Av Diabetol. 2011;27(Espec Congr):9-31

2.4 Publicaciones derivadas de estos estudios (📖):**Impact of the LDL subfraction phenotype on Lp-PLA2 distribution, LDL modification and HDL composition in type 2 diabetes**

José Luis Sánchez-Quesada, Irene Vinagre, Elena de Juan-Franco, Juan Sánchez-Hernández, Rosa Bonet-Marques, Francisco Blanco-Vaca, Antonio Pérez

Cardiovascular Diabetology 2013; 12: 112

Effect of improving glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus on low-density lipoprotein size, electronegative low-density lipoprotein and lipoprotein-Associated phospholipase A2 distribution

José Luis Sánchez-Quesada, Irene Vinagre, Elena de Juan-Franco, Juan Sánchez-Hernández, Francisco Blanco-Vaca, Jordi Ordóñez-Llanos, Antonio Pérez

Am J Cardiol 2012; 110: 67-71

ORIGINAL INVESTIGATION

Open Access

Impact of the LDL subfraction phenotype on Lp-PLA2 distribution, LDL modification and HDL composition in type 2 diabetes

Jose Luis Sánchez-Quesada^{1*}, Irene Vinagre², Elena De Juan-Franco¹, Juan Sánchez-Hernández³, Rosa Bonet-Marques¹, Francisco Blanco-Vaca^{3,4,5}, Jordi Ordóñez-Llanos^{1,5} and Antonio Pérez^{2,3*}

Abstract

Background: Qualitative alterations of lipoproteins underlie the high incidence of atherosclerosis in diabetes. The objective of this study was to assess the impact of low-density lipoprotein (LDL) subfraction phenotype on the qualitative characteristics of LDL and high-density lipoprotein (HDL) in patients with type 2 diabetes.

Methods: One hundred twenty two patients with type 2 diabetes in poor glycemic control and 54 healthy subjects were included in the study. Patients were classified according to their LDL subfraction phenotype. Seventy-seven patients presented phenotype A whereas 45 had phenotype B. All control subjects showed phenotype A. Several forms of modified LDL, HDL composition and the activity and distribution of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) were analyzed.

Results: Oxidized LDL, glycated LDL and electronegative LDL were increased in both groups of patients compared with the control group. Patients with phenotype B had increased oxidized LDL and glycated LDL concentration than patients with phenotype A. HDL composition was abnormal in patients with diabetes, being these abnormalities more marked in patients with phenotype B. Total Lp-PLA2 activity was higher in phenotype B than in phenotype A or in control subjects. The distribution of Lp-PLA2 between HDL and apoB-containing lipoproteins differed in patients with phenotype A and phenotype B, with higher activity associated to apoB-containing lipoproteins in the latter.

Conclusions: The presence of LDL subfraction phenotype B is associated with increased oxidized LDL, glycated LDL and Lp-PLA2 activity associated to apoB-containing lipoproteins, as well as with abnormal HDL composition.

Keywords: Low-density lipoprotein, High-density lipoprotein, Lipoprotein-associated phospholipase A2, Modified LDL, Type 2 diabetes, LDL subfraction phenotype

Background

Atherosclerosis-related pathologies are the main cause of mortality and morbidity in type 2 diabetes. Plasma lipid profile, including hypertriglyceridemia, low high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels and hyperapolipoprotein B, is frequently abnormal in these subjects and is a cause of the high prevalence of macrovascular and microvascular complications [1,2]. However, these quantitative abnormalities

per se cannot explain all the increase in cardiovascular risk (CVR) in diabetes, and it is currently accepted that alterations in the qualitative properties of low-density lipoprotein (LDL) and HDL underlie the development of atherosclerosis [1]. The concurrence of hypertriglyceridemia and low HDL cholesterol usually promote the formation of small dense LDL (sdLDL) particles. This set of features, known as diabetic dyslipidemia, is partly for environmental reasons but also has a significant genetic component [3]. The predominance of sdLDL is known as LDL subfraction phenotype B, in contrast to phenotype A, which is characterized by large buoyant LDL particles. Phenotype A is predominant in normolipemic subjects with low CVR, whereas phenotype B

* Correspondence: jsanchezq@santpau.cat; aperez@santpau.cat

¹Biomedical Research Institute IIB Sant Pau, Cardiovascular Biochemistry Group, C/ Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain

²Endocrinology and Nutrition Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Mas Casanovas, 90, 08041 Barcelona, Spain

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

is associated with pathological situations with increased CVR, including type 2 diabetes [4].

Other pathological features, such as hyperglycemia, lipoperoxidation and systemic inflammation are exacerbated in diabetes. These processes alter the lipoprotein function [5], favoring the formation of modified forms of LDL, such as glycosylated LDL (gLDL), oxidized LDL (oxLDL) and electronegative LDL (LDL(-)). A common feature shared by gLDL and oxLDL is the increased negative electric charge. LDL(-), therefore, includes oxLDL and gLDL, but a major fraction of LDL (-) particles is generated by alternative mechanisms, such as lipolysis and non-esterified fatty acid (NEFA)-loading [6]. This heterogeneity adds value to the measurement of LDL(-), which can be considered as a pool of modified LDL particles in plasma. The proportion of oxLDL, gLDL and LDL(-) is increased in subjects with high CVR, including diabetes [7]. These modified LDLs have a high content of lipid metabolites with high inflammatory potential, including lysophospholipids, whose concentration is increased in diabetes [8].

Diabetes also alters normal HDL function. The antiatherogenic properties of HDL, including its key role in reverse cholesterol transport and its antioxidant properties, are disturbed in these patients [9]. Both functions are modulated by changes in the relative composition of lipids and proteins in HDL, and also by enzymatic activities associated to HDL, such as paraoxonase 1 (PON1) and lipoprotein-associated phospholipase A2 ((Lp-PLA2), also known as platelet-activating factor acetylhydrolase). PON1 is exclusively bound to HDL and it has been suggested that it has an antioxidant function by deactivating lipid peroxides [10]. In contrast to PON1, Lp-PLA2 can associate with HDL, LDL and VLDL. Controversy exists as to whether Lp-PLA2 has a pro- or anti-inflammatory action. It has been recently suggested that the relative distribution of Lp-PLA2 between LDL and HDL determines its pro- or anti-inflammatory action. According to this assumption, Lp-PLA2 in HDL is anti-inflammatory whereas Lp-PLA2 associated to apoB-containing lipoproteins is pro-inflammatory [11]. For this reason, the relative distribution of Lp-PLA2, rather than its total activity, could be a better CVR marker.

In vitro studies have shown that sdLDL is prone to modification and it is also known that HDL from patients with type 2 diabetes has an impaired function. However, to our knowledge, no previous study has compared diabetic patients with phenotype A and phenotype B. This would allow specifically assessing the impact of LDL subfraction phenotype on the distribution of Lp-PLA2 and other qualitative characteristics of HDL and LDL. The aim of the current work was to quantify modified forms of LDL, to study the composition of HDL and to determine the distribution of Lp-PLA2 in patients with poorly-controlled type 2

diabetes who were classified according to their LDL subfraction phenotype.

Methods

Study population

One hundred twenty two consecutive poor controlled type 2 diabetes subjects who attended the outpatient diabetic clinic during 2007–2008 to optimize glycemic control were recruited. Previous hypoglycemic treatment consisted of diet (22%), oral agents (21.1%), insulin plus oral agents (29.4%) and insulin (27.5%). Regarding hypolipidemic drugs, 25.4% of patients were treated with statins or statin plus ezetimibe, 4.1% with fibrate and 2.5% with statin plus fibrate. Patients with acute or chronic infections, active inflammatory diseases or treatment with anti-inflammatory drugs were excluded. High sensibility C-reactive protein (hsCRP, Roche Diagnostics) was routinely measured and subjects with values higher than 20 mg/L were excluded from the study. Hypertension was defined as subjects with a systolic blood pressure of ≥ 140 mm Hg, with a diastolic blood pressure of ≥ 90 mm Hg, or those who were receiving antihypertensive therapy at the time of examination. Coronary Heart Disease (CHD) was defined as documented diagnosis of CHD, self-reported positive history of CHD or electrocardiogram (ECG) positive for CHD. Fifty four normoglycemic and normolipemic healthy subjects were included as control group. The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Hospital Ethics Committee. All patients and control subjects gave informed consent.

Laboratory determinations

Lipid profile, modified LDLs, HDL composition and Lp-PLA2 activity distribution were determined from plasma obtained in EDTA-containing Vacutainer tubes. PON1 activity was determined from sera obtained in non-additive Vacutainer tubes. HbA1c was measured by ion-exchange high-performance liquid chromatography (HPLC; Variant, Bio-Rad).

Lipid profile included total cholesterol (Roche) and triglyceride (Roche), very-low density lipoprotein (VLDL), LDL and HDL cholesterol, total non-esterified fatty acids (NEFA) (Wako), apoB (Roche), apoA-I (Roche) and apoA-II (Kamiya Biomedical). Cholesterol of lipoprotein fractions was measured using a direct method to quantify HDL cholesterol (HDL-C plus, Roche) or by ultracentrifugation when the triglyceride concentration was higher than 3 mmol/L, according to NCEP recommendations [12]. All determinations were performed in a Hitachi 917 autoanalyzer.

LDL size was determined by non-denaturing polyacrylamide gradient (2–16%) gel electrophoresis (GGE), as described [13]. LDL subfraction phenotype B was defined by a predominant LDL diameter lower than 25.5

Table 1 Anthropometrics, clinical characteristics and lipid profile of patients with type 2 diabetes and control subjects

	Type 2 diabetes phenotype A (n = 77)	Type 2 diabetes phenotype B (n = 45)	Control group (n = 54)	ANOVA p-value
Age (years)	60 ± 11	56 ± 11 ^a	56 ± 14 ^a	0.108
Male (%)	65.9	64.6	57.4 ^{a, b}	<0.001
BMI (kg/m ²)	29.6 ± 6.2	31.1 ± 4 ^a	25.9 ± 3.6 ^{a, b}	<0.001
Waist (cm)	104 ± 15	108 ± 13 ^a	92 ± 11 ^{a, b}	<0.001
Diabetes duration (years)	12 ± 11	9 ± 8 ^a	-	
Insulin use (%)	58	52 ^a	-	
Lipid lowering drugs (%)	30	28	-	
HbA1c (%)	9.1 ± 2.1	9.6 ± 2.3 ^a	5.3 ± 0.6 ^{a, b}	<0.001
Hypertension (%) ¹	69.4	68.2	-	
Retinopathy (%)	29.6	29.5	-	
Albuminuria (%)	24	29.6 ^a	-	
Coronary heart disease (%) ²	5.6	15.9 ^a	-	
Total cholesterol (mmol/L)	4.78 ± 1.09	5.64 ± 1.53 ^a	5.00 ± 0.79 ^b	0.004
Triglycerides (mmol/L)	1.46 ± 0.79	3.89 ± 3.30 ^a	0.87 ± 0.37 ^{a, b}	<0.001
VLDLc (mmol/L)	0.65 ± 0.30	1.43 ± 1.12 ^a	0.40 ± 0.17 ^{a, b}	<0.001
LDLc (mmol/L)	2.86 ± 0.95	3.10 ± 0.96 ^a	2.94 ± 0.66 ^b	0.281
HDLc (mmol/L)	1.28 ± 0.33	1.02 ± 0.27 ^a	1.64 ± 0.37 ^{a, b}	<0.001
NEFA (mmol/L)	0.64 ± 0.29	0.90 ± 0.48	0.41 ± 0.19 ^{a, b}	<0.001
apoB (g/L)	0.93 ± 0.32	1.09 ± 0.28 ^a	0.80 ± 0.19 ^{a, b}	<0.001
apoA-I (g/L)	1.46 ± 0.24	1.37 ± 0.25 ^a	1.57 ± 0.31 ^{a, b}	0.001
apoA-II (g/L)	0.33 ± 0.07	0.34 ± 0.06	0.35 ± 0.05	0.081
LDL size (nm)	26.0 ± 0.4	25.0 ± 0.4 ^a	26.3 ± 0.1 ^b	<0.001

^a, P < 0.05 vs phenotype A patients; ^b, P < 0.05 vs phenotype B patients. ¹ Hypertension was defined as a systolic blood pressure of ≥140 mm Hg, a diastolic blood pressure of ≥90 mm Hg or those who were receiving antihypertensive therapy at the time of examination. ² Coronary Heart Disease (CHD) was defined as documented diagnosis of CHD, self-reported positive history of CHD or ECG positive for CHD.

nm, whereas phenotype A subjects had a LDL diameter higher than 25.5 nm.

oxLDL (Mercodia) and gLDL (Exocell/Glycacor) were quantified by commercial ELISA. For LDL(-) quantification, total LDL was previously isolated by sequential ultracentrifugation (density range 1.019-1.050 g/mL). LDL(-) proportion was determined from total LDL by anion-exchange chromatography in a MonoQ HR 5/5 column (GE Healthcare) using a NaCl stepwise gradient [14].

HDL was isolated by sequential ultracentrifugation (density range 1.063-1.210 g/mL), using KBr gradients. All steps were performed at 4°C and all KBr solutions contained 1 mmol/L EDTA and 2 μmol/L BHT to prevent lipoperoxidation during isolation procedures. HDL composition was determined by measuring the content of cholesterol (Roche), triglyceride (Roche), phospholipid (Wako), NEFA (Wako), apoA-I (Roche) and apoA-II (Kamiya), in a Hitachi 917 autoanalyzer.

PON-1 activity in serum was measured using phenylacetate as substrate, as described [15]. Lp-PLA2 activity was measured using 2-thio-PAF (Cayman) as substrate,

according to the manufacturer's instructions [16]. To determine the distribution of Lp-PLA2 between lipoprotein fractions, apoB-containing lipoproteins were precipitated from serum using dextran sulfate, as described [17]. Briefly, 200 μL of serum were mixed with 50 μL of dextran sulfate reagent, incubated for 5 min at room temperature, and centrifuged for 10 min at 10,000 g. The supernatant (depleted of apoB-containing lipoproteins) was collected and assayed for HDL-associated Lp-PLA2 activity.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 19 (SPSS Inc). Before statistical analysis, normal distribution and homogeneity of the variances were tested using Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. Data that were not normally distributed were logarithmically transformed before analysis. Analysis of variables was performed by one-way analysis of variance (ANOVA). ANCOVA test was used to assess if the differences seen in ANOVA persisted after adjustment for triglycerides and HbA1c. Differences between two groups

Table 2 Modified LDLs, HDL composition and Lp-PLA2 activity in patients with type 2 diabetes and control subjects

	Type 2 diabetes phenotype A (n = 77)	Type 2 diabetes phenotype B (n = 45)	Control group (n = 54)	ANOVA p-value
Modified LDL				
Oxidized LDL (U/L)	61.4 ± 20.0	78.6 ± 26.7 ^a	51.2 ± 19.3 ^{a,b}	0.005
Glycated LDL (mg/dL)	2.17 ± 0.94	2.77 ± 1.41 ^a	1.85 ± 0.73 ^{a,b}	0.030
LDL(-) (%)	7.6 ± 3.5	7.7 ± 3.1	6.1 ± 2.0 ^{a,b}	0.017
HDL composition				
Cholesterol (%) ¹	17.1 ± 2.3	15.6 ± 3.0 ^a	17.3 ± 2.3 ^b	0.204
Triglycerides (%)	4.3 ± 1.7	6.7 ± 1.9 ^a	3.1 ± 1.0 ^{a,b}	<0.001
Phospholipids (%)	33.5 ± 4.3	31.3 ± 3.3 ^a	32.8 ± 3.7	0.076
apoA-I (%)	31.9 ± 5.8	32.8 ± 6.3	34.3 ± 5.7 ^{a,b}	0.193
apoA-II (%)	13.2 ± 3.4	13.6 ± 2.6	12.5 ± 2.9 ^{a,b}	0.265
NEFA(mol/mol apoA-I)	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.9	0.907
Ratio lipid/protein	1.20 ± 0.28	1.19 ± 0.27	1.16 ± 0.27 ^{a,b}	0.539
Ratio A-I/A-II	2.61 ± 0.92	2.54 ± 0.81	2.98 ± 1.12 ^{a,b}	0.112
Ratio chol/trigl	4.65 ± 2.19	2.57 ± 0.91	6.32 ± 2.68 ^{a,b}	<0.001
PON1 activity (μmol/min/mL)	78.5 ± 25.5	82.6 ± 25.5	82.5 ± 23.1	0.152
Lp-PLA2 activity(μmol/min/mL)				
Total Lp-PLA2	20.1 ± 6.6	23.0 ± 7.2 ^a	19.1 ± 6.2 ^b	0.627
HDL-Lp-PLA2	6.8 ± 2.7	7.1 ± 3.5	6.2 ± 2.6	0.995
apoB-associated-Lp-PLA2	13.3 ± 4.8	15.9 ± 4.6 ^a	12.9 ± 3.3 ^b	0.539
% HDL-Lp-PLA2	33.9 ± 10.5	30.9 ± 11.4 ^a	32.4 ± 10.6	0.510
% apoB-associated-Lp-PLA2	66.1 ± 19.4	69.1 ± 21.2 ^a	67.6 ± 19.8	0.510

^a, P < 0.05 vs phenotype A patients; ^b, P < 0.05 vs phenotype B patients.

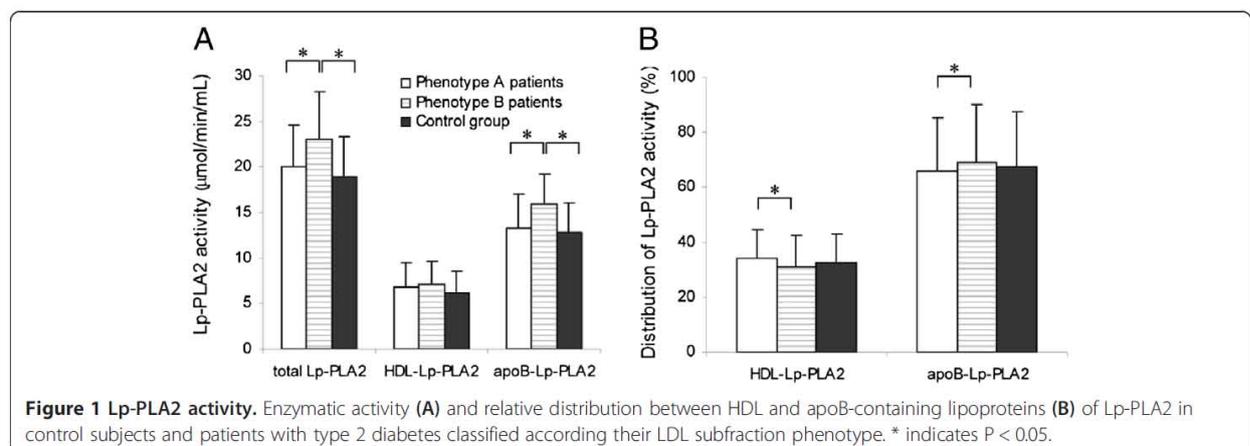
¹ Composition is expressed as the percentage of the mass of cholesterol, triglycerides, phospholipids, apoA-I and apoA-II.

were compared using the Student's T test for unpaired data (variables with normal distribution) or the Mann-Whitney U test (variables with non-normal distribution). Correlations between parameters were analyzed using the Pearson R test for variables with normal distribution and the Spearman test for variables with non-normal distribution.

Data are expressed as mean ± SD. P < 0.05 was considered significant.

Results

Table 1 shows anthropometrics, clinical characteristics and lipid profile of patients and controls. One third (n = 45) of



patients with type 2 diabetes presented phenotype B (LDL size < 25.5 nm), in contrast to the control group in which all subjects (n = 54) had phenotype A. Table 1 shows the lipid profile of patients with type 2 diabetes and control subjects. Both groups of patients had higher plasma levels of triglyceride, VLDL cholesterol, apoB and NEFA and lower concentration of HDL cholesterol and apoA-I than control subjects. The lipid profile was worse in patients with phenotype B. The differences observed in the two groups of patients compared to controls were larger in phenotype B patients, who also presented higher total cholesterol and LDL cholesterol than controls. The differences between phenotype A and phenotype B patients included higher total cholesterol, triglyceride, VLDLc, LDLc, apoB and lower HDLc and apoA-I in patients with phenotype B than in patients with phenotype A (Table 1).

Regarding modified LDLs, both groups of patients had higher plasma concentration of oxLDL, gLDL and LDL(-) than control subjects (Table 2). oxLDL and gLDL concentrations were higher in patients with phenotype B than in patients with phenotype A. In contrast, the proportion of LDL(-) was similar between both groups of patients.

The composition analysis of isolated HDL particles showed that both groups of patients had an abnormal composition compared to control samples (Table 2), with some of these alterations being stronger in patients with phenotype B. Differences between patients with phenotype B and controls included a lower content of cholesterol and apoA-I, and a higher content of triglycerides and apoA-II. Similar differences were observed when controls were compared with patients with phenotype A, except that cholesterol content was similar in both groups. As a consequence, the apoA-I/apoA-II ratio was lower and the lipid/protein ratio was higher in HDL from both groups of patients than in control subjects. Both ratios were similar in patients with phenotype A and phenotype B. These observations suggest that HDL in both groups of patients with diabetes has lower density and larger size than HDL in control subjects. Regarding PON1 activity, no difference was observed.

Total and apoB-associated Lp-PLA2 activity was higher in patients with phenotype B than in control subjects and in patients with phenotype A, and was similar in the two latter groups (Table 2, Figure 1A). No statistical difference was observed in the HDL-associated Lp-PLA2 activity. Consequently, the distribution of Lp-PLA2 between HDL and apoB-containing lipoproteins (Table 2, Figure 1B) was different between patients with phenotype A and those with phenotype B. The latter had lower proportion of Lp-PLA2 in HDL and higher proportion in apoB-containing lipoproteins than in patients with phenotype A.

Covariance analysis (ANCOVA) showed that the differences seen in apoB and gLDL disappeared after adjusting for TG. Differences observed in LDL(-) and oxLDL lost

their significance after adjusting for HbA1c and TG (data not shown). These associations are expected and underline the known relation of LDL(-) and oxLDL with the presence of diabetes and hypertriglyceridemia, and of apoB and gLDL with hypertriglyceridemia. Table 3 shows the correlation analysis of LDL size with lipid profile, modified LDLs, HDL composition and Lp-PLA2 activity. In diabetic patients, significant correlations with the parameters of lipid profile were similar to those previously reported: LDL size correlated negatively with triglycerides, cholesterol, VLDLc, apoB and NEFA, and positively with HDLc and apoA-I. LDL size also correlated negatively with oxLDL and gLDL. Regarding HDL composition, LDL size correlated positively with the content of phospholipids, cholesterol and Lp-PLA2, and negatively with the content of triglycerides and apoA-I. The correlation analysis of the control group showed some differences compared to diabetic patients. Most of correlations observed between LDL

Table 3 Correlation analysis of LDL size with lipid profile, modified LDLs, HDL composition and Lp-PLA2 activity in patients with type 2 diabetes and control subjects

	DM2 patients		Control subjects	
	R	P	R	P
HbA1c	-0.160	0.071	-0.103	0.601
Insulin	-0.076	0.418	0.008	0.937
Total cholesterol	-0.185	0.035	-0.326	0.016
Triglycerides	-0.553	< 0.001	-0.427	0.001
VLDLc	-0.513	< 0.001	-0.423	0.001
LDLc	-0.152	0.083	-0.333	0.014
HDLc	0.407	< 0.001	0.096	0.491
NEFA	-0.226	0.004	-0.042	0.765
apoB	-0.246	0.005	-0.458	< 0.001
apoA-I	0.264	0.002	-0.033	0.811
apoA-II	-0.068	0.472	-0.099	0.476
Oxidized LDL	-0.390	< 0.001	-0.472	< 0.001
Glycated LDL	-0.273	0.003	-0.151	0.307
LDL(-)	-0.020	0.828	0.030	0.849
Cholesterol in HDL	0.321	0.002	0.208	0.244
Triglycerides in HDL	-0.398	< 0.001	-0.150	0.405
Phospholipids in HDL	0.437	< 0.001	0.067	0.712
apoA-I in HDL	-0.205	0.047	0.086	0.635
apoA-II in HDL	-0.169	0.103	-0.069	0.739
NEFA in HDL	-0.010	0.925	0.086	0.635
PON1	0.016	0.867	0.024	0.872
Total Lp-PLA2 activity	-0.123	0.172	0.025	0.862
HDL-Lp-PLA2 activity	0.030	0.745	0.061	0.680
% of HDL-Lp-PLA2	0.191	0.034	0.064	0.662

Bold type indicates the loss of statistical significance in the control group compared to diabetic patients.

size and lipid profile were similar to that in DM2 patients, except the positive correlation with HDLc and the negative correlation with plasma NEFA, which were lost in the control group. The negative correlation with gLDL as well as the correlations with some HDL components also were lost in control subjects. These observations suggest that the influence of LDL size on HDL composition and gLDL is stronger in diabetic patients than in control subjects.

Discussion

Several authors have reported differences in the qualitative characteristics of HDL and LDL between diabetic and healthy subjects. However, most of these studies analyzed separately LDL and HDL and, despite the high prevalence of LDL phenotype B in type 2 diabetes, these characteristics have not been usually compared classifying diabetic subjects according to their LDL subfraction phenotype. Regarding Lp-PLA2, its distribution has been analyzed comparing LDL phenotypes only in one study [18], but not in patients with diabetes. The novelty of our study is to analyze simultaneously oxLDL, gLDL, LDL(-), HDL composition and distribution of Lp-PLA2 in patients with type 2 diabetes classified according to LDL phenotype.

Results in the current study concur with previous findings reporting that oxLDL, gLDL and LDL(-) are increased in diabetes [7,19,20]. Our data show that oxLDL and gLDL are increased in patients with phenotype A compared to control subjects, but this situation is more marked in patients with phenotype B. The high concentration of oxLDL and gLDL observed in patients with phenotype B could be attributed to several mechanisms. It is known that sdLDL has an impaired plasma clearance, which could lead to increased residence time in blood and favor further modifications. This could be related to the high susceptibility to oxidation and to non-enzymatic glycosylation that has been demonstrated both "in vitro" and "in vivo" in sdLDL particles [5]. In this context, it is worthy mentioning the work by Younis et al., who recently reported that sdLDL concentration is an even stronger determinant of LDL glycation than hyperglycemia [21]. However, differences in oxLDL and gLDL between patients with phenotype A and control subjects still remained significant. Therefore, factors other than LDL size could account for these differences. First, hyperglycemia and increased oxidative stress, which are hallmarks of diabetes, affect circulating LDL, even in patients with phenotype A. Another possible explanation is related to the altered composition of HDL observed in both groups of patients with type 2 diabetes. Our results indicate that HDL composition was abnormal in both groups of patients, although alterations were stronger in phenotype B patients. These differences included apoA-I/apoA-II and lipid/protein ratios. A decrease of apoA-I in HDL with a concomitant increase of apoA-II produces particles with

lower antioxidant capacity [15]. Likewise, higher lipid/protein ratio suggests an impairment of the antioxidant properties of HDL, since the HDL3 subfraction (with lower lipid/protein ratio) has a stronger antioxidant capacity than the HDL2 subfraction (with higher lipid/protein ratio) [22].

The alterations in the composition of HDL from patients with diabetes also point to a decreased ability to promote reverse cholesterol transport. An increased triglyceride and decreased cholesterol content in HDL has been related with impaired cholesterol efflux from adipose and hepatic cells [23]. This alteration was present in HDL isolated from our patients and could be indicative of such impairment. This would be pronounced in diabetic subjects with phenotype B in which the ratio cholesterol/triglyceride in HDL is 2.5-fold lower than in control subjects.

Although the concentration of oxLDL and gLDL was increased in patients with phenotype B, the relative content of LDL(-) was not affected by the presence of sdLDL particles, because there was no difference between phenotype A and phenotype B patients. This observation suggests that although oxidation and glycosylation could be partially involved in the generation of LDL(-), these would not be the major mechanisms in diabetes. Other mechanism involved in the formation of LDL(-) in diabetes is NEFA-loading, [14]. As a consequence, the increased plasma level of NEFA is probably a major cause of increased LDL(-) in diabetes.

The role of Lp-PLA2 in atherogenesis is controversial. Lp-PLA2 is thought to play a role in the prevention of oxidative modifications [24], but it has been positively associated to coronary heart disease. Most epidemiological studies have found a relationship between Lp-PLA2 and coronary events or ischemic stroke [25]. However, Lp-PLA2 shows a strong association with total and LDL cholesterol levels, and there is no definitive agreement regarding whether this biomarker is independent from LDL concentration [26]. Few studies have been performed in patients with type 2 diabetes and results are controversial. Nelson et al. recently reported that Lp-PLA2 predicts future risk of incident type 2 diabetes [27], but the Rotterdam Study did not find an association between the presence of diabetes and total Lp-PLA2 activity [28]. Regarding the association of Lp-PLA2 with cardiovascular disease, Hatoum et al. described that Lp-PLA2 activity was associated with incident coronary heart disease in patients with type 2 diabetes [29], but Nelson et al. reported that the Lp-PLA2 activity did not explain the excess of cardiovascular risk in diabetes [30]. To further complicate the matter, Kizer et al. found divergent associations between Lp-PLA2 activity and Lp-PLA2 mass and the risk of cardiovascular disease in a population with high prevalence of diabetes [31]. These authors suggest that a possible explanation for these paradoxical findings could be related to the distribution of Lp-PLA2 among lipoprotein

classes. However, only three studies have previously analyzed the distribution of Lp-PLA2 between lipoproteins in diabetes. Kujiraoka et al. reported that, although no difference was observed in total Lp-PLA2 activity between patients with diabetes and control subjects, Lp-PLA2 distribution was altered in the former, with a lower proportion bound to HDL [32]. In a recent study, Mitsutake et al. obtained similar results in diabetic patients and also found that Lp-PLA2 in HDL was lower in subjects with increased coronary artery calcification [33]. Finally, Onat et al., which measured Lp-PLA2 mass, agreed with these authors and also found decreased content of this enzyme in HDL from diabetic patients [34]. However, none of these studies took into account the presence of phenotype B. Our data indicate that increased total Lp-PLA2 activity and abnormal distribution of Lp-PLA2 is strongly dependent on the presence of LDL subfraction phenotype B. The higher content of Lp-PLA2 in apoB-containing lipoproteins from patients with phenotype B is probably due to the higher affinity of this enzyme for the binding to sdLDL particles than to large, buoyant LDL particles [18]. The observation that Lp-PLA2 has a lower content in HDL from patients with phenotype B than from those with phenotype A concurs with the concept that this enzyme has an antioxidant role when is bound to HDL [35]. This could account for the increased concentration of oxLDL in diabetic patients with phenotype B.

Conclusions

Our data agree with previous reports of alterations in the qualitative characteristics of LDL and HDL in patients with type 2 diabetes and demonstrate that some, but not all, of these abnormalities, are closely related to the presence of LDL subfraction phenotype B. Specifically, a high concentration of oxLDL and gLDL and a higher content of Lp-PLA2 in apoB-containing lipoproteins are favored by the presence of sdLDL particles. In addition, alterations observed in the composition of HDL from patients with phenotype B were stronger than in patients with phenotype A. The relevance of these results resides in the high prevalence of phenotype B among patients with poorly-controlled type 2 diabetes. Therapies focused on changing the LDL subfraction phenotype, such as fibrates [36] or glycemic optimization [37], would improve some qualitative pro-atherogenic characteristics of LDL and help to lower the increase in CVR present in type 2 diabetes.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

J.L.S-Q. conceived of the study, wrote the manuscript and researched data. I.V. selected patients and reviewed the manuscript. E.J-F. researched data and reviewed the manuscript. J.S-H performed statistical analysis and reviewed the manuscript. R.B. researched data. F.B-V participated in the design of the study, contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. J.O-L. participated in the design of the study, contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. A.P. conceived of the study, selected

patients and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Spanish Ministry of Health (ISCIII/FIS) P105/0500, P105/2099 and P110/00265. JLS-Q is supported by ISCIII/FIS CP06/0220. JLS-Q, FB-V and JO-L are members of the Quality Research Group 2009-SGR-1205 from Generalitat de Catalunya. JS-H, FB-V and A.P. are members of CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) from ISCIII. The authors are grateful to Carolyn Newey (IIB Sant Pau) for editorial assistance.

Author details

¹Biomedical Research Institute IIB Sant Pau, Cardiovascular Biochemistry Group, C/ Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain. ²Endocrinology and Nutrition Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Mas Casanovas, 90, 08041 Barcelona, Spain. ³CIBER for the Study of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Barcelona, Spain. ⁴Metabolic Factors of Cardiovascular Risk Group, Biomedical Research Institute IIB Sant Pau, Barcelona, Spain. ⁵Biochemistry and Molecular Biology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain.

Received: 6 June 2013 Accepted: 3 August 2013

Published: 5 August 2013

References

1. Witztum JL: Role of modified lipoproteins in diabetic macroangiopathy. *Diabetes* 1997, **46**(Suppl 2):S112-S114.
2. Toth PP, Simko RJ, Palli SR, Koselleck D, Quimbo RA, Cziraky MJ: The impact of serum lipids on risk for microangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 2012, **11**:109.
3. Pollin TI, Isakova T, Jablonski KA, De Bakker PI, Taylor A, McAteer J, Pan Q, Horton ES, Delahanty LM, Altshuler D, et al: Genetic modulation of lipid profiles following lifestyle modification or metformin treatment: the Diabetes Prevention Program. *PLoS Genet* 2012, **8**(8):e1002895.
4. Krauss RM: Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004, **27**(6):1496-1504.
5. Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN: Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol* 2008, **19**(4):378-384.
6. Sanchez-Quesada JL, Benitez S, Ordonez-Llanos J: Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2004, **15**(3):329-335.
7. Sanchez-Quesada JL, Perez A, Caixas A, Rigla M, Payes A, Benitez S, Ordonez-Llanos J: Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**(7):3243-3249.
8. Ha CY, Kim JY, Paik JK, Kim OY, Paik YH, Lee EJ, Lee JH: The association of specific metabolites of lipid metabolism with markers of oxidative stress, inflammation and arterial stiffness in men with newly diagnosed type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012, **76**(5):674-682.
9. Kontush A, Chapman MJ: Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol* 2010, **21**(4):312-318.
10. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B: The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004, **4**(4):211-217.
11. Rosenson RS, Stafforini DM: Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2. *J Lipid Res* 2012, **53**(9):1767-1782.
12. Wagner AM, Perez A, Zapico E, Ordonez-Llanos J: Non-HDL cholesterol and apolipoprotein B in the dyslipidemic classification of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2003, **26**(7):2048-2051.
13. Sanchez-Quesada JL, Benitez S, Otal C, Franco M, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J: Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J Lipid Res* 2002, **43**(5):699-705.
14. Benitez S, Sanchez-Quesada JL, Lucero L, Arcelus R, Ribas V, Jorba O, Castellvi A, Alonso E, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J: Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis* 2002, **160**(1):223-232.

15. Ribas V, Sanchez-Quesada JL, Anton R, Camacho M, Julve J, Escola-Gil JC, Vila L, Ordonez-Llanos J, Blanco-Vaca F: **Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential.** *Circ Res* 2004, **95**(8):789–797.
16. Benitez S, Sanchez-Quesada JL, Ribas V, Jorba O, Blanco-Vaca F, Gonzalez-Sastre F, Ordonez-Llanos J: **Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction.** *Circulation* 2003, **108**(1):92–96.
17. De Juan-Franco E, Pérez A, Ribas V, Sanchez-Hernandez JA, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J, Sanchez-Quesada JL: **Standardization of a method to evaluate the antioxidant capacity of high-density lipoproteins.** *Int J Biomed Sci* 2009, **5**(4):402–410.
18. Gazi I, Lourida ES, Filippatos T, Tsimihodimos V, Elisaf M, Tselepis AD: **Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of small, dense LDL particles in human plasma.** *Clin Chem* 2005, **51**(12):2264–2273.
19. Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Bang H, Heiss G, Duncan BB, Folsom AR, Pankow JS: **Circulating oxidised low-density lipoprotein and intercellular adhesion molecule-1 and risk of type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study.** *Diabetologia* 2007, **50**(1):36–42.
20. Cohen MP, Lautenslager G, Shea E: **Glycated LDL concentrations in non-diabetic and diabetic subjects measured with monoclonal antibodies reactive with glycated apolipoprotein B epitopes.** *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993, **31**(11):707–713.
21. Younis NN, Soran H, Sharma R, Charlton-Menys V, Greenstein A, Elseweidy MM, Durrington PN: **Small-dense LDL and LDL glycation in metabolic syndrome and in statin-treated and non-statin-treated type 2 diabetes.** *Diab Vasc Dis Res* 2010, **7**(4):289–295.
22. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ: **Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, **23**(10):1881–1888.
23. Camont L, Chapman MJ, Kontush A: **Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease.** *Trends Mol Med* 2011, **17**(10):594–603.
24. Zalewski A, Macphee C: **Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(5):923–931.
25. Koenig W, Khuseyinova N: **Lipoprotein-associated and secretory phospholipase A2 in cardiovascular disease: the epidemiological evidence.** *Cardiovasc Drugs Ther* 2009, **23**(1):85–92.
26. Bhatti S, Hakeem A, Cilingiroglu M: **Lp-PLA(2) as a marker of cardiovascular diseases.** *Curr Atheroscler Rep* 2010, **12**(2):140–144.
27. Nelson TL, Biggs ML, Kizer JR, Cushman M, Hokanson JE, Furberg CD, Mukamal KJ: **Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) and future risk of type 2 diabetes: results from the Cardiovascular Health Study.** *J Clin Endocrinol Metab* 2012, **97**(5):1695–1701.
28. Oei HH, Van Der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM, Witteman JC: **Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study.** *Circulation* 2005, **111**(5):570–575.
29. Hatoum IJ, Hu FB, Nelson JJ, Rimm EB: **Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and incident coronary heart disease among men and women with type 2 diabetes.** *Diabetes* 2010, **59**(5):1239–1243.
30. Nelson TL, Kaminen A, Psaty B, Cushman M, Jenny NS, Hokanson J, Furberg C, Mukamal KJ: **Lipoprotein-associated phospholipase A2 and future risk of subclinical disease and cardiovascular events in individuals with type 2 diabetes: the Cardiovascular Health Study.** *Diabetologia* 2011, **54**(2):329–333.
31. Kizer JR, Umans JG, Zhu J, Devereux RB, Wolfert RL, Lee ET, Howard BV: **Lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity and risk of cardiovascular disease in a population with high prevalences of obesity and diabetes: the Strong Heart Study.** *Diabetes Care* 2012, **35**(4):840–847.
32. Kujiraoka T, Iwasaki T, Ishihara M, Ito M, Nagano M, Kawaguchi A, Takahashi S, Ishi J, Tsuji M, Egashira T, *et al.*: **Altered distribution of plasma PAF-AH between HDLs and other lipoproteins in hyperlipidemia and diabetes mellitus.** *J Lipid Res* 2003, **44**(10):2006–2014.
33. Mitsutake R, Miura S, Zhang B, Saku K: **HDL-associated factors provide additional prognostic information for coronary artery disease as determined by multi-detector row computed tomography.** *Int J Cardiol* 2010, **143**(1):72–78.
34. Onat A, Hergenc G, Can G, Ugrur M, Nartop F: **Dual activity of serum lipoprotein-associated phospholipase A2) yielding positive and inverse associations with cardiometabolic risk.** *Clin Chem Lab Med* 2011, **49**(8):1349–1357.
35. Rallidis LS, Tellis CC, Lekakis J, Rizos I, Varounis C, Charalampopoulos A, Zolindaki M, Dargès N, Anastasiou-Nana M, Tselepis AD: **Lipoprotein-associated phospholipase A2 bound on high-density lipoprotein is associated with lower risk for cardiac death in stable coronary artery disease patients: a 3-year follow-up.** *J Am Coll Cardiol* 2012, **60**(20):2053–2060.
36. Wagner AM, Jorba O, Bonet R, Ordonez-Llanos J, Perez A: **Efficacy of atorvastatin and gemfibrozil, alone and in low dose combination, in the treatment of diabetic dyslipidemia.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**(7):3212–3217.
37. Sanchez-Quesada JL, Vinagre I, De Juan-Franco E, Sanchez-Hernandez J, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J, Perez A: **Effect of improving glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus on low-density lipoprotein size, electronegative low-density lipoprotein and lipoprotein-associated phospholipase A2 distribution.** *Am J Cardiol* 2012, **110**(1):67–71.

doi:10.1186/1475-2840-12-112

Cite this article as: Sánchez-Quesada *et al.*: Impact of the LDL subfraction phenotype on Lp-PLA2 distribution, LDL modification and HDL composition in type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2013 **12**:112.

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Effect of Improving Glycemic Control in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus on Low-Density Lipoprotein Size, Electronegative Low-Density Lipoprotein and Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Distribution

José L. Sánchez-Quesada, PhD^{a,*}, Irene Vinagre, MD^b, Elena de Juan-Franco, BS^a,
Juan Sánchez-Hernández, MD, PhD^c, Francisco Blanco-Vaca, MD, PhD^{a,c,d},
Jordi Ordóñez-Llanos, MD, PhD^{a,d}, and Antonio Pérez, MD, PhD^{b,c,*}

The aim of this study was to determine the effect of intensified hypoglycemic therapy in patients with type 2 diabetes mellitus on the distribution of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity between high-density lipoprotein and low-density lipoprotein (LDL) and its relation with the lipid profile and other qualitative properties of LDL. Forty-two patients with type 2 diabetes on the basis of poor glycemic control and normal or near normal LDL cholesterol were recruited. Lifestyle counseling and pharmacologic hypoglycemic therapy were intensified to improve glycemic control, but lipid-lowering therapy was unchanged. At 4 ± 2 months, glycosylated hemoglobin had decreased by a mean of 2.1%, but the only effect on the lipid profile were statistically significant decreases in nonesterified fatty acids and apolipoprotein B concentration. LDL size increased and the proportion of electronegative LDL decreased significantly. In parallel, total Lp-PLA2 activity decreased significantly, promoting a redistribution of Lp-PLA2 activity toward a higher proportion in high-density lipoprotein. Improvements in glycemic control led to more marked changes in Lp-PLA2 activity and distribution in patients with diabetes who had not received previous lipid-lowering therapy. In conclusion, optimizing glycemic control in patients with type 2 diabetes promotes atheroprotective changes, including larger LDL size, decreased electronegative LDL, and a higher proportion of Lp-PLA2 activity in high-density lipoprotein. © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved. (Am J Cardiol 2012;110:67–71)

The mechanism by which patients with type 2 diabetes mellitus have an increased risk for cardiovascular disease is not fully understood. It may be due partly to the lipoprotein modifications and chronic low-grade inflammation associated with diabetes.¹ These patients present atherogenic dyslipidemia, which is characterized by hypertriglyceridemia, low high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and hyper-

apolipoprotein B (apoB).² In addition, low-density lipoprotein (LDL) particles are small and dense, and indexes of LDL modification, such as lipoperoxidation and negative electric charge, are higher than in normoglycemic subjects.^{3,4} Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) has been associated with increased cardiovascular risk in general and diabetic populations.^{5,6} Lp-PLA2 is transported in blood by lipoproteins, and it has been suggested that it may play an atherogenic role when bound to LDL but an atheroprotective role when bound to HDL.⁷ An abnormal distribution of Lp-PLA2, with a relatively lower content in HDL, has been reported in combined hyperlipidemia and diabetes.⁸ This could be related to the preferential association of Lp-PLA2 in small, dense LDL⁹ and electronegative LDL particles.¹⁰ Statins and nonstatin lipid-lowering drugs reduce the Lp-PLA2 plasma concentration in parallel with a reduction in LDL cholesterol level.¹¹ Glycemic control improves the quantitative features of atherogenic dyslipidemia.¹² No study has examined the specific effect of glycemic optimization on the qualitative abnormalities of LDL or changes in Lp-PLA2 distribution in subjects with type 2 diabetes. In the present study, we aimed to assess the effect of glycemic control improvement on Lp-PLA2

^aBiochemistry Department and ^bEndocrinology and Nutrition Department, Biomedical Research Institute IIB; ^cCIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas; and ^dBiochemistry and Molecular Biology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Barcelona, Spain. Manuscript received December 14, 2011; revised manuscript received and accepted February 21, 2012.

This work was supported by Grants PI05/2099, PI06/0500, and PI10/00265 from the Spanish Ministry of Health. Dr. Sánchez-Quesada is supported by Grant CP06/0220 from the Spanish Ministry of Health. Drs. Sánchez-Quesada, Blanco-Vaca, and Ordóñez-Llanos are members of Quality Research Group 2009-SGR-1205 from Generalitat de Catalunya. Drs. Blanco-Vaca, Sánchez-Hernández, and Pérez are members of CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas of the Spanish Ministry of Health.

*Corresponding authors: Tel: 34-932919000 ext. 8076; fax: 34-935565602.

E-mail addresses: jsanchezq@santpau.cat (J.L. Sánchez-Quesada); aperez@santpau.cat (A. Pérez).

Table 1
Anthropometric and clinical characteristics of patients with type 2 diabetes mellitus before and after glycemic optimization (n = 42)

Variable	Baseline	After Glycemic Optimization
Women/men	15/27	—
Age (years)	61 ± 12	—
Diabetes duration (years)	37 ± 14	—
Retinopathy	59.0%	—
Coronary heart disease	17.9%	—
Insulin use	75.0%	85.7%
Cholesterol-lowering medication	59.5%	59.5%
Body mass index (kg/m ²)	29.0 ± 5.8	28.8 ± 6.0
Glycosylated hemoglobin (%)	9.6 ± 1.8	7.4 ± 0.8*

Data are expressed as numbers, percentages, or mean ± SD.

* Statistically significant (p < 0.05).

concentration and distribution and its relation with LDL size and indexes of LDL modification.

Methods

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The study included 42 patients with type 2 diabetes recruited consecutively from the diabetes clinic on the basis of poor glycemic control, defined as glycosylated hemoglobin >8.5%, and recommended or near-to-recommended LDL cholesterol, defined as LDL cholesterol <3.4 mmol/L (<130 mg/dl) according to National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III recommendations. Patients' anthropometric and clinical characteristics are listed in Table 1. Previous treatment consisted of oral hypoglycemic agents (5 patients), oral hypoglycemic agents plus basal insulin (7 patients) ≥2 doses of insulin with or without metformin (26 patients), and no previous treatment (4 patients). Regarding hypolipidemic drugs, 21 patients were treated with statins and 2 with statin plus ezetimibe. All patients were treated for their diabetes in a clinical practice setting. Treatment included lifestyle counseling and intensification of pharmacologic hypoglycemic therapy with oral agents (metformin or metformin plus sulfonyleurea) in 6 patients, insulin therapy in 31 patients, and both (insulin plus metformin or insulin plus metformin and sulfonyleurea) in 5 patients. Lipid-lowering therapy was unchanged. All participants attended a specific diabetes education program and were visited in the outpatient unit every 2 to 4 weeks. Assessment was carried out at baseline and after 3 to 6 months of treatment intensification. The study was approved by the hospital's ethics committee, and all patients gave informed consent. All analyses were performed using fasting plasma obtained in Vacutainer tubes (BD, Franklin Lakes, New Jersey) containing ethylenediaminetetraacetic acid. The basic lipid profile was obtained using fresh samples. All other analyses were performed using ethylenediaminetetraacetic acid-plasma samples frozen at -80°C for <4 months. To minimize interassay variability, samples from the same subject were analyzed in the same batch. The variability of these methods has been reported elsewhere.^{10,13-15}

Lipid profiles included total cholesterol, triglyceride, very low density lipoprotein cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, nonesterified fatty acids, apoB, and apo-

lipoprotein A-I (all reagents were from Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland, except nonesterified fatty acids, from Wako Chemicals, Neuss, Germany). Cholesterol in lipoprotein fractions was measured using a direct method that quantifies HDL cholesterol (HDL-C Plus; Roche Diagnostics GmbH), according to the National Cholesterol Education Program recommendations. All determinations were carried out on a Hitachi 917 autoanalyzer (Roche Diagnostics GmbH).

LDL size was determined by nondenaturing polyacrylamide gradient (2% to 16%) gel electrophoresis, using as standard a mixture of sera with several LDL bands of known size, as previously described.¹³ LDL phenotype B was defined as a predominant LDL diameter <25.5 nm.

Oxidized LDL was quantified by commercial enzyme-linked immunosorbent assay (Oxidized LDL; Mercodia, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. The percentage of electronegative LDL was determined from total LDL by anion-exchange chromatography in a MonoQ HR 5/5 column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using a sodium chloride stepwise gradient, as previously described.¹⁶

Lp-PLA2 activity was measured using 2-thio platelet-activating factor (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan) as a substrate,¹⁰ according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as micromoles per minute per milliliter. To determine the distribution between lipoprotein fractions, apoB-containing lipoproteins (LDL plus very low density lipoprotein) were precipitated from serum using dextran sulfate, as previously described.¹⁵ Briefly, 200 μl of serum was mixed with 50 μl of dextran sulfate reagent, incubated for 5 minutes at room temperature, and centrifuged for 10 minutes at 10,000g. Twenty microliters of supernatant (containing HDL but not LDL or very low density lipoprotein) was collected and assayed for Lp-PLA2 activity.

Statistical analysis was performed using SPSS version 15 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois). Data are expressed as mean ± SD, and Kolmogorov-Smirnoff tests were used to assess the distributions of variables. Groups were compared using Student's paired *t* tests for paired data (normal distribution) or Wilcoxon's tests (non-normal distribution). Correlations between changes in each parameter were analyzed using Pearson's *R* test. A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Anthropometric and clinical characteristics of patients are listed in Table 1. After therapy intensification, glycosylated hemoglobin decreased significantly by >1% in all patients (Table 1). Lipid parameters of patients with type 2 diabetes before (baseline) and after 4 ± 2 months of hypoglycemic therapy intensification are listed in Table 2. Although the only quantitative lipid parameters that changed significantly after intensified glycemic control were plasma concentrations of nonesterified fatty acids and apoB, the decrease in glycosylated hemoglobin was correlated positively with changes in plasma triglyceride (*R* = 0.388, *p* = 0.006) and negatively with changes in HDL cholesterol (*R* = -0.552, *p* < 0.001).

The statistically significant increment in LDL size (also reflected in a higher LDL cholesterol/apoB ratio, 3.07 vs

Table 2

Lipid profile and qualitative characteristics of low-density lipoprotein in patients with type 2 diabetes mellitus before and after glycemic optimization

Variable	Baseline	After Glycemic Optimization	p Value	Percentage Change
Nonesterified fatty acids (mmol/L)	0.72 ± 0.33	0.59 ± 0.25	0.018*	-18
Triglycerides (mmol/L [mg/dl])	1.88 ± 1.77 (166 ± 156)	1.37 ± 0.74 (121 ± 65)	0.059	-27
Total cholesterol (mmol/L [mg/dl])	4.94 ± 1.23 (191 ± 48)	4.72 ± 1.13 (183 ± 44)	0.192	-4.4
HDL cholesterol (mmol/L [mg/dl])	1.24 ± 0.39 (48 ± 15)	1.27 ± 0.40 (49 ± 15)	0.270	2.4
LDL cholesterol (mmol/L [mg/dl])	2.91 ± 0.95 (113 ± 37)	2.81 ± 1.00 (109 ± 39)	0.448	-3.4
Apolipoprotein A-I (g/L)	1.45 ± 0.33	1.48 ± 0.29	0.261	2.1
ApoB (g/L)	0.94 ± 0.27	0.87 ± 0.26	0.036*	-7.4
LDL size (nm)	25.72 ± 0.61	25.96 ± 0.55	0.008*	0.1
Oxidized LDL (U/L)	62.4 ± 18.8	60.1 ± 18.7	0.428	3.7
Electronegative LDL (%)	7.6 ± 3.4	6.7 ± 2.4	0.026*	-11

Data are expressed mean ± SD.

* Statistically significant (p < 0.05).

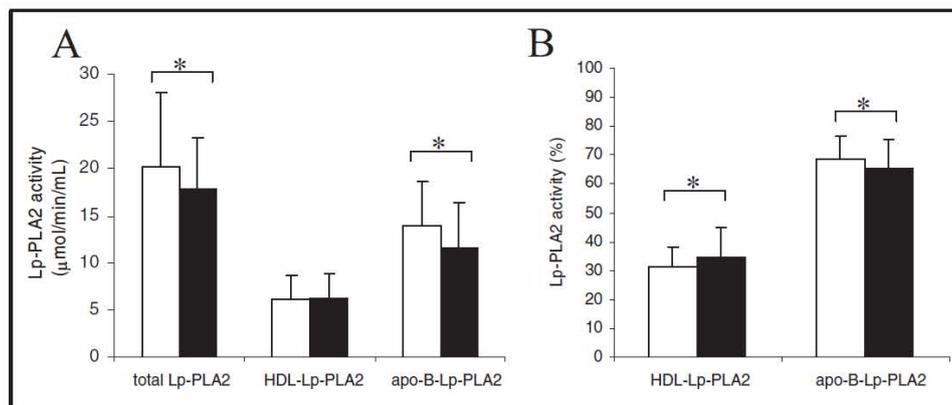


Figure 1. Total Lp-PLA2 activity and distribution between HDL and apoB-containing lipoproteins in patients with type 2 diabetes before (*white bars*) and after glycemic optimization (*black bars*). (A) Total, HDL-associated, and apoB-containing lipoprotein-associated Lp-PLA2 activity. (B) Relative proportions between HDL and apoB-containing lipoprotein. *Statistically significant difference (p < 0.05) between poor and good glycemic control.

3.19) observed after glycemic optimization (Table 2) was correlated negatively with the decrease in glycosylated hemoglobin (R = -0.304, p = 0.033) and plasma triglyceride (R = -0.388, p = 0.006) and positively with changes in HDL cholesterol (R = 0.552, p < 0.001). Patients with LDL subfraction phenotype B (LDL particle diameter < 25.5 nm) were studied separately. Five of 11 patients showing LDL phenotype B at baseline changed to phenotype A after the optimization of glycemic control. This change was accompanied by an increase in HDL cholesterol in these subjects (from 1.34 ± 1.15 to 1.42 ± 1.16 mmol/L, p < 0.001), although no statistical significance was obtained in plasma triglycerides (from 1.89 ± 2.04 to 1.42 ± 0.34 mmol/L, p = 0.488). LDL size was not the only qualitative change in LDL promoted by glycemic optimization, as the electronegative LDL proportion also decreased significantly after glycemic control was improved. In contrast, the oxidized LDL concentration was not modified.

Figure 1 shows changes in total Lp-PLA2 activity and Lp-PLA2 distribution after the improved glycemic control. Total activity decreased significantly by 10%, mainly because of a decrease in Lp-PLA2 activity associated with apoB-containing lipoproteins (Figure 1). As a consequence, the relative distribution of Lp-PLA2 increased in HDL and decreased in apoB-containing lipoproteins (Figure 1). Changes in total Lp-PLA2 were correlated mildly with total cholesterol (R =

0.340, p = 0.030), LDL cholesterol (R = 0.329, p = 0.038), and apoB (R = 0.349, p = 0.025), but stronger correlations were obtained with HDL cholesterol (R = -0.458, p = 0.003), apolipoprotein A-I (R = -0.374, p = 0.016), and glycosylated hemoglobin (R = 0.494, p = 0.001). The same significant correlations were observed with the relative proportion of Lp-PLA2 in HDL (data not shown).

Although patients who had received lipid-lowering drugs had a more favorable overall lipid profile than those who had not, there was no statistical difference in any specific parameter of the lipid profile or in the qualitative characteristics of LDL between the 2 groups at baseline (Table 3). Relative changes in the lipid profile or in the qualitative characteristics of LDL after intensified hypoglycemic therapy were also similar in the 2 groups. Regarding Lp-PLA2, patients who were receiving lipid-lowering therapy at baseline had lower Lp-PLA2 activity and higher relative content in HDL than those who were not receiving this therapy (Figure 2). Intensified hypoglycemic treatment decreased significantly Lp-PLA2 activity and increased significantly the proportion of Lp-PLA2 in HDL in patients who did not receive previous lipid-lowering therapy but not in those receiving lipid-lowering therapy.

Discussion

Our results demonstrate that improving glycemic control reduces Lp-PLA2 activity in patients with type 2 diabetes with

Table 3

Lipid profile and qualitative characteristics of low-density lipoprotein in patients with or without hypolipidemic drugs, before and after glyceimic optimization

Variable	Patients With Lipid-Lowering Therapy (n = 23)			Patients Without Lipid-Lowering Therapy (n = 19)		
	Baseline	After Glycemic Optimization	Percentage Change	Baseline	After Glycemic Optimization	Percentage Change
Nonesterified fatty acids (mmol/L)	0.70 ± 0.38	0.59 ± 0.25*	-19	0.73 ± 0.27	0.60 ± 0.26*	-18
Triglycerides (mmol/L [mg/dl])	1.52 ± 1.11 (134 ± 98)	1.17 ± 0.63 (104 ± 56)	-23	2.27 ± 2.24 (201 ± 198)	1.59 ± 0.80 (140 ± 71)	-30
Total cholesterol (mmol/L [mg/dl])	4.62 ± 1.06 (179 ± 41)	4.47 ± 0.80 (173 ± 31)	-3.2	5.28 ± 1.34 (201 ± 52)	5.00 ± 1.38 (194 ± 53)	-5.3
HDL cholesterol (mmol/L [mg/dl])	1.26 ± 0.33 (49 ± 13)	1.28 ± 0.30 (50 ± 12)	1.6	1.22 ± 0.44 (47 ± 17)	1.27 ± 0.48 (49 ± 19)	4.1
LDL cholesterol (mmol/L [mg/dl])	2.69 ± 0.94 (104 ± 36)	2.59 ± 0.76 (100 ± 29)	-3.7	3.14 ± 0.93 (122 ± 36)	3.03 ± 1.18 (117 ± 46)	-3.5
Apolipoprotein A-I (g/L)	1.44 ± 0.25	1.49 ± 0.22	3.5	1.47 ± 0.41	1.47 ± 0.36	0
ApoB (g/L)	0.89 ± 0.26	0.82 ± 0.21*	-7.9	0.99 ± 0.27	0.92 ± 0.31*	-7.1
LDL size (nm)	25.73 ± 0.53	25.97 ± 0.46*	0.1	25.71 ± 0.70	25.95 ± 0.66*	0.1
Oxidized LDL (U/L)	62.1 ± 18.7	57.5 ± 20.6	-7.4	62.0 ± 18.4	60.6 ± 18.2	-2.3
Electronegative LDL (%)	7.1 ± 3.2	6.3 ± 2.2*	-11	8.0 ± 3.8	7.1 ± 2.3*	-11

Data are expressed as mean ± SD.

* Statistically significant after glyceimic optimization (p <0.05). No statistical significance was observed between patients with or without previous lipid-lowering therapy.

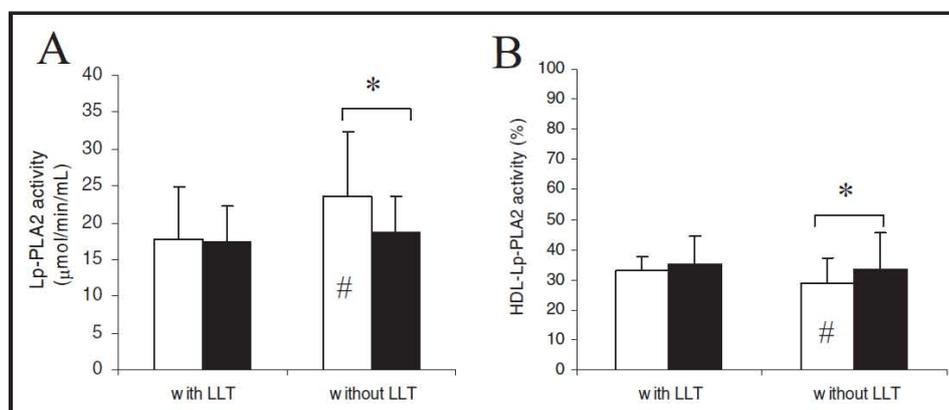


Figure 2. Total Lp-PLA2 activity (A) and proportion of Lp-PLA2 in HDL (B) in patients with or without previous lipid-lowering therapy (LLT) before (white bars) and after (black bars) glyceimic optimization. *Statistically significant difference (p <0.05) between poor and good glyceimic control. #Statistically significant difference (p <0.05) between patients with and those without previous LLT.

normal or near normal LDL cholesterol concentrations, especially in those without lipid-lowering therapy. This reduction was attributable mainly to apoB-containing lipoproteins. As a result, the relative proportion of Lp-PLA2 bound to HDL, which has been suggested to be atheroprotective,⁷ increased.

The mechanism underlying this action may be related to the changes in small, dense LDL particles and the electronegative LDL proportion after glyceimic optimization. It has been reported that small, dense LDL and electronegative LDL are the main transporters in plasma of Lp-PLA2. The amount of Lp-

PLA2 in small, dense LDL or electronegative LDL is 5 to 10 times higher than in normal-sized or electropositive LDL particles.^{9,10} Thus, changes in the distribution of Lp-PLA2 could be related to the increase in LDL size and the decrease of the electronegative LDL proportion. Because the binding of Lp-PLA2 depends on specific residues in apoB, it is feasible that small and/or electronegative LDL particles could bind with higher affinity Lp-PLA2 because of the abnormal conformation of apoB in these particles.¹⁷⁻¹⁹ However, alternative mechanisms related to the physicochemical characteristics of

HDL could be involved. A predominance of small, dense LDL particles, a high proportion of electronegative LDL, and an abnormal distribution of Lp-PLA2 with high content in apoB-containing lipoproteins have been related to increased cardiovascular risk^{7,20} and are usual characteristics of patients with type 2 diabetes.^{4,8}

About half of the subjects were receiving lipid-lowering therapy, mainly statins, which affect the activity, mass, and distribution of Lp-PLA2 in plasma.^{21,22} These effects are strongly associated with the reduction of LDL cholesterol. To avoid any alterations due to changes in lipid-lowering therapy, hypolipidemic medication was not altered during the study. However, to verify that previous hypolipidemic therapy had no additional effect on the obtained results, patients treated with lipid-lowering drugs were analyzed separately and compared with patients not receiving lipid-lowering therapy. Interestingly, the effect of glycemic control optimization on Lp-PLA2 was stronger in patients who were not receiving lipid-lowering therapy, possibly because patients with hypolipidemic treatment had lower total Lp-PLA2 activity and a higher proportion in HDL than patients without previous lipid-lowering therapy.

We conclude that improving glycemic control may promote atheroprotective changes in the qualitative properties of LDL and Lp-PLA2 distribution independently of quantitative changes in LDL cholesterol. Changes in Lp-PLA2 distribution are more pronounced in patients not receiving lipid-lowering therapy. Patients taking hypolipidemic drugs have less room for improvement because of the more favorable overall lipid profile and the effect of statins on Lp-PLA2. This could be especially relevant in clinical practice, because it indicates that intensified glycemic control has additional benefits in patients with diabetes with near normal lipid profiles and could be useful to further decrease cardiovascular risk. The main limitation of this study is its low statistical power, due to the small population size. Therefore, future studies in larger groups of patients should be performed.

Acknowledgment: We are grateful to Carolyn Newey for editorial assistance.

1. Eschwege E. The dysmetabolic syndrome, insulin resistance and increased cardiovascular (CV) morbidity and mortality in type 2 diabetes: aetiological factors in the development of CV complications. *Diabetes Metab* 2003;29:6S19–6S27.
2. Scheffer PG, Bos G, Volwater HG, Dekker JM, Heine RJ, Teerlink T. Associations of LDL size with in vitro oxidizability and plasma levels of in vivo oxidized LDL in type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2003;20:563–567.
3. Wagner AM, Ordonez-Llanos J, Jorba O, Perez A. Predictors of change in low-density lipoprotein size during lipid-lowering treatment in type 2 diabetes. *Metabolism* 2004;53:1516.
4. Sánchez-Quesada JL, Perez A, Caixas A, Rigla M, Payes A, Benitez S, Ordonez-Llanos J. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3243–3249.
5. Tsimikas S, Tsimionis LD, Tselepis AD. New insights into the role of lipoprotein(a)-associated lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2094–2099.
6. Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di Angelantonio E, Kaptoge S, Ballantyne C, Cannon CP, Criqui M, Cushman M, Hofman A, Packard C, Thompson SG, Collins R, Danesh J. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 2010;375:1536–1544.
7. Tellis CC, Tselepis AD. The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:327–338.
8. Kujiraoka T, Iwasaki T, Ishihara M, Ito M, Nagano M, Kawaguchi A, Takahashi S, Ishi J, Tsuji M, Egashira T, Stepanova IP, Miller NE, Hattori H. Altered distribution of plasma PAF-AH between HDLs and other lipoproteins in hyperlipidemia and diabetes mellitus. *J Lipid Res* 2003;44:2006–2014.
9. Gazi I, Lourida ES, Filippatos T, Tsimihodimos V, Elisaf M, Tselepis AD. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of small, dense LDL particles in human plasma. *Clin Chem* 2005;51:2264–2273.
10. Benitez S, Sánchez-Quesada JL, Ribas V, Jorba O, Blanco-Vaca F, Gonzalez-Sastre F, Ordonez-Llanos J. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation* 2003;108:92–96.
11. Saougos VG, Tambaki AP, Kalogirou M, Kostapanos M, Gazi IF, Wolfert RL, Elisaf M, Tselepis AD. Differential effect of hypolipidemic drugs on lipoprotein-associated phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2236–2243.
12. Wagner AM, Ordonez-Llanos J, Caixas A, Bonet R, de Leiva A, Perez A. Quantitative effect of glycaemic improvement on the components of diabetic dyslipidaemia: a longitudinal study. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;68:81–83.
13. Sánchez-Quesada JL, Benitez S, Otal C, Franco M, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J Lipid Res* 2002;43:699–705.
14. Sánchez-Quesada JL, Homs-Serradesanferm R, Serrat-Serrat J, Serra-Grima JR, Gonzalez-Sastre F, Ordonez-Llanos J. Increase of LDL susceptibility to oxidation occurring after intense, long duration aerobic exercise. *Atherosclerosis* 1995;118:297–305.
15. de Juan-Franco E, Pérez A, Ribas V, Sanchez-Hernandez JA, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J, Sánchez-Quesada JL. Standardization of a method to evaluate the antioxidant capacity of high-density lipoproteins. *Int J Biomed Sci* 2009;5:402–410.
16. Sánchez-Quesada JL, Perez A, Caixas A, Ordonez-Llanos J, Carerras G, Payes A, Gonzalez-Sastre F, de Leiva A. Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. *Diabetologia* 1996;39:1469–1476.
17. Bancellis C, Benitez S, Ordonez-Llanos J, Oorni K, Kovanen PT, Milne RW, Sánchez-Quesada JL. Immunochemical analysis of the electronegative LDL subfraction shows that abnormal N-terminal apolipoprotein B conformation is involved in increased binding to proteoglycans. *J Biol Chem* 2011;286:1125–1133.
18. Lund-Katz S, Laplaud PM, Phillips MC, Chapman MJ. Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies: implication for LDL receptor interaction. *Biochemistry* 1998;37:12867–12874.
19. Gaubatz JW, Gillard BK, Massey JB, Hoogeveen RC, Huang M, Lloyd EE, Raya JL, Yang CY, Pownall HJ. Dynamics of dense electronegative low density lipoproteins and their preferential association with lipoprotein phospholipase A(2). *J Lipid Res* 2007;48:348–357.
20. Musliner TA, Krauss RM. Lipoprotein subspecies and risk of coronary disease. *Clin Chem* 1988;34:B78–B83.
21. Papathanasiou AI, Lourida ES, Tsimionis LD, Goudevenos JA, Tselepis AD. Short- and long-term elevation of autoantibody titers against oxidized LDL in patients with acute coronary syndromes. Role of the lipoprotein-associated phospholipase A2 and the effect of atorvastatin treatment. *Atherosclerosis* 2008;196:289–297.
22. Tsimihodimos V, Karabina SA, Tambaki AP, Bairaktari E, Goudevenos JA, Chapman MJ, Elisaf M, Tselepis AD. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:306–311.

ESTUDIO 3:

Estado inflamatorio en los pacientes con DM2 y mal control metabólico: efecto del control glucémico.

3.1 Estudio transversal:

Con este estudio se trató de dar respuesta a los objetivos e y f, al determinar la relación entre los biomarcadores de la inflamación y las características clínicas de los pacientes con DM2, además de estudiar la asociación entre estos biomarcadores inflamatorios con el fenotipo de las LDL en pacientes con DM2.

En este estudio transversal, las características clínicas y antropométricas basales de los pacientes con DM2 y los sujetos control se resumen en la **tabla 11**. Un 65,6% de los pacientes DM2 eran varones. Se analizaron las características clínicas y antropométricas de los pacientes DM2 en función del sexo, sin hallarse diferencias estadísticamente significativas respecto al IMC ($30,7 \pm 5,6$ Kg/m² en varones vs $29,33 \pm 5,6$ Kg/m² en mujeres; p n.s) y la edad (60 ± 9 años en varones vs 58 ± 12 años en mujeres; p n.s).

Tabla 11: Características clínicas y antropométricas basales de los sujetos control y los pacientes con DM2

	Grupo control (N = 54)	Total DM2 (N = 122)
Edad (años)	56 ± 14	59 ± 11
Tiempo de evolución de la diabetes (años)	-	10,61 ± 10,26
Complicaciones crónicas:	-	
• Retinopatía (%)		29,7
• Nefropatía (%) ^a		32,4
• Enfermedad coronaria (%)		9,9
Medicación antihipertensiva (%)	-	67,9
Medicación hipolipemiente (%)	-	33,6
Peso (kg)	69,3 ± 11,4	82,1 ± 18,8*
Perímetro de la cintura (cm)	92 ± 11	105 ± 14*
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	25,9 ± 3,5	30,2 ± 5,6*

Datos expresados como media ± desviación estándar.

^a Nefropatía definida como insuficiencia renal crónica (FG < 60 ml/minuto) o 2 o más determinaciones urinarias de microalbuminuria ≥ 20 mg/l o ≥ 30 mg/g de creatinina.

*P <0,05, comparado con grupo control.

FG: filtrado glomerular

El tratamiento hipoglucemiante de los pacientes con DM2 a la inclusión en el estudio consistía en: cambios en el estilo de vida (22%), hipoglucemiantes orales (21,1%), insulina combinada con agentes orales (29,4%) o insulina en monoterapia (27,5%). Por otro lado, la medicación hipolipemiante incluía monoterapia con estatinas (25,4%) o fibratos (4,1%), estatinas asociadas a fibratos (2,5%) y estatinas asociadas a ezetimibe (1,6%).

En la **tabla 12** se muestran los resultados más relevantes de los parámetros inflamatorios en situación basal de los pacientes con DM2 y los sujetos control. Respecto a los controles, los pacientes con DM2 presentaban niveles más elevados de PCR y MCP1, y menores de adiponectina.

Tabla 12: Parámetros inflamatorios basales de los sujetos control y los pacientes con DM2.

	Total DM2 (N=122)	Grupo Control (N=54)
Proteína C reactiva (mg/l)	4,49 ± 4,67 *	2,38 ± 3,30
Interleucina-6 (ng/l)	1,84 ± 3,99	1,25 ± 1,05
Interleucina-8 (ng/l)	15,91 ± 12,85	12,58 ± 9,29
Factor transformante del crecimiento β 1 (ng/l)	41,19 ± 30,08	39,55 ± 42,86
Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (ng/l)	198,0 ± 132,9 *	154,3 ± 83,0
Leptina (ng/l)	8980 ± 8194	7819 ± 5866
Adiponectina (ng/l)	3272 ± 2671 *	5369 ± 3297

Datos expresados como media \pm desviación estándar.

* P <0.05 vs grupo control

Se analizaron estos parámetros inflamatorios en función del sexo de los pacientes y no se observaron diferencias estadísticamente significativas, a excepción de la adiponectina, que fue superior en mujeres (2709 \pm 2130 ng/l vs 4297 \pm 3231 ng/l; p<0,05).

Los parámetros inflamatorios de los pacientes con DM2 en función del fenotipo de LDL se muestran en la **tabla 13**. Una tercera parte de los sujetos con DM2 (n = 45) presentaban fenotipo B, en comparación con el grupo control en que todos los sujetos (n = 54) tenían fenotipo A. Comparados con los pacientes con fenotipo A, los

pacientes con fenotipo B tenían concentraciones más elevadas de TGF- β_1 ($53,92 \pm 52,82$ ng/l vs $31,35 \pm 33,74$ ng/l; $p < 0,05$) y menores de adiponectina (3664 ± 3044 ng/l vs 2723 ± 1777 ng/l; $p < 0,05$) (Tabla 13, Figura 16).

Tabla 13: Parámetros inflamatorios basales de los pacientes con DM2, según el fenotipo de LDL.

	DM2 Fenotipo A (N=77)	DM2 Fenotipo B (N=45)
Proteína C reactiva (mg/l)	$4,31 \pm 4,52$	$4,86 \pm 5,10$
Interleucina-6 (ng/l)	$2,24 \pm 4,95$	$1,17 \pm 0,83$
Interleucina-8 (ng/l)	$17,46 \pm 13,74$	$13,20 \pm 10,87$
Factor transformante del crecimiento β_1 (ng/l)	$31,35 \pm 33,74$	$53,92 \pm 52,82$ *
Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (ng/l)	$190,6 \pm 125,6$	$212,1 \pm 146,21$
Leptina (ng/l)	9066 ± 8786	8787 ± 7184
Adiponectina (ng/l)	3664 ± 3044	2723 ± 1777 *

Datos expresados como media \pm desviación estándar.

* $P < 0,05$ vs fenotipo A

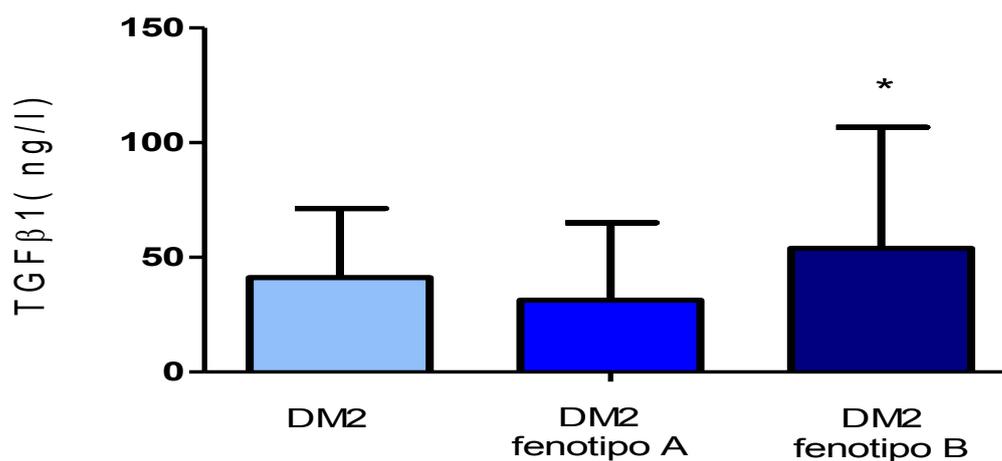


Figura 16: Niveles de TGF- β_1 en función del fenotipo de las LDL. * $P < 0,05$ vs fenotipo A. LDL: lipoproteínas de baja densidad; TGF- β_1 : Factor transformante del crecimiento β_1

Los pacientes con DM2 e IMC ≥ 30 kg/m² presentaban niveles más elevados de PCR ($5,2 \pm 4,8$ mg/l vs $3,7 \pm 4,3$ mg/l; $p = 0,029$) que los sujetos sin obesidad, mientras que aquellos previamente tratados con metformina tenían niveles inferiores de IL-6 ($1,51 \pm 3,86$ ng/l vs $2,23 \pm 4,4$ ng/l; $p = 0,046$), que los que no recibían esta medicación. Los niveles de los parámetros inflamatorios no diferían entre los pacientes tratados con o sin insulina ni en los que recibían o no tratamiento hipolipemiante. Tampoco se encontró correlación entre el control glucémico y los marcadores inflamatorios.

3.2 Estudio longitudinal:

Con este estudio se trató de dar respuesta al objetivo g, investigando el efecto de la mejoría del control glucémico en pacientes con DM2 sobre los biomarcadores de la inflamación.

Así, en este estudio longitudinal se optimizó el control glucémico en un subgrupo de 42 pacientes con DM2 mediante distintas estrategias terapéuticas. Además de la intensificación de las medidas de estilo de vida, se aplicó intensificación farmacológica con hipoglucemiantes orales (metformina o metformina más sulfonilureas) en 6 pacientes, insulinoterapia en 31 pacientes o ambos (insulina más metformina o insulina más metformina y sulfonilureas) en 5 pacientes. El porcentaje de pacientes insulinizados aumentó del 75% al 85,7%. La medicación hipolipemiente y antihipertensiva no se modificó en ninguno de los casos.

En la **tabla 14** se muestran las características clínicas y antropométricas de los pacientes con DM2 antes y después de la optimización del control glucémico (n = 42). Tras un seguimiento de 3 meses, la HbA_{1c} descendió de $9,5 \pm 1,8\%$ a $7,4 \pm 0,8\%$, sin modificaciones en el peso. En la **tabla 15** se indican los cambios en los parámetros inflamatorios.

Tabla 14: Características clínicas y antropométricas de los pacientes con DM2 antes y después de la optimización del control glucémico (n= 42)

	Basal	Tras optimización del control glucémico
Varones/mujeres	27/15	-
Edad (años)	61 ± 12	-
Tiempo de evolución (años)	37 ± 14	-
Complicaciones crónicas:		
• Retinopatía (%)	59	-
• Nefropatía (%)	51,3	-
• Enfermedad coronaria (%)	17,9	-
Insulinoterapia (%)	75	85,7
Medicación hipolipemiente (%)	59,5	59,5
Peso (kg)	80,35 ± 19,52	80,02 ± 19,71
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	29,0 ± 5,8	28,8 ± 6
HbA _{1c} (%)	9,5 ± 1,8	7,4 ± 0,8 *

Datos expresados como media ± desviación estándar.

* P <0.05, respecto a basal

HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada

Tabla 15: Parámetros inflamatorios de los pacientes con DM2 antes y después de la optimización del control glucémico (n= 42)

	Basal	Tras optimización del control glucémico
Proteína C reactiva (mg/l)	3,20 ± 2,86	3,15 ± 3,26
Interleucina-6 (ng/l)	1,49 ± 1,12	1,29 ± 0,70
Interleucina-8 (ng/l)	12,84 ± 7,57	13,82 ± 10,35
Factor transformante del crecimiento β1 (ng/l)	41,86 ± 32,84	26,64 ± 26,91 *
Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (ng/l)	224,31 ± 76,03	227,48 ± 132,79
Leptina (ng/l)	7594 ± 8852	7817 ± 7295
Adiponectina (ng/l)	3673 ± 3455	4084 ± 3927

Datos expresados como media ± desviación estándar.

* P <0,05, respecto a basal

La mejoría del control glucémico se asoció a una reducción significativa de TGF- β_1 ($41,86 \pm 32,84$ ng/l vs $26,64 \pm 26,91$ ng/l; $p = 0,02$) (**figura 17**). Sin embargo, los cambios en los niveles de TGF- β_1 no se correlacionaron de forma estadísticamente significativa con los cambios de la HbA1c.

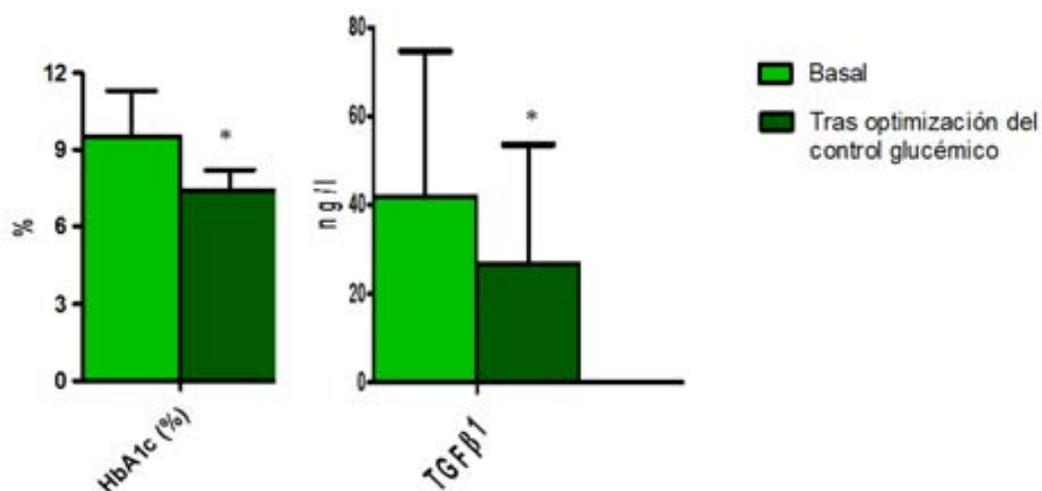


Figura 17: Niveles de TGF- β_1 antes y 3 meses después de la optimización del control glucémico. * $P < 0,05$, respecto a basal. TGF- β_1 : Factor transformante del crecimiento β_1

3.3 Comunicaciones a congresos derivadas de este estudio (🔗):

- Marcadores de la inflamación en la diabetes mellitus tipo 2. Efecto del control glucémico (Póster)

Irene Vinagre, José Luis Sánchez-Quesada, Juan Sánchez-Hernández, David Santos, José María Cubero, Francisco Blanco-Vaca, Antonio Pérez. "XXI Congreso de la Sociedad Española de Diabetes". Barcelona. 15-18 abril 2010. Av Diabetol. 2010;26(Supl 2):34-105

3.4 Publicaciones derivadas de este estudio (📖):

Inflammatory biomarkers in type 2 diabetic patients: Effect of glycemic control and impact of LDL subfraction phenotype

Irene Vinagre, José Luis Sánchez-Quesada, Juan Sánchez-Hernández, David Santos, Jordi Ordóñez-Llanos, Alberto De Leiva, Antonio Pérez

Cardiovascular Diabetology 2014; 13: 34

ORIGINAL INVESTIGATION

Open Access

Inflammatory biomarkers in type 2 diabetic patients: effect of glycemic control and impact of LDL subfraction phenotype

Irene Vinagre^{1,2*}, José Luis Sánchez-Quesada³, Juan Sánchez-Hernández⁴, David Santos^{3,4}, Jordi Ordoñez-Llanos^{3,5,6}, Alberto De Leiva^{1,7} and Antonio Pérez^{1,4*}

Abstract

Background: Type 2 diabetes mellitus (T2D) is associated with higher cardiovascular risk partly related to an increase in inflammatory parameters. The aim of this study was to determine the association of inflammatory biomarkers with low-density lipoprotein (LDL) subfraction phenotype and glycemic control in subjects with T2D and poor glycemic control.

Methods: A cross-sectional study was performed comparing 122 subjects with T2D (59 ± 11 years old, body mass index 30.2 ± 5.6 kg/m²) with 54 control subjects. Patients with T2D were classified according to their LDL subfraction phenotype and inflammatory biomarkers (C-reactive protein, Interleukin-6, Interleukin-8, Transforming growth factor β_1 , Monocyte chemoattractant protein 1, Leptin, Adiponectin) were evaluated according to the degree of glycemic control, LDL phenotype and other clinical characteristics. Forty-two subjects with T2D were studied before and after 3 months of improving glycemic control by different strategies.

Results: Patients with T2D had higher C-reactive protein (CRP) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1) levels and lower adiponectin concentration, compared to controls. T2D subjects with body mass index ≥ 30 kg/m² had higher CRP levels (5.2 ± 4.8 mg/l vs 3.7 ± 4.3 mg/l; $p < 0.05$). The presence of LDL phenotype B was related to higher levels of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) (53.92 ± 52.82 ng/l vs 31.35 ± 33.74 ng/l; $p < 0.05$) and lower levels of adiponectin (3663 ± 3044 ng/l vs 2723 ± 1776 ng/l; $p < 0.05$). The reduction of HbA1c from 9.5 ± 1.8% at baseline to 7.4 ± 0.8% was associated with a significant reduction of TGF- β_1 (41.86 ± 32.84 ng/l vs 26.64 ± 26.91 ng/l; $p = 0.02$).

Conclusions: Subjects with T2D, especially those with LDL phenotype B and obesity, have higher levels of inflammatory biomarkers. Improvement of glycemic control reduces TGF- β_1 levels, which may contribute partly to its renoprotective role.

Keywords: Inflammatory biomarkers, C-reactive protein, Adiponectin, Monocyte chemoattractant protein-1, Transforming growth factor- β_1 , Tumor growth factor β_1 , Type 2 diabetes, LDL phenotype, Atherogenic dyslipidemia

* Correspondence: ivinagre@clinic.ub.es; aperez@santpau.cat

¹Endocrinology and Nutrition Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Mas Casanovas 90, Barcelona 08025, Spain

⁴CIBER of Diabetes and Metabolic Diseases (CIBERDEM), Barcelona, Spain

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



Background

Type 2 diabetes mellitus is one of the most common diseases in occidental society and it is associated with a high cardiovascular risk, not only due to the classical factors but also to a chronic low-grade inflammation [1]. In this sense, epidemiological studies have demonstrated an increase in plasma levels of inflammatory markers such as CRP, IL-6 and TNF- α in patients with metabolic syndrome and also in those with clinically overt T2D [2,3]. Other molecules such as the transforming growth factor (or tumor growth factor) β_1 [4], MCP1 [5,6] or LP-PLA2 [7] also present increased concentrations in T2D subjects.

A genetic predisposition associated to excessive caloric intake and a lack of physical exercise can lead to obesity and central adiposity. Then, this may result in adipose tissue dysfunction, macrophage infiltration and a greater release of cytokines such as IL-6 and TNF- α . Chronically elevated levels of these biomarkers promote insulinresistance in skeletal muscle and endothelial dysfunction, as well as liberation of CRP from the liver [8]. Moreover, hyperglycaemia also induces IL-6 production from endothelium and macrophages, which might worsen insulin liberation and signaling cascades. This suggests that improving glycemic control might reduce the inflammatory response supporting the link between inflammation and glucose metabolic disturbance.

On the other hand, previous studies have demonstrated a significant correlation between CRP levels and features of the metabolic syndrome, including adiposity, hyperinsulinemia, insulin resistance, hypertriglyceridemia and low HDLc [9-11]. Interestingly, lifestyle and pharmacological interventions in T2D such as statins, angiotensin receptor blockers and glitazones have demonstrated a beneficial effect on markers of inflammation [12-15]. However, the correlation between inflammatory markers and glycemic control is significant in some studies [16,17] but not in others [18], and available information about the effect of an improvement of glycemic control on inflammatory markers is very scarce [19,20]. Moreover, the impact of the presence of the atherogenic LDL subfraction phenotype, very common in T2D, on inflammatory markers has not been previously analyzed in these subjects.

Therefore, the aim of this study was to determine the association of inflammatory biomarkers with glycemic control and LDL subfraction phenotype.

Methods

Patients

This report includes a cross-sectional study with 122 consecutive poor controlled T2D patients who attended an out-patient diabetic clinic between 2007 and 2008 to optimize glycemic control. Patients were selected on the

basis of poor glycemic control (HbA1C > 8.5%). As a control group, we selected 54 normoglycemic and normolipemic healthy subjects, without chronic pharmacological medication. This cohort of patients had been studied previously [21,22]. Anthropometrical and clinical characteristics of patients and controls, which have been reported elsewhere [22], are shown in Table 1. Briefly, previous pharmacological hypoglycemic treatment consisted of diet only (22%), oral agents (21.1%), insulin plus oral agents (29.4%) and insulin alone (27.5%). Pharmacological hypolipidemic treatment included statins (25.4%), fibrates (4.1%), statins plus fibrates (2.5%) and statins plus ezetimibe (1.6%). Patients with acute or chronic infections, active inflammatory disease or treatment with anti-inflammatory drugs were excluded. Subjects with CRP higher than 20 mg/L were also excluded from the study. A longitudinal study was also performed in a subgroup of 42 subjects with T2D and poor glycemic control, defined as HbA1c > 8.5%, who were recruited consecutively from the diabetes clinic [21]. All patients were evaluated before and after 3 months of glycemic optimization in a clinical practice setting with different strategies, which included lifestyle counseling and intensification of pharmacological hypoglycemic therapy with oral agents (metformin or metformin plus sulphonylurea) in 6 patients, insulin therapy in 31 patients or both (insulin plus metformin or insulin plus metformin and sulphonylurea) in 5 patients [21]. Lipid-lowering and antihypertensive therapy was unchanged.

The study was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Hospital's ethics committee. All patients and controls signed informed consent.

Laboratory analysis

Blood specimens were obtained after overnight fasting. HbA1c was measured by ion-exchange high-performance liquid chromatography (HPLC; variant II, Bio-Rad) with a reference range of 4.6-5.8%. LDL subfraction phenotype was determined by measuring LDL size, determined by non-denaturing polyacrylamide gradient (2-16%) gel electrophoresis, as described [23]. LDL subfraction phenotype B was defined by a predominant LDL diameter lower than 25.5 nm, while phenotype A subjects had a LDL diameter higher than 25.5 nm. C-reactive protein was measured by a highly-sensitive commercial method (hsCRP, Roche Diagnostics) in Hitachi 917 autoanalyzer. Interleukin 6, IL-8, MCP1, TGF- β_1 , leptin and adiponectin were measured by ELISA from Bender Medsystems (IL-6, IL-8, MCP1 and TGF- β_1), or R&D (leptin and adiponectin).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 15.0 (SPSS Inc.). Before statistical analysis, normal

Table 1 Anthropometric and clinical characteristics of control subjects and patients with type 2 diabetes at baseline

	Control group (N = 54)	Type 2 diabetes (N = 122)
Age (years)	56 ± 14	59 ± 11
Diabetes duration (years)	-	10.61 ± 10.26
Chronic complications:	-	
• Retinopathy (%)		29.7
• Nephropathy (%) ^a		32.4
• Coronary Heart Disease (%)		9.9
Antihypertensive medication (%)	-	67.9
Cholesterol lowering medication (%)	-	33.6
Weight (kg)	69.3 ± 11.4	82.1 ± 18.8*
Waist (cm)	92 ± 11	105 ± 14*
Body mass index (Kg/m ²)	25.9 ± 3.5	30.2 ± 5.6*

Data are expressed mean ± SD.

^aNephropathy defined as impaired renal function (eGFR < 60 ml/minut) or 2 or more urinary determinations of microalbuminuria ≥ 20 mg/l or ≥ 30 mg/g of creatinine.

*Statistically significant (p < 0.05).

distribution and homogeneity of the variances were tested using Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. Data that were not normally distributed were logarithmically transformed before analysis. Groups were compared using Student's unpaired t test for parameters with normal distribution or Mann-Whitney test for parameters with non-normal distribution. The effect of glycemic optimization was analyzed using Student's paired t test for parameters with normal distribution or Wilcoxon test for parameters with non-normal distribution. Correlations between parameters were analyzed using the Pearson R test for variables with normal distribution and the Spearman test for variables with non-normal distribution. Data are expressed as mean ± standard deviation. P < 0.05 was considered significant.

Results

Table 2 shows inflammation parameters of patients with T2D and controls. T2D subjects had higher CRP and MCP1 levels, and lower adiponectin concentrations than controls. One third (n = 44) of patients with T2D presented phenotype B, in contrast to the control group in which all subjects (n = 54) had phenotype A. Compared to T2D patients with LDL phenotype A, subjects with LDL phenotype B had higher concentrations of TGF-β₁ (53.92 ± 52.82 ng/l vs 31.35 ± 33.74 ng/l; p < 0.05) and lower of adiponectin (3663 ± 3044 ng/l vs 2723 ± 1776 ng/l; p < 0.05) (Table 2, Figure 1A). T2D subjects with BMI ≥ 30 kg/m² had higher CRP levels (5.2 ± 4.8 mg/l vs 3.7 ± 4.3 mg/l; p = 0.029), while those previously treated with metformin had lower levels of IL-6 (1.51 ± 3.86 ng/l vs 2.23 ± 4.4 ng/l; p = 0.046). There were no differences between patients treated with or without insulin and between those with or without lipid-lowering medication (data not shown). No correlation was found between glycemic control and inflammatory biomarkers.

Table 3 and Figure 1B show clinical characteristics and inflammatory biomarkers of a subgroup of T2D patients before and after glycemic optimization. After a follow-up of 3 months, HbA1c decreased from 9.5 ± 1.8% to 7.4 ± 0.8%, without changes in body weight. Improvement of glycemic control was associated with a significant reduction of TGF-β₁ (41.86 ± 32.84 ng/l vs 26.64 ± 26.91 ng/l; p = 0.02). However, changes in TGF-β₁ levels did not correlate with those observed in HbA1c.

Discussion

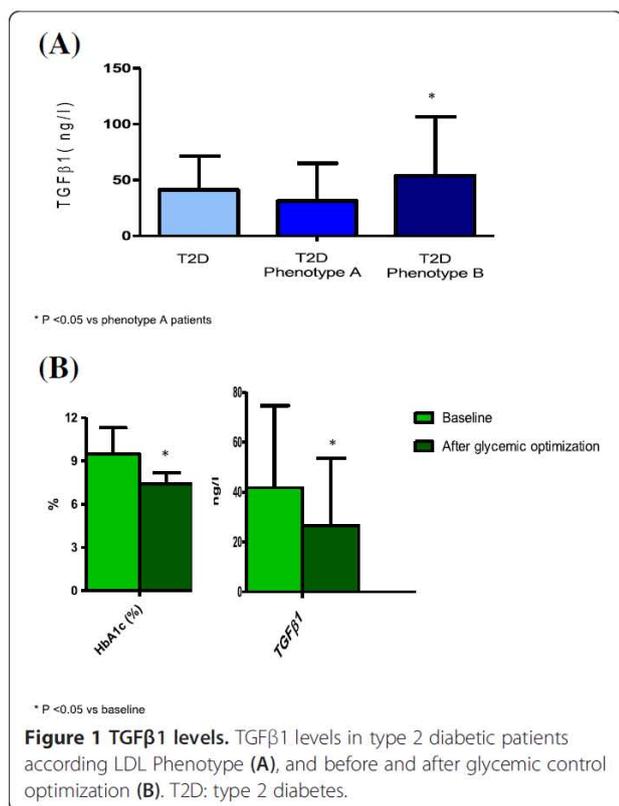
The present study confirms the low grade systemic inflammation status in T2D patients which is related to features of the metabolic syndrome. However, the main and novel findings are related to increased levels of TGF-β₁ concentration in patients with LDL phenotype B, compared to those with phenotype A, and its

Table 2 Inflammation parameters of control subjects and patients with type 2 diabetes mellitus, according LDL subfraction phenotype, at baseline: T2D: type 2 diabetes

	T2D (N = 122)	T2D phenotype A (N = 77)	T2D phenotype B (N = 45)	Control group (N = 54)
C-reactive protein (mg/l)	4.49 ± 4.67 ^a	4.31 ± 4.52	4.86 ± 5.10	2.38 ± 3.30
Interleukin-6 (ng/l)	1.84 ± 3.99	2.24 ± 4.95	1.17 ± 0.83	1.25 ± 1.05
Interleukin-8 (ng/l)	15.91 ± 12.85	17.46 ± 13.74	13.20 ± 10.87	12.58 ± 9.29
Transforming growth factor β ₁ (ng/l)	41.19 ± 30.08	31.35 ± 33.74	53.92 ± 52.82 ^b	39.55 ± 42.86
Monocyte chemoattractant protein 1 (ng/l)	198.0 ± 132.9 ^a	190.6 ± 125.6	212.1 ± 146.21	154.3 ± 83.0
Leptin (ng/l)	8980 ± 8194	9066 ± 8786	8787 ± 7184	7819 ± 5866
Adiponectin (ng/l)	3272.0 ± 2671 ^a	3663 ± 3044	2723 ± 1776 ^b	5369 ± 3297

Data are expressed mean ± SD.

^a, P < 0.05 vs control group; ^b, P < 0.05 vs phenotype A patients.



reduction after a marked improvement of glycemic control. These findings suggest that TGF-β₁ may be a link to glycemic control and atherogenic dyslipidemia with the development of diabetic nephropathy.

Systemic inflammation status in T2D subjects

The analysis of inflammatory parameters showed that plasma concentrations of CRP and MCP1 were higher and that of adiponectin was lower in T2D patients than in control subjects. This observation indicates a greater global systemic inflammation status in diabetic patients, which has been previously suggested that may reflect the activity of the underlying atherosclerotic process [24], and it is concordant with several cross-sectional studies which have shown an increase of CRP levels in patients with diabetes [25-27]. Although the results reported in the literature on the association between IL-6 and T2D are contradictory [26,28,29], the absence of statistical differences in IL-6 and other inflammatory parameters could be related to the fact that most patients were treated with medications such as metformin, antihypertensive agents and lipid-lowering drugs, which have demonstrated a beneficial effect on inflammation [12-14]. In addition, the available information about the relationship between inflammatory biomarkers and the characteristics of the diabetes is limited. Some studies have demonstrated significant correlation between CRP

levels with features of the metabolic syndrome, including adiposity, hyperinsulinemia, insulin resistance, hypertriglyceridemia and low HDLc [9,30]. The preponderance of small LDL particles (LDL phenotype B) is a component of atherogenic dyslipidemia. In accordance, we have observed that obese T2D subjects have higher CRP concentrations and inflammatory status was more unfavorable in patients with LDL phenotype B, who had higher concentration of TGF-β₁ and lower of adiponectin than patients with phenotype A. To our knowledge, no other studies have examined this association, but there are some publications agreeing that serum levels of TGF-β₁ are higher in patients with metabolic syndrome than those without it [31] and that oxidized low-density lipoprotein, which is increased in subjects with LDL phenotype B, is associated with TGF-β₁ in T2D subjects [32]. Finally, TGFβ family members have been involved in vascular remodeling defects in experimental models [33], which could contribute to explain the worse prognostic of atherosclerotic cardiovascular disease in diabetic patients.

The effect of improving glycemic control on markers of inflammation in T2D

It has been shown that in the individuals with impaired glucose tolerance [34] the low-grade chronic inflammation is related to glucose metabolic disturbance and a growing body of evidence supports the hypothesis that chronic systemic inflammation contributes to decrease insulin sensitivity [35]. Moreover, hyperglycemia is a significant stressor that has also been shown to cause chronic inflammation [36]. However, the relationship between inflammatory markers and glycemic control is still not fully understood. In our study, no inflammation marker correlated with HbA1c levels. These results are consistent with the findings of previous cross-sectional studies which have found an inconsistent association between inflammation and blood glucose levels [16-18], possibly due to previous treatment with metformin, statins and antihypertensive agents, which may limit the power to detect an association between HbA1c and inflammatory markers. In the longitudinal study, we demonstrated for the first time that improvement of glycemic control by different therapeutic strategies can lower TGF-β₁ concentrations. These results are consistent with the findings in diabetic rats treated with insulin and with the increased expression of TGF-β₁ receptor in the diabetic kidney and in mesangial cells cultured in high glucose [37,38]. The lack of significant correlation between the magnitude of the reductions in HbA1c and TGF-β₁ after glycemic optimization may reflect differences in the relative importance of the local versus systemic blood glucose levels, and it does not preclude an underlying relationship between these two parameters.

Table 3 Clinical characteristics and inflammation parameters of patients with type 2 diabetes mellitus before and after glycemc optimization (n = 42)

	Baseline	After glycemc optimization
Male/female	27/15	-
Age (years)	61 ± 12	-
Diabetes duration (years)	37 ± 14	-
Chronic complications:		
• Retinopathy (%)	59	-
• Nephropathy (%)	51.3	-
• Coronary Heart Disease (%)	17.9	-
Insulin use (%)	75	85.7
Cholesterol lowering medication (%)	59.5	59.5
Weight (kg)	80.35 ± 19.52	80.02 ± 19.71
Body mass index (Kg/m ²)	29.0 ± 5.8	28.8 ± 6
HbA1c (%)	9.5 ± 1.8	7.4 ± 0.8*
C-reactive protein (mg/l)	3.20 ± 2.86	3.15 ± 3.26
Interleukin-6 (ng/l)	1.49 ± 1.12	1.29 ± 0.70
Interleukin-8 (ng/l)	12.84 ± 7.57	13.82 ± 10.35
Transforming growth factor β1 (ng/l)	41.86 ± 32.84	26.64 ± 26.91*
Monocyte chemotactic protein 1 (ng/l)	224.31 ± 76.03	227.48 ± 132.79
Leptin (ng/l)	7594 ± 8852	7817 ± 7295
Adiponectin (ng/l)	3673 ± 3455	4084 ± 3927

Data are expressed mean ± SD.

*p <0.05 vs baseline.

The lack of change in CRP and other inflammatory markers in our study cannot be attributed to weight gain or pharmacological therapy, and confirms the results in the few studies which have evaluated the effect of improving glycemc control on markers of inflammation in type 1 diabetes (DCCT) and T2D [19,20]. In the DCCT study, intensive glycemc control was not associated with changes in levels of CRP and among intensively treated subjects who gained the most weight, there was a significant rise. In T2D, in a study of 18 patients who had been hospitalized to initiate insulin therapy because of poor diabetes control, CRP values, but not MCP1 and fibrinogen levels, were decreased 2 weeks after initiation of insulin therapy. This effect could result from anti-inflammatory effects of insulin [18], although these findings were not confirmed in the study of Pradhan et al. [19]. They found that, in patients with recent-onset T2D, treatment during 14 weeks with insulin glargine or metformin compared with placebo did not reduce CRP, IL-6 and soluble tumor necrosis factor receptor 2, despite improving glucose control. In the present study, the duration of the study was sufficient on the basis of assessment of glycemc control by HbA1c, and a marked improvement of glycemc control was obtained, being

nearly normal in most of the patients without changes in body weight. Furthermore, lipid-lowering and antihypertensive therapy was unchanged and in most patients insulin therapy was the strategy used to improve glycemc control.

The possible role of TGF-β₁ in diabetic nephropathy

The critical role of hyperglycemia in the genesis of diabetic nephropathy has been established by cell culture studies, experimental animal models, and clinical trials. Certain cytokines have been identified as likely mediators of the effects of high ambient glucose on the kidney. TGF-β₁, a known pro-fibrotic factor, activates the production of extracellular matrix by mesangial cells and interstitial fibroblasts in the kidneys, and thus contributes to the manifestation of diabetic kidney disease through a number of key pathological events leading to reduced glomerular filtration and impaired renal function [39,40]. In mesangial cells, it has been demonstrated that the expression and activity of TGF-β₁ are directly influenced by glucose levels [38]. Moreover, atherogenic dyslipidemia is associated with the onset and progression of nephropathy in T2D subjects, by a mechanism not fully understood [41,42]. Therefore, the finding of a higher concentration of TGF-β₁ in patients with atherogenic dyslipidemia provides a potential explanation.

In conclusion, the present study confirms that low-grade chronic inflammation in T2D is related to LDL phenotype B and obesity. In addition, our data demonstrates that improvement of glycemc control reduces TGF-β₁ levels, through an unknown mechanism. These findings might support the role of TGF-β₁ as a likely mediator of the effects of high ambient glucose on the kidney and the beneficial effects of strict glucose control on the development of diabetic nephropathy. However, future studies in larger groups of patients should be performed to confirm these findings.

Abbreviations

T2D: Type 2 diabetes mellitus; CRP: C-reactive protein; IL-6: Interleukin-6; TNF: Tumor necrosis factor; MCP1: Chemotactic monocyte protein 1; LP-PLA2: Lipoprotein-associated phospholipase A2; LDLc: Low density lipoproteins cholesterol; HDLc: High density lipoproteins cholesterol; HbA1c: Glycated haemoglobin; TGF-β₁: Transforming growth factor or tumor growth factor β₁; BMI: Body mass index.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

IV selected patients, performed statistical analysis and wrote the manuscript. JLS-Q conceived of the study, researched data and reviewed the manuscript. JS-H performed statistical analysis and reviewed the manuscript. DS researched data. JO-L participated in the design of the study, contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. ADL participated in the design of the study, contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. AP conceived of the study, selected patients and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Spanish Ministry of Health (ISCIII/FIS) P105/2099, P105/1540, P106/0500, and P110/00265. JLS-Q is supported by ISCIII/FIS CP06/0220. JLS-Q and JO-L are members of the Quality Research Group 2009-SGR-1205 from Generalitat de Catalunya. AP and ADL are members of the Quality Research Group 2009-SGR-806 from Generalitat de Catalunya. J.S-H, D.S. and A.P. are members of CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) from ISCIII. JLS-Q and JO-L are members of the Cardiovascular Research Network (RIC, RD12/0042/0043) from ISCIII. The authors are grateful to Melissa Vance for editorial assistance.

Author details

¹Endocrinology and Nutrition Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Mas Casanovas 90, Barcelona 08025, Spain. ²Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ³Cardiovascular Biochemistry, Biomedical Research Institute IIB Sant Pau, Barcelona, Spain. ⁴CIBER of Diabetes and Metabolic Diseases (CIBERDEM), Barcelona, Spain. ⁵Biochemistry Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. ⁶Biochemistry and Molecular Biology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁷CIBER of Biomedicine, Biotechnology and Nanomedicine (CIBERBBN), Barcelona, Spain.

Received: 9 January 2014 Accepted: 3 February 2014

Published: 4 February 2014

References

1. Eschwege E: The dysmetabolic syndrome, insulin resistance and increased cardiovascular (CV) morbidity and mortality in type 2 diabetes: aetiological factors in the development of CV complications. *Diabetes Metab* 2003, **29**(4 Pt 2):6519-6527.
2. Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D: Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 2000, **67**(3):291-300.
3. Mirza S, Hossain M, Mathews C, Martinez P, Pino P, Gay JL, Rentfro A, McCormick JB, Fisher-Hoch SP: Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: a cross-sectional study. *Cytokine+* 2012, **57**(1):136-142.
4. Azar ST, Salti I, Zantout MS, Major S: Alterations in plasma transforming growth factor beta in normoalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, **85**(12):4680-4682.
5. Piemonti L, Calori G, Mercalli A, Lattuada G, Monti P, Garancini MP, Costantino F, Ruotolo G, Luzzi L, Perseghin G: Fasting plasma leptin, tumor necrosis factor-alpha receptor 2, and monocyte chemoattracting protein 1 concentration in a population of glucose-tolerant and glucose-intolerant women: impact on cardiovascular mortality. *Diabetes Care* 2003, **26**(10):2883-2889.
6. Sell H, Eckel J: Monocyte chemotactic protein-1 and its role in insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 2007, **18**(3):258-262.
7. Serban M, Tanaseanu C, Kosaka T, Vidulescu C, Stoian I, Marita DS, Tanaseanu S, Moldoveanu E: Significance of platelet-activating factor acetylhydrolase in patients with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *J Cell Mol Med* 2002, **6**(4):643-647.
8. Calle MC, Fernandez ML: Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2012, **38**(3):183-91.
9. Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM: Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000, **102**(1):42-47.
10. Lee CC, Adler AI, Sandhu MS, Sharp SJ, Forouhi NG, Erqou S, Luben R, Bingham S, Khaw KT, Wareham NJ: Association of C-reactive protein with type 2 diabetes: prospective analysis and meta-analysis. *Diabetologia* 2009, **52**(6):1040-1047.
11. Nakano S, Kuboki K, Matsumoto T, Nishimura C, Yoshino G: Small, dense LDL and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in metabolic syndrome with type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb* 2010, **17**(4):410-415.
12. Suzuki H, Sakamoto M, Hayashi T, Iuchi H, Ohashi K, Isaka T, Sakamoto N, Kayama Y, Tojo K, Yoshimura M, Utsunomiya K: Effects of co-administration of candesartan with pioglitazone on inflammatory parameters in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus: a preliminary report. *Cardiovasc Diabetol* 2013, **12**:71.
13. Tan KC, Chow WS, Tam SC, Ai VH, Lam CH, Lam KS: Atorvastatin lowers C-reactive protein and improves endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87**(2):563-568.
14. Wagner AM, Sanchez-Quesada JL, Benitez S, Bancells C, Ordonez-Llanos J, Perez A: Effect of statin and fibrate treatment on inflammation in type 2 diabetes. A randomized, cross-over study. *Diabetes Res Clin Pract* 2011, **93**(1):e25-e28.
15. Belcalzar LM: A 1-year lifestyle intervention for weight loss in individuals with type 2 diabetes reduces high C-reactive protein levels and identifies metabolic predictors of change: from the Look AHEAD (Action for Health in Diabetes) study. *Diabetes Care* 2010, **33**(11):2297-303.
16. Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hulthen LM, Hiukka A, Taskinen MR: Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2003, **166**(2):387-394.
17. Rodríguez-Moran M, Guerrero-Romero F: Increased levels of C-reactive protein in noncontrolled type II diabetic subjects. *J Diabetes Complications* 1999, **13**(4):211-215.
18. Pickup JC, Mattock MB, Crook MA, Chusney GD, Burt D, Fitzgerald AP: Serum sialic acid concentration and coronary heart disease in NIDDM. *Diabetes Care* 1995, **18**(8):1100-1103.
19. Pradhan AD, Everett BM, Cook NR, Rifai N, Ridker PM: Effects of initiating insulin and metformin on glycemic control and inflammatory biomarkers among patients with type 2 diabetes: the LANCET randomized trial. *JAMA* 2009, **302**(11):1186-1194.
20. Takebayashi K, Aso Y, Inukai T: Initiation of insulin therapy reduces serum concentrations of high-sensitivity C-reactive protein in patients with type 2 diabetes. *Methods* 2004, **53**(6):693-699.
21. Sanchez-Quesada JL, Vinagre J, Juan-Franco E, Sanchez-Hernandez J, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J, Perez A: Effect of improving glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus on low-density lipoprotein size, electronegative low-density lipoprotein and lipoprotein-associated phospholipase A2 distribution. *Am J Cardiol* 2012, **110**(1):67-71.
22. Sanchez-Quesada JL, Vinagre J, de Juan-Franco E, Sanchez-Hernandez J, Bonet-Marques R, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J, Perez A: Impact of the LDL subfraction phenotype on Lp-PLA2 distribution, LDL modification and HDL composition in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2013, **12**:112.
23. Sanchez-Quesada JL, Benitez S, Otal C, Franco M, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J: Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J Lipid Res* 2002, **43**(5):699-705.
24. Baars T, Konorza T, Kahlert P, Mohlenkamp S, Erbel R, Heusch G, Kleinbongard P: Coronary aspirate TNFalpha reflects saphenous vein bypass graft restenosis risk in diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol* 2013, **12**:12.
25. Wannamethee SG, Lowe GD, Rumley A, Cherry L, Whincup PH, Sattar N: Adipokines and risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* 2007, **30**(5):1200-1205.
26. Wang X, Bao W, Liu J, Ouyang YY, Wang D, Rong S, Xiao X, Shan ZL, Zhang Y, Yao P, Liu LG: Inflammatory Markers and Risk of Type 2 Diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2013, **36**(1):166-175.
27. Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM: Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002, **51**(4):1131-1137.
28. Bertoni AG, Burke GL, Owusu JA, Carnethon MR, Vaidya D, Barr RG, Jenny NS, Ouyang P, Rotter JI: Inflammation and the incidence of type 2 diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care* 2010, **33**(4):804-810.
29. Krakoff J, Funahashi T, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Tanaka S, Matsuzawa Y, Kobes S, Tataranni PA, Hanson RL, Knowler WC, Lindsay RS: Inflammatory markers, adiponectin, and risk of type 2 diabetes in the Pima Indian. *Diabetes Care* 2003, **26**(6):1745-1751.
30. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW: C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler, Thromb, Vasc Biol* 1999, **19**(4):972-978.
31. Sciarretta S, Ferrucci A, Ciavarella GM, De PP, Venturelli V, Tocci G, De BL, Rubattu S, Volpe M: Markers of inflammation and fibrosis are related to cardiovascular damage in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 2007, **20**(7):784-791.

32. Nakhjavani M, Esteghamati A, Asgarani F, Khalilzadeh O, Nikzamir A, Safari R: Association of oxidized low-density lipoprotein and transforming growth factor-beta in type 2 diabetic patients: a cross-sectional study. *Transl Res* 2009, **153**(2):86–90.
33. Di BE, Campagnolo P, Margariti A, Zampetaki A, Karamariti E, Hu Y, Xu Q: Endothelial lineage differentiation from induced pluripotent stem cells is regulated by microRNA-21 and transforming growth factor beta2 (TGF-beta2) pathways. *J Biol Chem* 2013 [Epub ahead of print].
34. Muller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, Giani G, Illig T, Thorand B, Kolb H: Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. *Diabetologia* 2002, **45**(6):805–812.
35. Pickup JC: Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004, **27**(3):813–823.
36. Astrup A, Finer N: Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? *Obes Rev* 2000, **1**(2):57–59.
37. Isono M, Mogyrosi A, Han DC, Hoffman BB, Ziyadeh FN: Stimulation of TGF-beta type II receptor by high glucose in mouse mesangial cells and in diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000, **278**(5):F830–F838.
38. Koppel H, Riedl E, Braunagel M, Sauerhoefer S, Ehner S, Godoy P, Sternik P, Dooley S, Yard BA: L-carnosine inhibits high-glucose-mediated matrix accumulation in human mesangial cells by interfering with TGF-beta production and signalling. *Nephrol Dial Transplant* 2011, **26**(12):3852–3858.
39. Lim AK, Tesch GH: Inflammation in diabetic nephropathy. *Mediators Inflamm* 2012, **2012**:146154.
40. Loeffler I, Wolf G: Transforming growth factor-beta and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2013, **2013**:2013.
41. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M: The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes* 2000, **49**(9):1399–1408.
42. Muntner P, Coresh J, Smith JC, Eckfeldt J, Klag MJ: Plasma lipids and risk of developing renal dysfunction: the atherosclerosis risk in communities study. *Kidney Int* 2000, **58**(1):293–301.

doi:10.1186/1475-2840-13-34

Cite this article as: Vinagre et al.: Inflammatory biomarkers in type 2 diabetic patients: effect of glycemic control and impact of ldl subfraction phenotype. *Cardiovascular Diabetology* 2014 **13**:34.

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



DISCUSIÓN

La DM2 es una enfermedad de gran relevancia sanitaria por su alta prevalencia, su elevada morbimortalidad y sus importantes costes sanitarios. Nuestra hipótesis es que, aunque los mecanismos responsables del desarrollo acelerado de la arteriosclerosis en los pacientes con DM2 no se conocen con precisión, la dislipemia aterogénica y la inflamación de bajo grado presentes en muchos pacientes están implicadas en el desarrollo de las complicaciones cardiovasculares.

El grado de control glucémico afecta a las características cuantitativas y cualitativas de las partículas de LDL y HDL, y la inflamación sistémica de bajo grado parece depender en parte del grado de control glucémico. Estudios previos de nuestro grupo y otros, muestran que la hiperglucemia, la lipoperoxidación y la inflamación sistémica de la DM2 favorecen la formación de formas modificadas de LDL, como la LDLgl, la LDLox y la LDL(-) y que éstas son más aterogénicas y tienen mayor acción proinflamatoria sobre las células endoteliales.

La información sobre la relación del grado de control glucémico con las características cualitativas de las partículas de LDL y HDL es escasa y se desconoce el efecto que puede tener la optimización del control glucémico sobre las características cualitativas de las partículas de LDL y HDL y la distribución de Lp-PLA2 entre estas lipoproteínas. A diferencia de lo que ocurre con los cambios en el estilo de vida [163] y ciertos fármacos como las estatinas [73;74], los antagonistas del receptor de la angiotensina y las glitazonas [72], los estudios que tratan de determinar la correlación entre los parámetros inflamatorios y el control glucémico no son del todo concluyentes [67-69], y la información existente acerca del efecto que tiene la mejoría del control glucémico sobre los parámetros inflamatorios es también escasa [70;71]. Además, el carácter progresivo de la fisiopatología de la DM2 obliga a la adaptación progresiva del tratamiento al estado evolutivo de la enfermedad, lo que justifica la heterogenicidad del tratamiento. Algunos fármacos hipoglucemiantes tienen efectos sobre el metabolismo de las lipoproteínas y el estado inflamatorio adicionales al del control glucémico. Finalmente, en los individuos con una DM2 de larga evolución [135;142;149], la consecución y mantenimiento de un control glucémico adecuado es difícil, especialmente en los que requieren tratamiento con insulina, entre otras razones por la infrutilización de la terapia bolo-basal en estos pacientes. Todos estos aspectos dificultan el estudio de la relación del control glucémico y el efecto de la optimización del mismo sobre las alteraciones cualitativas de las lipoproteínas y los biomarcadores de la inflamación en los pacientes con DM2.

Los trabajos desarrollados en esta tesis doctoral se centran en el estudio de la relación del control glucémico y las características cualitativas del perfil lipídico con los biomarcadores de la inflamación en pacientes con DM2, así como la determinación de los efectos de la optimización del control glucémico sobre dichos parámetros. Los resultados confirman datos previos y aportan información nueva que contribuyen al conocimiento en esta área de la medicina, siendo los principales hallazgos los siguientes: 1- Las pautas de insulina bolo-basal son factibles y permiten mejorar el control glucémico sin comprometer la seguridad y calidad de vida, en los pacientes con DM2 de larga evolución y mal controlados con otras pautas de insulina; 2- Se confirma que los pacientes con DM2 tienen alteraciones en las características cualitativas y cuantitativas de las LDL y HDL y que muchas de ellas están relacionadas con el hecho de presentar un fenotipo B de las partículas LDL; 3- La mejoría del control glucémico promueve modificaciones menos aterogénicas en las partículas LDL y HDL, que son independientes de los cambios cuantitativos en el cLDL; 4- Los marcadores inflamatorios se encuentran elevados en los sujetos DM2, sobretodo en aquellos con fenotipo B; 5- La optimización del control glucémico podría reducir los niveles de TGF- β_1 , en parte implicado en la patogenia de la nefropatía diabética. De cara a facilitar la discusión, comentaremos por separado los hallazgos de cada uno de los estudios.

1. “FACTIBILIDAD Y EFICACIA DE UN PROGRAMA DE OPTIMIZACIÓN DEL CONTROL GLUCÉMICO CON PAUTA DE INSULINA BOLO-BASAL EN PACIENTES CON DM2 DE LARGA EVOLUCIÓN Y MAL CONTROL GLUCÉMICO”

El presente estudio muestra que las pautas bolo-basal permiten mejorar el control glucémico sin comprometer la seguridad y calidad de vida de los pacientes con DM2 de larga evolución y mal controlados con otras pautas de insulina. También demuestra la factibilidad de la implementación de este tipo de terapia dentro de un programa de educación ambulatorio en pacientes con DM2 evolucionada y de edad avanzada.

Las guías de consenso para el manejo de la DM2 consideran como principales objetivos del tratamiento conseguir valores de HbA_{1C} lo más cercanos posible a la normalidad sin provocar hipoglicemias, sobretodo en pacientes ancianos o con enfermedad coronaria, y además, evitar el desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares [132;132;164]. Estudios recientes muestran que una elevada proporción de sujetos con diabetes no consiguen los objetivos recomendados [135;142]. A pesar de que en el estudio de NHANES el porcentaje de pacientes con HbA_{1C} < 7% aumentó desde un 37% en el período 1999-2000 hasta un 56,8% en 2003-2004, las tasas de control glucémico subóptimo son especialmente altas en individuos con características similares a las de nuestro estudio, quienes tienen una diabetes de larga evolución o están en tratamiento con insulina [135;142]. Los tratamientos con 2 dosis de insulina NPH/NPL o premezclas se usan para simplificar la terapia con insulina, pero tienen una limitada flexibilidad, requieren una rigidez en los horarios de las ingestas, limitan la posibilidad de ajustar las dosis de insulina y aumentan la posibilidad de sufrir hipoglucemias. Así, a pesar de que muchos pacientes conseguirán un control glucémico adecuado con este tipo de terapia,[143] cuando la capacidad secretora de las células beta pancreáticas se pierde y hay un déficit severo de insulina, el control glucémico empeora y se hace inestable, tal y como sucede en muchos de los sujetos incluidos en este estudio [132;143]. Es entonces cuando la terapia bolo-basal estaría indicada. En ese caso podría recomendarse administrar el 50% de la insulina requerida en forma de insulina basal y el otro 50% en forma de bolus, repartido en las tres ingestas principales. Un análogo de insulina lenta administrado una vez al día (insulina detemir o glargina) suele ser el escogido para imitar la secreción de insulina basal del páncreas, con una duración entre 20 y 24 horas, sin apenas presencia de pico. Los análogos de insulina rápida (aspart, lispro o glulisina) se administran antes de las 3 ingestas principales del día para imitar el pico

de secreción endógena de insulina. La rápida y corta acción de este tipo de insulinas permite su administración con las comidas, minimiza la hiperglucemia postprandial y reduce el riesgo de hipoglucemias entre ingestas [165].

Nuestro estudio ha demostrado que en este tipo de sujetos con DM2 de larga evolución y mal controlados con otras pautas, la terapia bolo-basal reduce la HbA_{1C} un punto en 6 meses y la proporción de pacientes con HbA_{1C} \geq 9% desciende significativamente a los 3 y 6 meses. Estos hallazgos son consistentes con la amplia evidencia que hay al respecto en sujetos con DM1 con pautas bolo-basal [166] y son apoyados también por los datos limitados de estudios observacionales en pacientes con DM2 que cambian de insulinas premezcladas a múltiples dosis con análogos [144;148] y de estudios randomizados comparando el tratamiento con mezclas de insulina versus pautas bolo-basal en pacientes con DM2 [145;146;167]. En pacientes previamente tratados con insulina glargina y agentes orales, la diferencia de HbA_{1C} era de 0,22% a favor de la terapia bolo-basal con insulina glargina respecto al tratamiento con premezclas [147]. En el estudio PREFER [146] el subgrupo de pacientes previamente tratados con insulina basal mostró una reducción mayor de HbA_{1C} con pautas bolo-basal con detemir/aspart comparado con insulina aspártica bifásica (-1,21% vs -0,75%). Finalmente, en sujetos con DM2 tratados con premezclas, Fritsche et al. [145] demostró que la terapia bolo-basal con análogos de insulina glargina y glulisina era superior a la terapia con premezclas en la reducción de HbA_{1C} (-1,31% vs 0,8%). Por lo tanto, aunque hay diferencias en la magnitud de la mejoría según los estudios, probablemente debido a las características basales de los pacientes en las distintas poblaciones estudiadas, la superioridad de las pautas bolo-basal en pacientes seleccionados con enfermedad evolucionada, parece demostrada. La reducción de más de un punto en la HbA_{1C} conseguida con la pauta bolo-basal puede considerarse clínicamente significativa dado que puede dar lugar a una reducción en los eventos clínicos.

Desafortunadamente, el tratamiento con pautas bolo-basal está infrautilizado en la práctica clínica habitual en sujetos con DM2 porque muchos médicos piensan que debe reservarse principalmente para pacientes con DM1, por ser demasiado complejas para su instauración en la práctica clínica y por el miedo al aumento del número de pinchazos, ganancia ponderal, riesgo de hipoglucemias y empeoramiento de la calidad de vida.

A pesar de que en nuestro trabajo no se objetivó un incremento ponderal tras optimizar a los pacientes con DM2 con pautas bolo-basal, en múltiples estudios previos sí que se había observado un aumento de peso de hasta 3,6 kg [144;145]. En el nuestro y en estudios previos [144;145] el índice de hipoglucemias severas no estaban aumentados, cosa que podría explicarse por ser ésta una pauta más fisiológica de sustitución de la insulina y por la flexibilidad que ésta puede ofrecer a los pacientes. De hecho, está descrito que la tasa de hipoglucemias nocturnas es inferior con las pautas bolo-basal respecto a las insulinas premezcladas [168]. Así pues, el miedo a las hipoglucemias no debería ser una barrera para iniciar este tipo de terapia en pacientes con DM2, pero debería considerarse de cara a establecer los objetivos de control para no incrementar la morbimortalidad [169]. Sabemos por los grandes estudios ACCORD [129], ADVANCE [130] y VADT [131], que el tratamiento hipoglucemiante intensivo en sujetos DM2 de larga evolución puede incrementar la mortalidad cardiovascular, probablemente en relación a una mayor tasa de hipoglucemias severas. Por otro lado, respecto al impacto en la calidad de vida de las pautas bolo-basal, en concordancia con el estudio de Ménard y cols.,[170] el nuestro no apoya la idea de que estas pautas empeoran la calidad de vida. No obstante, en el subgrupo de pacientes con DM2 a los que se inicia insulino terapia por mal control con agentes orales, el tratamiento con 2 dosis de insulina premezclada reduce igual la HbA_{1c} con mejor calidad de vida que el tratamiento con pauta bolo-basal [171].

Por otro lado, y de acuerdo a lo publicado en trabajos previos [144], en nuestro estudio todos los pacientes fueron capaces de titular la dosis de insulina basal según la glucemia capilar basal de los últimos 3 a 7 días. En cambio, pocos sujetos fueron capaces de ajustar la dosis de insulina prandial de acuerdo a los valores de glucemia capilar y muchos necesitaron el apoyo de un algoritmo simple, con dosis ajustada en función de la glucemia antes de las comidas. Habitualmente, para conseguir la dosis óptima de insulina preingesta, se deben realizar cálculos que implican múltiples factores (glucemia capilar de partida, raciones de hidratos de carbono que van a ingerir, ejercicio físico...) y que son complejos para muchos pacientes. En este sentido, en un estudio recientemente publicado se observa una menor consecución de objetivos de control glucémico con pautas bolo-basal precisamente por la mayor dificultad en el ajuste de un régimen más complejo [172]. De todos modos, está descrito que usar cada semana un algoritmo simple para ajustar las dosis de insulina rápida preingesta según la glucemia capilar es tan eficaz como modificar la dosis de insulina preprandial usando ratios de insulina/carbohidratos en sujetos con DM2 [173]. Respecto a la dosis total de insulina administrada en nuestro trabajo se pudo observar

un incremento de la misma a los 6 meses del cambio de tratamiento. Estudios previos en los que se realiza un cambio de tratamiento de insulinas premezcladas con lispro a terapia bolo-basal objetivan este incremento de los requerimientos de insulina ya a los 3 meses del cambio [174]. No obstante, aquellos sujetos que realizan el cambio a insulina detemir más aspártica reciben más dosis de insulina diaria que aquellos que realizan el cambio a insulina glargina más aspártica [175]. En nuestro trabajo no se han podido valorar estas diferencias dado que en todos los sujetos se administró insulina glargina como insulina basal.

Por tanto, este estudio demostró que, en sujetos con DM2 de larga evolución y mal controlados con otras pautas de insulina, la transferencia dentro de un programa ambulatorio de 9 horas a terapia bolo-basal es factible. También se ha podido confirmar que las pautas bolo-basal son eficaces, seguras y no alteran la calidad de vida en este subgrupo de pacientes con DM2. Así pues, este tipo de tratamiento debería ofrecerse a aquellos sujetos con DM2 mal controlados con otras estrategias que incluyan insulina.

2. “CARACTERÍSTICAS ANTIATEROGÉNICAS DE LAS PARTÍCULAS DE HDL Y MODIFICACIONES DE LDL EN PACIENTES CON DM2 Y MAL CONTROL GLUCÉMICO. EFECTO DEL CONTROL GLUCÉMICO”

2.1 Estudio transversal: Modificaciones de las LDL, composición de las HDL y distribución de la Lp-PLA2 en la DM2. Impacto del fenotipo de las subfracciones de las LDL

Los resultados obtenidos en el estudio transversal muestran que los pacientes con DM2 tienen alteraciones cualitativas de las HDL y LDL, incluyendo aumento de las LDLox y LDLgl, cambios en la composición de las HDL y en la distribución de la Lp-PLA2, que están estrechamente relacionadas con el fenotipo B de las LDL.

Estudios clínicos y epidemiológicos han demostrado de forma consistente que los niveles de cHDL y cLDL están fuertemente asociados con un elevado riesgo cardiovascular [27;38]. Sin embargo, cada vez se da más importancia a las características cualitativas tanto de LDL como de HDL como factores determinantes de la progresión o protección de la arteriosclerosis. Así, múltiples trabajos han hallado diferencias en las características cualitativas de las partículas de LDL y HDL entre sujetos con y sin DM2 [157;158]. Sin embargo, no se han comparado estas características clasificando a los sujetos con DM2 en función del fenotipo de las LDL. Respecto a Lp-PLA2, su distribución entre HDL y LDL sí ha sido analizada comparando el fenotipo de LDL en un estudio, cuyos datos indican que la actividad total incrementada de la Lp-PLA2 y su distribución anormal entre las lipoproteínas son dependientes en gran parte de la presencia del fenotipo B de las LDL [176], pero no en sujetos con DM2. Por tanto, lo novedoso de nuestro estudio es el análisis simultáneo de las distintas formas modificadas (LDLox, LDLgl, LDL(-)), de la composición de HDL y de la distribución de Lp-PLA2 en pacientes con DM2 clasificados en función del fenotipo de LDL y en sujetos controles.

Los resultados de nuestro estudio coinciden con los hallazgos previos en que la LDLox, LDLgl y LDL(-) están aumentadas en la diabetes [50;177;178]. Nuestros resultados muestran que la LDLox y LDLgl están aumentadas en los sujetos con DM2 y fenotipo A con respecto a los sujetos control, pero que los niveles son todavía superiores en individuos con DM2 y fenotipo B. Esto podría ser debido a varios factores. El primero es que las partículas LDL pequeñas y densas tienen menor

afinidad por el receptor de LDL, lo que implica una menor tasa de aclaramiento plasmático. De este modo, estas partículas permanecen más tiempo en sangre circulante y, por tanto, tienen más tiempo para presentar nuevas modificaciones. No obstante, la relativa corta vida media de las partículas LDL circulantes (2,5-3,5 días) hace difícil pensar que la glicación no enzimática de las proteínas, para la que es necesaria de 6 a 7 días, se lleve a cabo en las formas circulantes. Así, como que las partículas LDL pequeñas y densas atraviesan la barrera endotelial con más facilidad por su tamaño y también se unen con más facilidad a los proteoglicanos formando parte de la pared arterial y promoviendo una retención de lipoproteínas a nivel subendotelial, quizá sería más factible pensar que son estas partículas LDL las que se modifican. La detección, por tanto, de las partículas LDLgl en plasma reflejarían el desarrollo de áreas de arteriosclerosis. Esto podría estar relacionado con la gran susceptibilidad a la oxidación y procesos de glicación no enzimática que se han demostrado tanto "in vitro" como "in vivo" en las partículas LDL pequeñas y densas [179]. En este sentido, el trabajo de Younis y cols publicado recientemente hace referencia a que la concentración de partículas de LDL pequeñas y densas es un determinante todavía más potente de glicación de las LDL que la propia hiperglucemia [180]. Sin embargo, las diferencias de LDLox y LDLgl entre pacientes con DM2 y fenotipo A y los sujetos control son todavía significativas en nuestro trabajo. Es por ello que probablemente otros factores a parte del tamaño de las LDL tengan influencia. La hiperglucemia y el estrés oxidativo incrementado, típicos de la diabetes, afectan a las LDL circulantes, incluso en pacientes con fenotipo A, pero sobretodo a las partículas de LDL que se han quedado adheridas a la pared endotelial dañada. Otra posible explicación podría estar relacionada con la composición alterada de las HDL observada en los dos grupos de pacientes con DM2. Nuestros resultados indican que la composición de HDL está alterada tanto en los sujetos con DM2 y fenotipo A como en los que tienen fenotipo B, aunque las alteraciones son más intensas en este último grupo, de modo que las partículas de HDL en los sujetos con DM2 tienen más densidad y menor tamaño que las HDL de los sujetos control. Estas diferencias incluyen una alteración de los cocientes ApoA-I/ApoA-II y lípidos/proteínas. La ApoA-I tiene un papel protector contra la aterosclerosis, según estudios en ratones transgénicos, y además se ha sugerido que tiene propiedades antioxidantes de las partículas de LDL. En cambio, el papel de ApoA-II tanto en ratones como en humanos parece que es más proaterogénico. Así pues, la reducción de ApoA-I en HDL con el incremento concomitante de ApoA-II observado en los sujetos con DM2, sobretodo aquellos con fenotipo B, produciría partículas de HDL con menor capacidad antioxidante de LDL y también menos propiedades antiaterogénicas [181]. Del mismo

modo, el aumento del cociente lípidos/proteínas, hallado también en los pacientes con fenotipo B, sugiere un deterioro de las propiedades antioxidantes de HDL, ya que la subfracción HDL 2 (con una mayor proporción de lípidos/proteínas) tiene una capacidad antioxidante menor que la subfracción HDL 3 (con una relación de lípidos/proteínas inferior y, por tanto, menos densa) [182]. No obstante, es interesante añadir que en estudios de sujetos con prediabetes se ha hallado un aumento de la proporción de la subfracción de HDL 3 con respecto a sujetos sanos [183], sugiriendo que la hiperglucemia leve ya juega un papel importante en la distribución de las subclases de HDL.

Asimismo, la alteración en la composición de HDL de los pacientes con DM2 también apunta a una disminución de la capacidad para promover el transporte reverso del colesterol. Un aumento de triglicéridos y una disminución del contenido de colesterol de las HDL se han relacionado con un deterioro del flujo de colesterol desde las células adiposas a las hepáticas y, por tanto, con una reducción en la eliminación del organismo [184]. Esta alteración está presente en la HDL aislada de nuestros pacientes y podría ser indicativo de tal impedimento. Esto se manifiesta en sujetos diabéticos con fenotipo B en que la proporción de colesterol/triglicéridos en HDL es 2,5 veces menor que en los sujetos control.

Por otro lado, aunque la concentración de LDLox y LDLgl era superior en los pacientes con fenotipo B, la concentración relativa de LDL(-) no se vio afectada en presencia de LDL pequeñas y densas, ya que no hubo diferencias según el fenotipo. Esto sugiere que aunque la oxidación y la glicación podrían estar parcialmente involucradas en la generación de LDL(-), estos podrían no ser los mecanismos más importantes en los sujetos con DM2. Otro mecanismo involucrado en la formación de LDL(-) en diabetes podría ser la carga de AGL [185]. Como consecuencia, el aumento de niveles plasmáticos de AGL sería probablemente la principal causa del aumento de LDL(-) en diabetes.

Algunos estudios sugieren que los pacientes con síndrome metabólico e infarto miocárdico con elevación del segmento ST tienen una concentración superior de LDL (-) que los sujetos sanos [186;187], sugiriendo que éstas podrían tener un papel en el proceso de aterogénesis [188;189], incluyendo la apoptosis de las células endoteliales y la disfunción mitocondrial [190]. En nuestro trabajo, la concentración de LDL(-) fue superior en los sujetos con DM2, tanto con fenotipo A como con fenotipo B con respecto a los controles, lo que podría estar relacionado con un estado proinflamatorio,

ya que según estudios in vitro estas lipoproteínas modificadas provocan la liberación de IL-8 y MCP1 desde las células endoteliales [191]. Además, también se ha postulado que los niveles de LDL(-) podrían ser superiores en varones con síndrome metabólico respecto a las mujeres, lo que podría explicar el riesgo superior de coronariopatía en el sexo masculino [187]. De todos modos, nuestros datos no confirman esta hipótesis en varones con DM2, dado que las concentraciones de LDL(-) fueron similares en los hombres y mujeres de nuestro trabajo.

El papel de la Lp-PLA2 en la aterogénesis es controvertido, dado que se sabe que tiene un rol en la prevención de las modificaciones oxidativas [192], pero también se ha relacionado con la enfermedad coronaria y con el infarto cerebral [193]. Sin embargo, Lp-PLA2 muestra una fuerte asociación con los niveles de colesterol total y cLDL, y no existe un acuerdo definitivo con respecto a si este biomarcador es independiente de la concentración de cLDL [194]. Pocos estudios se han realizado en sujetos con DM2 y los resultados no son concluyentes. Nelson y cols publicaron que la Lp-PLA2 predice el riesgo futuro de DM2 [195], pero el Rotterdam Study no encontró una asociación entre la presencia de diabetes y la actividad total de la Lp-PLA2 [196]. Noto y cols., en cambio, sí que encontraron niveles superiores de Lp-PLA2 en sujetos con DM2 y, aún mayores en los casos en los que se asociaban otros criterios del síndrome metabólico, sobretodo la hipertrigliceridemia [197]. Con respecto a la asociación de Lp-PLA2 con la enfermedad cardiovascular, Hatoum y cols describieron que la actividad de Lp-PLA2 estaba asociada con la incidencia de la enfermedad coronaria en pacientes con DM2 [198], pero Nelson y cols no encontraron que la actividad de Lp-PLA2 explicara el exceso de riesgo cardiovascular en los sujetos con DM2 [199]. Kizer, por su parte, encontró asociaciones divergentes entre la actividad de Lp-PLA2 y el riesgo de enfermedad cardiovascular en una población con alta prevalencia de diabetes [200], sugiriendo que una posible explicación a estos hallazgos paradójicos podía ser la distinta distribución de Lp-PLA2 entre las lipoproteínas de alta y baja densidad. Sin embargo, sólo 3 estudios habían analizado hasta entonces la distribución de Lp-PLA2 entre las lipoproteínas en sujetos con DM2. Kujiraoka y cols publicaron que, aunque no se hallaron diferencias en la actividad total de Lp-PLA2 entre pacientes con DM2 y controles, la distribución de Lp-PLA2 estaba alterada, con una menor proporción de esta enzima unida a HDL en los sujetos con DM2 [201]. Recientemente, Mitsutake y cols obtuvieron resultados similares en pacientes con DM2 y también encontraron que la unión de Lp-PLA2 a HDL era menor en aquellos sujetos con elevado riesgo de calcificación de las arterias coronarias [202]. Finalmente, Onat y cols, que determinaron la concentración de Lp-PLA2, coincidieron

con estos autores y hallaron menor unión de esta enzima a HDL en los sujetos con DM2 [203]. Más recientemente, también se ha estudiado la actividad de HDL- Lp-PLA2 en sujetos con prediabetes, hallándose una menor actividad con respecto a sujetos no diabéticos, pero sin encontrarse diferencias en cuanto a la actividad total de Lp-PLA2 [183]. Sin embargo, ninguno de estos estudios tuvo en cuenta la presencia del fenotipo B. Nuestros datos indican que la actividad total incrementada de la Lp-PLA2 y su distribución anormal entre las lipoproteínas son dependientes en gran parte de la presencia del fenotipo B de las LDL. El alto contenido de Lp-PLA2 en las LDL de los pacientes con DM2 y fenotipo B es debido probablemente a la alta afinidad que tiene esta enzima a unirse a las partículas de LDL más pequeñas y densas [204]. La observación de que la Lp-PLA2 tiene un menor contenido en HDL en pacientes con fenotipo B que en aquellos con fenotipo A concurre con el concepto de que esta enzima tiene un papel antioxidante, cuando está unido a HDL [205]. Esto podría explicar también el aumento de la concentración de LDLox en pacientes diabéticos con fenotipo B.

PON1 es una esterasa presente en plasma y unida a HDL, que tiene un papel antioxidante de las partículas de LDL. La actividad de PON1 en nuestro estudio no se vio alterada en pacientes con DM2 en función del fenotipo de las LDL, ni tampoco respecto al grupo control. Estudios previos realizados en sujetos con prediabetes confirman estos datos, dado que tampoco se observaron diferencias en la actividad de PON1 [183]. Así, parecería que las alteraciones del metabolismo de la glucosa no juegan ningún papel en la actividad de PON1. Sin embargo, situaciones como la insuficiencia renal crónica en estadios terminales sí pueden reducir su actividad, provocando una disminución de la actividad antioxidante de las HDL.

Por tanto, nuestros datos coinciden con las publicaciones previas en que los pacientes con DM2 tienen alteraciones cualitativas de las HDL y LDL. Así, hemos demostrado por un lado que, algunas de estas modificaciones, aunque no todas, están relacionadas con el fenotipo B de los sujetos con DM2, sobretudo la alta concentración de LDLox y LDLgl y el elevado contenido de Lp-PLA2 en las lipoproteínas ricas en ApoB. También hemos confirmado que las alteraciones observadas en la composición de las HDL en los pacientes con fenotipo B fueron superiores a los pacientes con fenotipo A. Finalmente, nuestros datos sugieren que la influencia del tamaño de LDL en la composición de HDL y LDLgl es más fuerte en los sujetos DM2 que en los controles. Así pues, la relevancia de estos resultados reside en la gran prevalencia de sujetos con fenotipo B entre los pacientes con DM2 y mal control glucémico. Los

tratamientos dirigidos a cambiar el fenotipo de las LDL, incluyendo fibratos [206] o distintas estrategias para optimizar el control glucémico [207], podrían mejorar algunas características cualitativas proaterogénicas de las LDL y colaborar en la reducción del riesgo cardiovascular en los sujetos con DM2.

2.2 Estudio longitudinal: Efecto del control glucémico en pacientes con DM2 sobre el tamaño de las LDL, LDL(-) y distribución de la Lp-PLA2

Los resultados obtenidos en el estudio longitudinal muestran que la optimización del control glucémico promueve modificaciones ateroprotectoras en las partículas HDL y menos proaterogénicas en LDL, incluyendo partículas de LDL más grandes, menor proporción de partículas LDL(-) y menor actividad total de Lp-PLA2. Además, el control glucémico se asocia a una mayor proporción de Lp-PLA2 en las partículas de HDL, siendo este efecto más pronunciado en los sujetos que no recibían previamente tratamiento con fármacos hipolipemiantes.

Múltiples estudios valoran el papel que tiene la mejoría del control glucémico sobre los parámetros clásicos de la dislipemia diabética [208-210], pero muy pocos determinan los cambios en las características cualitativas de LDL y HDL y en la actividad de Lp-PLA2 en este contexto. Los resultados de nuestro trabajo demuestran que la mejoría del control glucémico reduce la actividad de Lp-PLA2 en pacientes con DM2 y cifras de LDL normales o casi normales. Esta reducción es atribuible fundamentalmente a la disminución de las lipoproteínas ricas en ApoB. Como consecuencia, la proporción relativa de Lp-PLA2 unida a HDL, que se supone que es ateroprotectora, incrementa [121]. El mecanismo subyacente a esta acción estaría relacionado por un lado con el aumento del tamaño de las partículas LDL pequeñas y densas y con la reducción de la proporción de partículas LDL(-), tras la optimización del control glucémico. Por otro lado, la reducción de AGL tras la mejoría del control glucémico podría también conducir a una disminución de LDL(-), dado que los AGL se han postulado como los principales determinantes de la carga electronegativa de las LDL [211]. No obstante, la reducción de las partículas de LDL(-) en sujetos con DM2 tras la optimización del control glucémico no es tan clara. Varios estudios han concluido que la mejoría del control glucémico con insulino terapia reducía los niveles de LDLgl, pero no los de LDL(-) [212;213]. Algunos estudios incluso han sugerido que distintos factores como la edad, el tiempo de evolución de la enfermedad, la presencia de enfermedad renal

crónica en estadios avanzados o una aterosclerosis ya subyacente, pueden estar involucrados en una respuesta distinta [50]. Además, Zhang y cols. sugirieron que la presencia de insulinoresistencia podía ser la causa de la falta de respuesta por parte de LDL(-) en determinados pacientes con DM2 [214]. En sujetos con DM1, en cambio, sí que se ha observado una clara reducción de las partículas de LDL(-) al mejorar el control glucémico. En nuestro estudio el hecho de que la optimización del control glucémico pudiera ser con cambios en el estilo de vida o metformina y no exclusivamente con insulino terapia podría haber colaborado a que se observe una reducción significativa de las partículas de LDL(-), que no se había visto en los otros estudios. Esta reducción de partículas de LDL(-) también podría asociarse con una reducción de la inflamación crónica de bajo grado presente en la DM2, dado que estudios in vitro habían sugerido que éstas promovían la liberación de IL-8 y MCP1 desde las células endoteliales [191].

Por otro lado, se ha descrito que estas partículas de LDL más pequeñas y densas, típicas del fenotipo B, igual que sucede con las más electronegativas, son los principales transportadores en plasma de Lp-PLA2. Así, la cantidad de Lp-PLA2 en las LDL pequeñas y densas o LDL(-) es de 5 a 10 veces mayor que en las partículas de tamaño normal o LDL electropositivas [159;215]. Entonces, cambios en la distribución de la Lp-PLA2 podrían estar relacionados con el aumento del tamaño de las LDL y la reducción de la proporción de LDL(-) que se asocian con la mejoría del control glucémico. Dado que la unión de Lp-PLA2 a las LDL depende de los residuos aminoterminales de ApoB, es factible que las LDL pequeñas y electronegativas puedan unirse con más afinidad a Lp-PLA2 por la conformación anómala de ApoB en esas partículas de LDL modificadas [216;217]. Sin embargo, mecanismos alternativos relacionados con las características físico-químicas de HDL podrían estar también implicados. Así, al mejorar el control glucémico, las partículas de HDL podrían aumentar su contenido en ApoA-I, cambiando el fenotipo a uno más antiaterogénico como el HDL 3 y, como consecuencia, aumentar la afinidad por Lp-PLA2 [218].

Alrededor de la mitad de los pacientes con DM2 de nuestro estudio estaban en tratamiento con fármacos hipolipemiantes, sobretudo estatinas. Dichos fármacos alteran la actividad, masa y distribución de la Lp-PLA2 en plasma [219;220], por un lado, y por otro, reducen los niveles de LDL(-), aunque sin modificar las LDLox [221]. En nuestro trabajo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de LDL(-) y LDLox entre el grupo tratado y no tratado con estatinas. No obstante, sí que se observó que los niveles de LDL(-) en el grupo

tratado con hipolipemiantes tenían cierta tendencia a ser inferiores. Probablemente si el número de pacientes hubiera sido mayor estas diferencias habrían llegado a la significancia. Se sabe que estos efectos están fuertemente relacionados con la reducción del cLDL. Para evitar las interferencias que podrían tener los cambios de la medicación hipolipemiente, no se modificó este tratamiento en ninguno de los sujetos durante el estudio. Sin embargo, para verificar que la medicación hipolipemiente previa no había tenido efecto sobre los resultados obtenidos, se estudiaron por separado los pacientes tratados con fármacos hipolipemiantes y se compararon con aquellos que no estaban bajo esta medicación. De forma interesante, se observó que el efecto del control glucémico sobre la Lp-PLA2 fue superior y estadísticamente significativo en aquellos pacientes que no recibían fármacos hipolipemiantes, probablemente porque los pacientes en tratamiento con estatinas ya partían de una actividad total de Lp-PLA2 inferior y mayor proporción de Lp-PLA2 en HDL, que aquellos sin medicación hipolipemiente previa.

El predominio de partículas de LDL pequeñas y densas, la elevada proporción de partículas LDL(-) y la distribución anormal de Lp-PLA2 sobretodo a expensas de las partículas ricas en ApoB, se han relacionado con un elevado riesgo cardiovascular [121;222;223] y son típicas de los pacientes con DM2 [50;122]. Por tanto, la mejoría del control glucémico podría promover cambios ateroprotectores en las características cualitativas de las partículas de LDL y la distribución de Lp-PLA2, independientemente de los cambios en el cLDL. Asimismo, una reducción de las partículas de LDL(-) podría conducir también a la disminución de la síntesis de determinados parámetros inflamatorios, que reducirían igualmente el riesgo cardiovascular. Los cambios de la distribución de Lp-PLA2 son además más pronunciados en aquellos pacientes con DM2 que no reciben tratamiento hipolipemiente. Así pues, aquellos sujetos con DM2 que están bajo tratamiento farmacológico con hipolipemiantes tienen menos margen para la mejoría de las características cualitativas de LDL tras la optimización del control glucémico porque ya tienen un perfil lipídico más favorable por el efecto de las estatinas. Esto podría tener especial relevancia en la práctica clínica habitual, dado que estos resultados indicarían que la intensificación del control glucémico podría tener beneficios adicionales en los sujetos con DM2 y valores de LDL cercanos a la normalidad, sin medicación hipolipemiente, de cara a reducir el riesgo cardiovascular.

3. “ESTADO INFLAMATORIO EN LOS PACIENTES CON DM2 Y MAL CONTROL GLUCÉMICO: EFECTO DEL CONTROL GLUCÉMICO”

El presente estudio confirma la existencia de una inflamación crónica de bajo grado en la DM2, que se asocia con determinados componentes del síndrome metabólico. Sin embargo, los hallazgos más importantes están relacionados con los niveles aumentados de TGF- β_1 en los pacientes con DM2 y fenotipo B, en comparación con los de fenotipo A, y su reducción tras la mejoría del control glucémico. Estos datos sugieren que TGF- β_1 podría ser un nexo de unión entre el control glucémico, la dislipemia diabética y el desarrollo de la nefropatía diabética.

3.1 Inflamación sistémica en los sujetos con DM2:

El análisis de los parámetros inflamatorios mostró que las concentraciones plasmáticas de PCR y MCP1 eran superiores y que las de adiponectina eran inferiores en pacientes con DM2 respecto a los controles. Esta observación indica un estado inflamatorio sistémico superior en sujetos con DM2, que podría reflejar un proceso aterosclerótico subyacente [224]. Nuestros hallazgos son concordantes con estudios transversales previos en los que se había encontrado una elevación de la PCR en sujetos con DM2 [85-87]. Además, la hipoadiponectinemia hallada en nuestros resultados en los pacientes con DM2 concuerda también con las publicaciones previas en las que se observa una asociación inversa entre los niveles de adiponectina y el síndrome metabólico o la DM2 [225]. Aunque los resultados publicados en la literatura sobre la asociación entre IL-6 y DM2 son contradictorios [86;226;227], la ausencia de diferencias estadísticamente significativas con IL-6 y otros parámetros inflamatorios en nuestro estudio puede estar relacionada con el hecho de que muchos de los pacientes estaban en tratamiento previo con metformina, fármacos antihipertensivos e hipolipemiantes, que han demostrado tener un efecto beneficioso sobre la inflamación [72-74].

Además, la información disponible acerca de la relación entre los marcadores inflamatorios y las características de la DM2 es limitada. Algunos estudios han demostrado una correlación entre los niveles de PCR y ciertos componentes del síndrome metabólico, incluyendo la adiposidad, la hiperinsulinemia, la insulino-resistencia, la hipertrigliceridemia y el cHDL bajo [82;228]. Estudios in vitro también sugieren que las LDL(-) de los sujetos con DM2 incrementan la síntesis de IL-8 y

MCP1 en las células endoteliales, independientemente del control glucémico [191]. Sin embargo, no se había estudiado si la preponderancia de partículas pequeñas y densas de LDL (fenotipo B de LDL), un componente de la dislipemia aterogénica, podía estar también relacionada con mayor inflamación sistémica. Así, de acuerdo a lo previamente publicado, nosotros hemos observado que los sujetos obesos tienen mayores concentraciones de PCR. También, que el estado inflamatorio es más desfavorable en aquellos sujetos con fenotipo B, quienes presentan niveles más elevados de TGF- β_1 y menores de adiponectina, que los pacientes DM2 con fenotipo A. Ningún otro estudio había examinado esta asociación hasta la fecha, aunque algunas publicaciones eran concordantes con la nuestra respecto a que los niveles de TGF- β_1 eran superiores en pacientes con síndrome metabólico respecto a aquellos sin él [115] y que las LDLox, que están aumentadas en los sujetos con DM2, se asocian con TGF- β_1 en sujetos con DM2 [229]. Además, los miembros de la familia de TGF- β han sido involucrados en defectos de la remodelación en modelos experimentales, los cuales podrían contribuir a explicar el peor pronóstico de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica en los pacientes con DM [230].

3.2 El efecto del control glucémico sobre los marcadores inflamatorios en DM2:

Estudios previos han demostrado que en los sujetos con intolerancia oral a la glucosa la inflamación crónica de bajo grado está relacionada con el trastorno metabólico de la glucosa [231] y cada vez hay más evidencia que apoya la hipótesis de que la inflamación sistémica crónica contribuye a disminuir la sensibilidad a la insulina [232]. Además, la hiperglucemia es un factor de estrés significativo que se ha demostrado que causa una inflamación crónica [233]. Sin embargo, la relación entre los marcadores de inflamación y el control glucémico no está del todo establecida. En nuestro estudio, ningún parámetro inflamatorio se correlacionó con los niveles de HbA_{1C}. Estos resultados son concordantes con los hallazgos previos de estudios observacionales en los que se han encontrado asociaciones poco consistentes entre la inflamación y los niveles de glucosa [67-69], posiblemente por el tratamiento previo con fármacos como la metformina, los ARA-II y las estatinas, que como se ha comentado previamente pueden haber limitado el poder para detectar asociación entre la HbA_{1C} y la inflamación.

No obstante, en el estudio longitudinal, hemos demostrado por primera vez que la mejoría del control glucémico con diferentes estrategias terapéuticas puede reducir los

niveles de TGF- β_1 . Estos resultados serían consistentes con los hallazgos en ratas diabéticas tratadas con insulina y con la expresión aumentada del receptor de TGF- β_1 en el riñón diabético y en las células mesangiales de células cultivadas en un ambiente rico en glucosa [111;234]. La falta de correlación significativa entre la magnitud de la reducción de la HbA_{1C} y TGF- β_1 tras la intensificación del control glucémico puede reflejar diferencias en la importancia relativa de lo local frente a los niveles sistémicos de glucosa en sangre, y no se opone a una relación subyacente entre estos dos parámetros. Por otro lado, la ausencia de cambios en la PCR y otros parámetros inflamatorios en nuestro estudio no pueden ser atribuidas a una ganancia ponderal ni tampoco al cambio farmacológico, y confirma los resultados de los pocos estudios que han evaluado el efecto de la mejoría del control glucémico sobre los parámetros inflamatorios en sujetos con DM1 y DM2 [70;71]. En el estudio DCCT (The Diabetes Control and Complications Trial), en el grupo de tratamiento intensivo no se observaron cambios en los niveles de PCR, aunque entre aquellos que ganaron más peso sí que se observó un aumento significativo de ésta. En la DM2, en un estudio con 18 pacientes que fueron hospitalizados por mal control glucémico para iniciar tratamiento con insulina, los niveles de PCR, aunque no los de MCP1 ni los de fibrinógeno, se redujeron a las 2 semanas del cambio de medicación. Este efecto podría resultar de las características antiinflamatorias de la insulina, aunque esto no se confirmó en el estudio de Pradhan y cols [70]. Ellos encontraron que, en pacientes con reciente debut de DM2, el tratamiento durante 14 semanas con insulina glargina o metformina comparado con placebo, no redujo la PCR, IL-6 ni TNF a pesar de mejorar el control glucémico. En nuestro estudio, la duración del mismo era suficiente para valorar la mejoría del control glucémico con HbA_{1C}, y una marcada mejoría del control glucémico fue evidenciada, sin cambios en el peso. Además, no se realizaron cambios en la medicación hipolipemiente ni antihipertensiva en ese período y en la mayor parte de pacientes la insulino terapia fue la estrategia utilizada para mejorar el control glucémico.

3.3 El posible papel de TGF- β_1 en la nefropatía diabética:

El papel fundamental de la hiperglucemia en el origen de la nefropatía diabética se ha establecido por estudios en cultivos celulares, modelos animales experimentales y ensayos clínicos. Ciertas citocinas se han identificado como posibles mediadores de los efectos de la hiperglucemia sobre el riñón. El TGF- β_1 , un factor pro-fibrótico conocido, activa la producción de matriz extracelular por las células mesangiales y

fibroblastos intersticiales en los riñones, y por lo tanto, contribuye a la manifestación de la enfermedad renal diabética a través de un número de eventos patológicos claves, que conducen finalmente a la reducción del filtrado glomerular y a la insuficiencia renal [113;114]. En las células mesangiales se ha demostrado que la expresión y actividad de TGF- β_1 están directamente influenciadas por los niveles de glucosa [111]. No obstante, estudios en ratones han hallado un efecto beneficioso de fármacos como los análogos de GLP-1 (glucagon-like peptide-1) en cuanto a la progresión de la nefropatía diabética y a marcadores del estrés oxidativo como TGF- β_1 , independientemente del control glucémico [235]. Por otro lado, la dislipemia aterogénica está asociada con la aparición y progresión de la nefropatía en pacientes con DM2 por un mecanismo no claramente establecido [236;237]. Algunos estudios realizados in vitro y otros en animales sugerían que la LDLox podría estimular la expresión de TGF- β_1 en las células epiteliales del glomérulo renal e inducir cambios patológicos como la glomeruloesclerosis. También en pacientes con DM2 se ha demostrado una elevación de TGF- β_1 y LDLox [229]. Nuestros datos apoyan estos hallazgos. Previamente ya habíamos encontrado que los pacientes con DM2 y fenotipo B de las LDL tenían unos niveles aumentados de LDLox, mientras que ahora hemos observado una elevación de TGF- β_1 en este subgrupo de pacientes. Por lo tanto, el hallazgo de una mayor concentración de TGF- β_1 en los pacientes con dislipemia aterogénica proporcionaría una posible explicación en la patogenia de la nefropatía diabética en este contexto.

Por tanto, el presente estudio confirma que la inflamación crónica de bajo grado en sujetos con DM2 está relacionada con rasgos del síndrome metabólico, como el fenotipo B de las LDL y la obesidad. Además, nuestros datos demuestran que la mejoría del control glucémico reduce los niveles de TGF- β_1 , a través de un mecanismo no conocido. De este modo, estos hallazgos pueden apoyar el papel de TGF- β_1 como un probable mediador de los efectos nocivos que tiene la hiperglucemia sobre el riñón y de los efectos beneficiosos de un estricto control glucémico en el desarrollo de la nefropatía diabética. Sin embargo, son necesarios futuros estudios en grupos más grandes de pacientes para confirmar estos hallazgos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN GENERAL:

Los sujetos con DM2, especialmente aquellos con fenotipo B de las subfracciones de las LDL, tienen niveles elevados de marcadores inflamatorios y alteraciones cualitativas de las partículas LDL y HDL relacionadas con mayor aterogenicidad. La intensificación del control glucémico, además de los beneficios ya conocidos y directamente relacionados con la reducción de la HbA_{1c}, aporta beneficios relacionados con la modificación de los parámetros inflamatorios y los cambios cualitativos en las partículas de LDL y HDL y de la distribución de Lp-PLA₂, que podrían contribuir a disminuir el riesgo cardiovascular en los pacientes con DM2.

CONCLUSIONES ESPECÍFICAS:

- La optimización del control glucémico mediante pautas bolo-basal es factible, eficaz y segura en sujetos con DM2 de larga evolución y mal controlados con otras pautas de insulina, sin modificar su calidad de vida.
- Los pacientes con DM2 y mal control glucémico tienen alteraciones cualitativas de las partículas de HDL y LDL.
- Aquellos sujetos con DM2 y fenotipo B de las subfracciones de las LDL tienen niveles más elevados de LDLox, LDLgl y de actividad total de Lp-PLA2, especialmente la ligada a las lipoproteínas ricas en ApoB.
- Los individuos con DM2 y fenotipo B de las subfracciones de las LDL además tienen alteraciones en la composición de las HDL, relacionadas con menor potencial antiaterogénico y antioxidante.
- Los pacientes con DM2, especialmente aquellos con obesidad o con fenotipo B de las partículas de LDL, tienen niveles más elevados de marcadores inflamatorios.
- La optimización del control glucémico en pacientes con DM2 promueve cambios ateroprotectores, incluyendo partículas de LDL más grandes, menor proporción de partículas LDL electronegativas y mayor actividad de Lp-PLA2 en las partículas de HDL.
- Los efectos del control glucémico en la distribución de Lp-PLA2 son más pronunciados en los pacientes que no recibían previamente tratamiento con fármacos hipolipemiantes.
- La optimización del control glucémico en la DM2 reduce los marcadores inflamatorios, independientemente de la estrategia de tratamiento hipoglucemiante.
- La reducción de TGF β_1 ligada a la mejoría del control glucémico podría estar relacionada con el efecto beneficioso que tiene la mejora del control glucémico en la prevención del desarrollo de la nefropatía diabética.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA:

- (1) Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiu E, Calle-Pascual A, Carmena R, Casamitjana R, Castano L, Castell C, Catala M, Delgado E, Franch J, Gaztambide S, Girbes J, Gomis R, Gutierrez G, Lopez-Alba A, Martinez-Larrad MT, Menendez E, Mora-Peces I, Ortega E, Pascual-Manich G, Rojo-Martinez G, Serrano-Rios M, Valdes S, Vazquez JA, Vendrell J: Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 2012; 55(1):88-93.
- (2) Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87(1):4-14.
- (3) Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ: The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365(9468):1415-1428.
- (4) Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE: The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1999; 104(6):787-794.
- (5) Weyer C, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE: Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose tolerance during each stage of type 2 diabetes development. *Diabetes Care* 2001; 24(1):89-94.
- (6) Calle MC, Fernandez ML: Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2012.
- (7) Marsh JB: Lipoprotein metabolism in obesity and diabetes: insights from stable isotope kinetic studies in humans. *Nutr Rev* 2003; 61(11):363-375.
- (8) Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM: Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990; 82(2):495-506.
- (9) Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L: Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364(9438):937-952.
- (10) Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di AE, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J: Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 2010; 375(9733):2215-2222.
- (11) Seshasai SR, Kaptoge S, Thompson A, Di AE, Gao P, Sarwar N, Whincup PH, Mukamal KJ, Gillum RF, Holme I, Njolstad I, Fletcher A, Nilsson P, Lewington S, Collins R, Gudnason V, Thompson SG, Sattar N, Selvin E, Hu FB, Danesh J: Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med* 2011; 364(9):829-841.
- (12) 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(25):3143-3421.
- (13) Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM: NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* 2003; 52(5):1210-1214.
- (14) Cano JF, Baena-Diez JM, Franch J, Vila J, Tello S, Sala J, Elosua R, Marrugat J: Long-term cardiovascular risk in type 2 diabetic compared with nondiabetic first acute myocardial infarction patients: a population-based cohort study in southern Europe. *Diabetes Care* 2010; 33(9):2004-2009.
- (15) Perk J, De BG, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syvanne M, Scholte Op Reimer WJ, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F: European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J* 2012; 33(13):1635-1701.
- (16) Turner RC, Millns H, Neil HA, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR, Holman RR: Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ* 1998; 316(7134):823-828.
- (17) Wagner AM, Perez A, Calvo F, Bonet R, Castellvi A, Ordonez J: Apolipoprotein(B) identifies dyslipidemic phenotypes associated with cardiovascular risk in normocholesterolemic type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999; 22(5):812-817.
- (18) Wagner AM, Perez A: [Diabetic dyslipidemia: assessment and treatment]. *Med Clin (Barc)* 2002; 119(7):260-264.
- (19) Mooradian AD: Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2009; 5(3):150-159.
- (20) Krauss RM: Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(6):1496-1504.
- (21) Ginsberg HN: Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000; 106(4):453-458.
- (22) Beers A, Haas MJ, Wong NC, Mooradian AD: Inhibition of apolipoprotein AI gene expression by tumor necrosis factor alpha: roles for MEK/ERK and JNK signaling. *Biochemistry* 2006; 45(7):2408-2413.
- (23) Taskinen MR: Diabetic dyslipidemia. *Atheroscler Suppl* 2002; 3(1):47-51.
- (24) Kannel WB: Lipids, diabetes, and coronary heart disease: insights from the Framingham Study. *Am Heart J* 1985; 110(5):1100-1107.
- (25) U.K. Prospective Diabetes Study 27. Plasma lipids and lipoproteins at diagnosis of NIDDM by age and sex: *Diabetes Care* 1997; 20(11):1683-1687.

- (26) Vinagre I, Mata-Cases M, Hermosilla E, Morros R, Fina F, Rosell M, Castell C, Franch-Nadal J, Bolibar B, Mauricio D: Control of glycemia and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes in primary care in Catalonia (Spain). *Diabetes Care* 2012; 35(4):774-779.
- (27) DAWBER TR, MOORE FE, MANN GV: Coronary heart disease in the Framingham study. *Am J Public Health Nations Health* 1957; 47(4 Pt 2):4-24.
- (28) Castelli WP: Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med* 1984; 76(2A):4-12.
- (29) West of Scotland Coronary Prevention Study: implications for clinical practice. The WOSCOPS Study Group: *Eur Heart J* 1996; 17(2):163-164.
- (30) Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM, Jr.: Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998; 279(20):1615-1622.
- (31) Major cardiovascular events in hypertensive patients randomized to doxazosin vs chlorthalidone: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). ALLHAT Collaborative Research Group: *JAMA* 2000; 283(15):1967-1975.
- (32) Soedamah-Muthu SS, Colhoun HM, Thomason MJ, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Fuller JH, Julier K, Mackness MI, Neil HA: The effect of atorvastatin on serum lipids, lipoproteins and NMR spectroscopy defined lipoprotein subclasses in type 2 diabetic patients with ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 2003; 167(2):243-255.
- (33) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S): *Lancet* 1994; 344(8934):1383-1389.
- (34) Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group: *N Engl J Med* 1998; 339(19):1349-1357.
- (35) Crouse JR, III, Raichlen JS, Riley WA, Evans GW, Palmer MK, O'Leary DH, Grobbee DE, Bots ML: Effect of rosuvastatin on progression of carotid intima-media thickness in low-risk individuals with subclinical atherosclerosis: the METEOR Trial. *JAMA* 2007; 297(12):1344-1353.
- (36) Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, Libby P, Raichlen JS, Ballantyne CM, Davignon J, Erbel R, Fruchart JC, Tardif JC, Schoenhagen P, Crowe T, Cain V, Wolski K, Goormastic M, Tuzcu EM: Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* 2006; 295(13):1556-1565.
- (37) Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ: Rosuvastatin to prevent vascular events in men and

- women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008; 359(21):2195-2207.
- (38) Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R: Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005; 366(9493):1267-1278.
- (39) Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, Kastelein JJ, Bittner V, Fruchart JC: HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2007; 357(13):1301-1310.
- (40) Giraldez RR, Giugliano RP, Mohanavelu S, Murphy SA, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E: Baseline low-density lipoprotein cholesterol is an important predictor of the benefit of intensive lipid-lowering therapy: a PROVE IT-TIMI 22 (Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 22) analysis. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(11):914-920.
- (41) Briel M, Ferreira-Gonzalez I, You JJ, Karanickolas PJ, Akl EA, Wu P, Blechacz B, Bassler D, Wei X, Sharman A, Whitt I, ves da SS, Khalid Z, Nordmann AJ, Zhou Q, Walter SD, Vale N, Bhatnagar N, O'Regan C, Mills EJ, Bucher HC, Montori VM, Guyatt GH: Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *BMJ* 2009; 338:b92.
- (42) Robins SJ, Collins D, Wittes JT, Papademetriou V, Deedwania PC, Schaefer EJ, McNamara JR, Kashyap ML, Hershman JM, Wexler LF, Rubins HB: Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285(12):1585-1591.
- (43) Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V: Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2007; 115(4):450-458.
- (44) Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, Forder P, Pillai A, Davis T, Glasziou P, Drury P, Kesaniemi YA, Sullivan D, Hunt D, Colman P, d'Emden M, Whiting M, Ehnholm C, Laakso M: Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 366(9500):1849-1861.
- (45) Abate N, Chandalia M: The ACCORD LIPID trial. *Metab Syndr Relat Disord* 2010; 8(5):373-374.
- (46) Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, Ito Y, Nakajima K, White CC, Cupples LA, Wilson PW, Schaefer EJ: Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: results from the Framingham Offspring Study 1. *Clin Chem* 2010; 56(6):967-976.
- (47) Simes RJ, Marschner IC, Hunt D, Colquhoun D, Sullivan D, Stewart RA, Hague W, Keech A, Thompson P, White H, Shaw J, Tonkin A: Relationship between lipid levels and clinical outcomes in the Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Trial: to what extent is the reduction in coronary

- events with pravastatin explained by on-study lipid levels?
1. *Circulation* 2002; 105(10):1162-1169.
- (48) van Lennep JE, Westerveld HT, van Lennep HW, Zwinderman AH, Erkelens DW, van der Wall EE: Apolipoprotein concentrations during treatment and recurrent coronary artery disease events
1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(11):2408-2413.
- (49) Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, Kontush A: Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(10):4963-4971.
- (50) Sanchez-Quesada JL, Perez A, Caixas A, Rigla M, Payes A, Benitez S, Ordonez-Llanos J: Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(7):3243-3249.
- (51) Wagner AM, Ordonez-Llanos J, Jorba O, Perez A: Predictors of change in low-density lipoprotein size during lipid-lowering treatment in type 2 diabetes. *Metabolism* 2004; 53(11):1516.
- (52) Scheffer PG, Bos G, Volwater HG, Dekker JM, Heine RJ, Teerlink T: Associations of LDL size with in vitro oxidizability and plasma levels of in vivo oxidized LDL in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2003; 20(7):563-567.
- (53) Chapman MJ, Guerin M, Bruckert E: Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J* 1998; 19 Suppl A:A24-A30.
- (54) Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D: Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 2000; 67(3):291-300.
- (55) Eschwege E: The dysmetabolic syndrome, insulin resistance and increased cardiovascular (CV) morbidity and mortality in type 2 diabetes: aetiological factors in the development of CV complications. *Diabetes Metab* 2003; 29(4 Pt 2):6S19-6S27.
- (56) Azar ST, Salti I, Zantout MS, Major S: Alterations in plasma transforming growth factor beta in normoalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(12):4680-4682.
- (57) Piemonti L, Calori G, Mercalli A, Lattuada G, Monti P, Garancini MP, Costantino F, Ruotolo G, Luzi L, Perseghin G: Fasting plasma leptin, tumor necrosis factor-alpha receptor 2, and monocyte chemoattracting protein 1 concentration in a population of glucose-tolerant and glucose-intolerant women: impact on cardiovascular mortality. *Diabetes Care* 2003; 26(10):2883-2889.
- (58) Sell H, Eckel J: Monocyte chemotactic protein-1 and its role in insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18(3):258-262.
- (59) Serban M, Tanaseanu C, Kosaka T, Vidulescu C, Stoian I, Marta DS, Tanaseanu S, Moldoveanu E: Significance of platelet-activating factor

- acetylhydrolase in patients with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *J Cell Mol Med* 2002; 6(4):643-647.
- (60) Wellen KE, Hotamisligil GS: Inflammation, stress, and diabetes 1. *J Clin Invest* 2005; 115(5):1111-1119.
- (61) Hotamisligil GS: Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444(7121):860-867.
- (62) Cawthorn WP, Sethi JK: TNF-alpha and adipocyte biology 1. *FEBS Lett* 2008; 582(1):117-131.
- (63) Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Vidal H, Hainque B: Variations in plasma soluble tumour necrosis factor receptors after diet-induced weight loss in obesity 1. *Diabetes Obes Metab* 2000; 2(5):323-325.
- (64) Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D: Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2002; 106(16):2067-2072.
- (65) Campos SP, Baumann H: Insulin is a prominent modulator of the cytokine-stimulated expression of acute-phase plasma protein genes. *Mol Cell Biol* 1992; 12(4):1789-1797.
- (66) Vazquez LA, Pazos F, Berrazueta JR, Fernandez-Escalante C, Garcia-Unzueta MT, Freijanes J, Amado JA: Effects of changes in body weight and insulin resistance on inflammation and endothelial function in morbid obesity after bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(1):316-322.
- (67) Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hulten LM, Hiukka A, Taskinen MR: Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2003; 166(2):387-394.
- (68) Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F: Increased levels of C-reactive protein in noncontrolled type II diabetic subjects. *J Diabetes Complications* 1999; 13(4):211-215.
- (69) Pickup JC, Mattock MB, Crook MA, Chusney GD, Burt D, Fitzgerald AP: Serum sialic acid concentration and coronary heart disease in NIDDM. *Diabetes Care* 1995; 18(8):1100-1103.
- (70) Pradhan AD, Everett BM, Cook NR, Rifai N, Ridker PM: Effects of initiating insulin and metformin on glycemic control and inflammatory biomarkers among patients with type 2 diabetes: the LANCET randomized trial. *JAMA* 2009; 302(11):1186-1194.
- (71) Takebayashi K, Aso Y, Inukai T: Initiation of insulin therapy reduces serum concentrations of high-sensitivity C-reactive protein in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2004; 53(6):693-699.
- (72) Suzuki H, Sakamoto M, Hayashi T, Iuchi H, Ohashi K, Isaka T, Sakamoto N, Kayama Y, Tojo K, Yoshimura M, Utsunomiya K: Effects of co-administration of candesartan with pioglitazone on inflammatory parameters in hypertensive

- patients with type 2 diabetes mellitus: a preliminary report. *Cardiovasc Diabetol* 2013; 12:71.
- (73) Tan KC, Chow WS, Tam SC, Ai VH, Lam CH, Lam KS: Atorvastatin lowers C-reactive protein and improves endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(2):563-568.
- (74) Wagner AM, Sanchez-Quesada JL, Benitez S, Bancells C, Ordonez-Llanos J, Perez A: Effect of statin and fibrate treatment on inflammation in type 2 diabetes. A randomized, cross-over study. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 93(1):e25-e28.
- (75) Belalcazar LM: A 1-year lifestyle intervention for weight loss in individuals with type 2 diabetes reduces high C-reactive protein levels and identifies metabolic predictors of change: from the Look AHEAD (Action for Health in Diabetes) study. 2010.
- (76) Hayashino Y, Jackson JL, Hirata T, Fukumori N, Nakamura F, Fukuhara S, Tsujii S, Ishii H: Effects of exercise on C-reactive protein, inflammatory cytokine and adipokine in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Metabolism* 2014; 63(3):431-440.
- (77) Ekmekci H, Ekmekci OB: The role of adiponectin in atherosclerosis and thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2006; 12(2):163-168.
- (78) Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De PG: C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(10):1416-1420.
- (79) de FS, Rifai N: C-reactive protein and cardiovascular disease: a review of risk prediction and interventions. *Clin Chim Acta* 2002; 317(1-2):1-15.
- (80) Libby P, Ridker PM, Hansson GK: Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(23):2129-2138.
- (81) Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286(3):327-334.
- (82) Festa A, D'Agostino R, Jr., Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM: Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000; 102(1):42-47.
- (83) Lee CC, Adler AI, Sandhu MS, Sharp SJ, Forouhi NG, Erqou S, Luben R, Bingham S, Khaw KT, Wareham NJ: Association of C-reactive protein with type 2 diabetes: prospective analysis and meta-analysis. *Diabetologia* 2009; 52(6):1040-1047.
- (84) Nakano S, Kuboki K, Matsumoto T, Nishimura C, Yoshino G: Small, dense LDL and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in metabolic syndrome with type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17(4):410-415.
- (85) Festa A, D'Agostino R, Jr., Tracy RP, Haffner SM: Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of

- type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002; 51(4):1131-1137.
- (86) Wang X, Bao W, Liu J, Ouyang YY, Wang D, Rong S, Xiao X, Shan ZL, Zhang Y, Yao P, Liu LG: Inflammatory Markers and Risk of Type 2 Diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2013; 36(1):166-175.
- (87) Wannamethee SG, Lowe GD, Rumley A, Cherry L, Whincup PH, Sattar N: Adipokines and risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* 2007; 30(5):1200-1205.
- (88) Belalcazar LM: A 1-year lifestyle intervention for weight loss in individuals with type 2 diabetes reduces high C-reactive protein levels and identifies metabolic predictors of change: from the Look AHEAD (Action for Health in Diabetes) study. 2010.
- (89) King DE, Mainous AG, III, Buchanan TA, Pearson WS: C-reactive protein and glycemic control in adults with diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26(5):1535-1539.
- (90) Schnell O, mann-Zalan I, Jelsovsky Z, Moritz A, Bermejo JL, Parkin CG, Schweitzer MA, Fisher L, Polonsky WH: Changes in A1C Levels Are Significantly Associated With Changes in Levels of the Cardiovascular Risk Biomarker hs-CRP: Results from the SteP study. *Diabetes Care* 2013; 36(7):2084-2089.
- (91) Jovinge S, Hamsten A, Tornvall P, Proudler A, Bavenholm P, Ericsson CG, Godsland I, De FU, Nilsson J: Evidence for a role of tumor necrosis factor alpha in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease. *Metabolism* 1998; 47(1):113-118.
- (92) Stephens JM, Lee J, Pilch PF: Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 1997; 272(2):971-976.
- (93) Wang B, Trayhurn P: Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Pflugers Arch* 2006; 452(4):418-427.
- (94) Qin B, Anderson RA, Adeli K: Tumor necrosis factor-alpha directly stimulates the overproduction of hepatic apolipoprotein B100-containing VLDL via impairment of hepatic insulin signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294(5):G1120-G1129.
- (95) Xydakis AM, Case CC, Jones PH, Hoogeveen RC, Liu MY, Smith EO, Nelson KW, Ballantyne CM: Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6):2697-2703.
- (96) Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000; 102(11):1296-1301.

- (97) Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K: Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116(7):1784-1792.
- (98) Coughlin CC, Finck BN, Eagon JC, Halpin VJ, Magkos F, Mohammed BS, Klein S: Effect of marked weight loss on adiponectin gene expression and plasma concentrations. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15(3):640-645.
- (99) Madsen EL, Rissanen A, Bruun JM, Skogstrand K, Tonstad S, Hougaard DM, Richelsen B: Weight loss larger than 10% is needed for general improvement of levels of circulating adiponectin and markers of inflammation in obese subjects: a 3-year weight loss study. *Eur J Endocrinol* 2008; 158(2):179-187.
- (100) Simpson KA, Singh MA: Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16(2):241-256.
- (101) Julius U: Influence of plasma free fatty acids on lipoprotein synthesis and diabetic dyslipidemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 111(5):246-250.
- (102) Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I: Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 2003; 52(7):1655-1663.
- (103) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8(11):1288-1295.
- (104) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257(1):79-83.
- (105) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(6):1595-1599.
- (106) Petersen AM, Pedersen BK: The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005; 98(4):1154-1162.
- (107) Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF: Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003; 361(9353):226-228.
- (108) Schiott A, Sjogren HO, Lindvall M: The three isoforms of transforming growth factor-beta co-stimulate rat T cells and inhibit lymphocyte apoptosis. *Scand J Immunol* 1998; 48(4):371-378.
- (109) Maheshwari A, Kelly DR, Nicola T, Ambalavanan N, Jain SK, Murphy-Ullrich J, Athar M, Shimamura M, Bhandari V, Aprahamian C, Dimmitt RA, Serra R, Ohls

- RK: TGF-beta2 suppresses macrophage cytokine production and mucosal inflammatory responses in the developing intestine. *Gastroenterology* 2011; 140(1):242-253.
- (110) Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, McGowan TA, Kapoor S, Kurnik BR, Kurnik PB, Weisberg LS: Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997; 46(5):854-859.
- (111) Koppel H, Riedl E, Braunagel M, Sauerhoefer S, Ehnert S, Godoy P, Sternik P, Dooley S, Yard BA: L-carnosine inhibits high-glucose-mediated matrix accumulation in human mesangial cells by interfering with TGF-beta production and signalling. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(12):3852-3858.
- (112) Iwano M, Kubo A, Nishino T, Sato H, Nishioka H, Akai Y, Kurioka H, Fujii Y, Kanauchi M, Shiiki H, Dohi K: Quantification of glomerular TGF-beta 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 1996; 49(4):1120-1126.
- (113) Lim AK, Tesch GH: Inflammation in diabetic nephropathy. *Mediators Inflamm* 2012; 2012:146154.
- (114) Loeffler I, Wolf G: Transforming growth factor-beta and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2013.
- (115) Sciarretta S, Ferrucci A, Ciavarella GM, De PP, Venturelli V, Tocci G, De BL, Rubattu S, Volpe M: Markers of inflammation and fibrosis are related to cardiovascular damage in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 2007; 20(7):784-791.
- (116) Kado S, Nagase T, Nagata N: Circulating levels of interleukin-6, its soluble receptor and interleukin-6/interleukin-6 receptor complexes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 1999; 36(1-2):67-72.
- (117) Shikano M, Sobajima H, Yoshikawa H, Toba T, Kushimoto H, Katsumata H, Tomita M, Kawashima S: Usefulness of a highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 2000; 85(1):81-85.
- (118) Mirza S, Hossain M, Mathews C, Martinez P, Pino P, Gay JL, Rentfro A, McCormick JB, Fisher-Hoch SP: Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: a cross-sectional study. *Cytokine* 2012; 57(1):136-142.
- (119) Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di AE, Kaptoge S, Ballantyne C, Cannon CP, Criqui M, Cushman M, Hofman A, Packard C, Thompson SG, Collins R, Danesh J: Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 2010; 375(9725):1536-1544.
- (120) Tsimikas S, Tsironis LD, Tselepis AD: New insights into the role of lipoprotein(a)-associated lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(10):2094-2099.

- (121) Tellis CC, Tselepis AD: The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791(5):327-338.
- (122) Kujiraoka T, Iwasaki T, Ishihara M, Ito M, Nagano M, Kawaguchi A, Takahashi S, Ishi J, Tsuji M, Egashira T, Stepanova IP, Miller NE, Hattori H: Altered distribution of plasma PAF-AH between HDLs and other lipoproteins in hyperlipidemia and diabetes mellitus. *J Lipid Res* 2003; 44(10):2006-2014.
- (123) Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O: Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358(6):580-591.
- (124) Genuth S, Eastman R, Kahn R, Klein R, Lachin J, Lebovitz H, Nathan D, Vinicor F: Implications of the United Kingdom prospective diabetes study. *Diabetes Care* 2003; 26 Suppl 1:S28-S32.
- (125) Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA: 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 359(15):1577-1589.
- (126) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: *Lancet* 1998; 352(9131):837-853.
- (127) Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M: Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 28(2):103-117.
- (128) Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefebvre PJ, Murray GD, Standl E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkeland K, Golay A, Heine RJ, Koranyi L, Laakso M, Mokan M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Schernthaner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U, Taton J: Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 366(9493):1279-1289.
- (129) Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC, Jr., Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH, Jr., Probstfield JL, Simons-Morton DG, Friedewald WT: Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358(24):2545-2559.
- (130) Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Heller S, Liu L, Mancia G, Mogensen CE, Pan C, Poulter N, Rodgers A, Williams B, Bompoint S, de Galan BE, Joshi R, Travert F: Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358(24):2560-2572.
- (131) Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, McCarren M, Vitek

- ME, Henderson WG, Huang GD: Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2009; 360(2):129-139.
- (132) Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B: Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* 2009; 52(1):17-30.
- (133) Rodbard HW, Jellinger PS: The American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology (AAACE/ACE) algorithm for managing glycaemia in patients with type 2 diabetes mellitus: comparison with the ADA/EASD algorithm. *Diabetologia* 2010; 53(11):2458-2460.
- (134) Executive summary: standards of medical care in diabetes--2014: *Diabetes Care* 2014; 37 Suppl 1:S5-13.
- (135) Arroyo J, Badia X, de la CH, Diez J, Esmatjes E, Fernandez I, Filozof C, Franch J, Gambus G, Gomis R, Navarro J, de Pablos P: [Management of type 2 diabetic patients in primary care in Spain]. *Med Clin (Barc)* 2005; 125(5):166-172.
- (136) Franch NJ, Artola MS, Diez EJ, Mata CM: [The evolution of quality care indicators of patients with type 2 diabetes in the Spanish primary care (1996-2007). The RedGEDAPS quality of care program]. *Med Clin (Barc)* 2010; 135(13):600-607.
- (137) Mata-Cases M, Roura-Olmeda P, Berengue-Iglesias M, Birules-Pons M, Mundet-Tuduri X, Franch-Nadal J, Benito-Badorrey B, Cano-Perez JF: Fifteen years of continuous improvement of quality care of type 2 diabetes mellitus in primary care in Catalonia, Spain. *Int J Clin Pract* 2012; 66(3):289-298.
- (138) Cooper JG, Claudi T, Jennum AK, Thue G, Hausken MF, Ingebrigtsen W, Sandberg S: Quality of care for patients with type 2 diabetes in primary care in Norway is improving: results of cross-sectional surveys of 33 general practices in 1995 and 2005. *Diabetes Care* 2009; 32(1):81-83.
- (139) Rothe U, Muller G, Schwarz PE, Seifert M, Kunath H, Koch R, Bergmann S, Julius U, Bornstein SR, Hanefeld M, Schulze J: Evaluation of a diabetes management system based on practice guidelines, integrated care, and continuous quality management in a Federal State of Germany: a population-based approach to health care research. *Diabetes Care* 2008; 31(5):863-868.
- (140) Saaddine JB, Cadwell B, Gregg EW, Engelgau MM, Vinicor F, Imperatore G, Narayan KM: Improvements in diabetes processes of care and intermediate outcomes: United States, 1988-2002. *Ann Intern Med* 2006; 144(7):465-474.
- (141) Vaghela P, Ashworth M, Schofield P, Gulliford MC: Population intermediate outcomes of diabetes under pay-for-performance incentives in England from 2004 to 2008. *Diabetes Care* 2009; 32(3):427-429.
- (142) Hoerger TJ, Segel JE, Gregg EW, Saaddine JB: Is glycemic control improving in U.S. adults? *Diabetes Care* 2008; 31(1):81-86.

- (143) Holman RR, Thorne KI, Farmer AJ, Davies MJ, Keenan JF, Paul S, Levy JC: Addition of biphasic, prandial, or basal insulin to oral therapy in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2007; 357(17):1716-1730.
- (144) Davies M, Sinnassamy P, Storms F, Gomis R: Insulin glargine-based therapy improves glycemic control in patients with type 2 diabetes sub-optimally controlled on premixed insulin therapies. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 79(2):368-375.
- (145) Fritsche A, Larbig M, Owens D, Haring HU: Comparison between a basal-bolus and a premixed insulin regimen in individuals with type 2 diabetes-results of the GINGER study. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12(2):115-123.
- (146) Liebl A, Prager R, Binz K, Kaiser M, Bergenstal R, Gallwitz B: Comparison of insulin analogue regimens in people with type 2 diabetes mellitus in the PREFER Study: a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 2009; 11(1):45-52.
- (147) Rosenstock J, Ahmann AJ, Colon G, Scism-Bacon J, Jiang H, Martin S: Advancing insulin therapy in type 2 diabetes previously treated with glargine plus oral agents: prandial premixed (insulin lispro protamine suspension/lispro) versus basal/bolus (glargine/lispro) therapy. *Diabetes Care* 2008; 31(1):20-25.
- (148) Sharplin P, Gordon J, Peters JR, Tetlow AP, Longman AJ, McEwan P: Switching from premixed insulin to glargine-based insulin regimen improves glycaemic control in patients with type 1 or type 2 diabetes: a retrospective primary-care-based analysis. *Cardiovasc Diabetol* 2009; 8:9.
- (149) Perez A, Franch J, Cases A, Gonzalez J, Jr., Conthe P, Gimeno E, Matali A: [Relationship between the degree of glycemic control and diabetes characteristics and hyperglycemia treatment in type 2 diabetes. DIABES Study] 1. *Med Clin (Barc)* 2012; 138(12):505-511.
- (150) Ha CY, Kim JY, Paik JK, Kim OY, Paik YH, Lee EJ, Lee JH: The association of specific metabolites of lipid metabolism with markers of oxidative stress, inflammation and arterial stiffness in men with newly diagnosed type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76(5):674-682.
- (151) Sanchez-Quesada JL, Perez A, Caixas A, Rigla M, Payes A, Benitez S, Ordonez-Llanos J: Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(7):3243-3249.
- (152) Sanchez-Quesada JL, Benitez S, Ordonez-Llanos J: Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15(3):329-335.
- (153) Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN: Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19(4):378-384.
- (154) Kontush A, Chapman MJ: Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21(4):312-318.

- (155) Mackness MI, Durrington PN, Mackness B: The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004; 4(4):211-217.
- (156) Belalcazar LM: A 1-year lifestyle intervention for weight loss in individuals with type 2 diabetes reduces high C-reactive protein levels and identifies metabolic predictors of change: from the Look AHEAD (Action for Health in Diabetes) study. 2010.
- (157) Sanchez-Quesada JL, Benitez S, Otal C, Franco M, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J: Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J Lipid Res* 2002; 43(5):699-705.
- (158) Sanchez-Quesada JL, Perez A, Caixas A, Ordonez-Llanos J, Carreras G, Payes A, Gonzalez-Sastre F, de LA: Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. *Diabetologia* 1996; 39(12):1469-1476.
- (159) Benitez S, Sanchez-Quesada JL, Ribas V, Jorba O, Blanco-Vaca F, Gonzalez-Sastre F, Ordonez-Llanos J: Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation* 2003; 108(1):92-96.
- (160) de Juan-Franco E, Perez A, Ribas V, Sanchez-Hernandez JA, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J, Sanchez-Quesada JL: Standardization of a method to evaluate the antioxidant capacity of high-density lipoproteins. *Int J Biomed Sci* 2009; 5(4):402-410.
- (161) Millan M: [Quality-of-life questionnaire designed for diabetes mellitus (EsDQOL)]. *Aten Primaria* 2002; 29(8):517-521.
- (162) Reliability and validity of a diabetes quality-of-life measure for the diabetes control and complications trial (DCCT). The DCCT Research Group: *Diabetes Care* 1988; 11(9):725-732.
- (163) Belalcazar LM: A 1-year lifestyle intervention for weight loss in individuals with type 2 diabetes reduces high C-reactive protein levels and identifies metabolic predictors of change: from the Look AHEAD (Action for Health in Diabetes) study. 2010.
- (164) Rodbard HW, Jellinger PS: The American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology (AAACE/ACE) algorithm for managing glycaemia in patients with type 2 diabetes mellitus: comparison with the ADA/EASD algorithm. *Diabetologia* 2010; 53(11):2458-2460.
- (165) Moghissi ES: Addressing hyperglycemia from hospital admission to discharge. *Curr Med Res Opin* 2010; 26(3):589-598.
- (166) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: *N Engl J Med* 1993; 329(14):977-986.
- (167) Rosenstock J, Ahmann AJ, Colon G, Scism-Bacon J, Jiang H, Martin S: Advancing insulin therapy in type 2 diabetes previously treated with glargine

- plus oral agents: prandial premixed (insulin lispro protamine suspension/lispro) versus basal/bolus (glargine/lispro) therapy. *Diabetes Care* 2008; 31(1):20-25.
- (168) Giugliano D, Tracz M, Shah S, Calle-Pascual A, Mistodie C, Duarte R, Sari R, Woo V, Jiletcovici AO, Deinhard J, Wille SA, Kiljanski J: Initiation and gradual intensification of premixed insulin lispro therapy versus Basal {+/-} mealtime insulin in patients with type 2 diabetes eating light breakfasts. *Diabetes Care* 2014; 37(2):372-380.
- (169) Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, Crouse JR, III, Leiter LA, Linz P, Friedewald WT, Buse JB, Gerstein HC, Probstfield J, Grimm RH, Ismail-Beigi F, Bigger JT, Goff DC, Jr., Cushman WC, Simons-Morton DG, Byington RP: Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2010; 362(17):1563-1574.
- (170) Menard J, Payette H, Dubuc N, Baillargeon JP, Maheux P, Ardilouze JL: Quality of life in type 2 diabetes patients under intensive multitherapy. *Diabetes Metab* 2007; 33(1):54-60.
- (171) Masuda H, Sakamoto M, Irie J, Kitaoka A, Shiono K, Inoue G, Atsuda K, Yamada S: Comparison of twice-daily injections of biphasic insulin lispro and basal-bolus therapy: glycaemic control and quality-of-life of insulin-naive type 2 diabetic patients. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10(12):1261-1265.
- (172) Giugliano D, Tracz M, Shah S, Calle-Pascual A, Mistodie C, Duarte R, Sari R, Woo V, Jiletcovici AO, Deinhard J, Wille SA, Kiljanski J: Initiation and gradual intensification of premixed insulin lispro therapy versus Basal {+/-} mealtime insulin in patients with type 2 diabetes eating light breakfasts. *Diabetes Care* 2014; 37(2):372-380.
- (173) Bergenstal RM, Johnson M, Powers MA, Wynne A, Vlajnic A, Hollander P, Rendell M: Adjust to target in type 2 diabetes: comparison of a simple algorithm with carbohydrate counting for adjustment of mealtime insulin glulisine. *Diabetes Care* 2008; 31(7):1305-1310.
- (174) Miser WF, Arakaki R, Jiang H, Scism-Bacon J, Anderson PW, Fahrback JL: Randomized, open-label, parallel-group evaluations of basal-bolus therapy versus insulin lispro premixed therapy in patients with type 2 diabetes mellitus failing to achieve control with starter insulin treatment and continuing oral antihyperglycemic drugs: a noninferiority intensification substudy of the DURABLE trial. *Clin Ther* 2010; 32(5):896-908.
- (175) Hollander P, Cooper J, Bregnhøj J, Pedersen CB: A 52-week, multinational, open-label, parallel-group, noninferiority, treat-to-target trial comparing insulin detemir with insulin glargine in a basal-bolus regimen with mealtime insulin aspart in patients with type 2 diabetes. *Clin Ther* 2008; 30(11):1976-1987.
- (176) Gazi I, Lourida ES, Filippatos T, Tsimihodimos V, Elisaf M, Tselepis AD: Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of small, dense LDL particles in human plasma. *Clin Chem* 2005; 51(12):2264-2273.
- (177) Cohen MP, Lautenslager G, Shea E: Glycated LDL concentrations in non-diabetic and diabetic subjects measured with monoclonal antibodies reactive with glycated apolipoprotein B epitopes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31(11):707-713.

- (178) Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Bang H, Heiss G, Duncan BB, Folsom AR, Pankow JS: Circulating oxidised low-density lipoprotein and intercellular adhesion molecule-1 and risk of type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetologia* 2007; 50(1):36-42.
- (179) Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN: Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19(4):378-384.
- (180) Younis NN, Soran H, Sharma R, Charlton-Menys V, Greenstein A, Elseweidy MM, Durrington PN: Small-dense LDL and LDL glycation in metabolic syndrome and in statin-treated and non-statin-treated type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 2010; 7(4):289-295.
- (181) Ribas V, Sanchez-Quesada JL, Anton R, Camacho M, Julve J, Escola-Gil JC, Vila L, Ordonez-Llanos J, Blanco-Vaca F: Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res* 2004; 95(8):789-797.
- (182) Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ: Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(10):1881-1888.
- (183) Filippatos TD, Rizos EC, Tsimihodimos V, Gazi IF, Tselepis AD, Elisaf MS: Small high-density lipoprotein (HDL) subclasses are increased with decreased activity of HDL-associated phospholipase A(2) in subjects with prediabetes. *Lipids* 2013; 48(6):547-555.
- (184) Camont L, Chapman MJ, Kontush A: Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med* 2011; 17(10):594-603.
- (185) Benitez S, Sanchez-Quesada JL, Lucero L, Arcelus R, Ribas V, Jorba O, Castellvi A, Alonso E, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J: Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis* 2002; 160(1):223-232.
- (186) Chan HC, Ke LY, Chu CS, Lee AS, Shen MY, Cruz MA, Hsu JF, Cheng KH, Chan HC, Lu J, Lai WT, Sawamura T, Sheu SH, Yen JH, Chen CH: Highly electronegative LDL from patients with ST-elevation myocardial infarction triggers platelet activation and aggregation. *Blood* 2013; 122(22):3632-3641.
- (187) Lee AS, Chen WY, Chan HC, Hsu JF, Shen MY, Chang CM, Bair H, Su MJ, Chang KC, Chen CH: Gender disparity in LDL-induced cardiovascular damage and the protective role of estrogens against electronegative LDL. *Cardiovasc Diabetol* 2014; 13(1):64.
- (188) Chen CH, Jiang T, Yang JH, Jiang W, Lu J, Marathe GK, Pownall HJ, Ballantyne CM, McIntyre TM, Henry PD, Yang CY: Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription. *Circulation* 2003; 107(16):2102-2108.

- (189) Lee AS, Wang GJ, Chan HC, Chen FY, Chang CM, Yang CY, Lee YT, Chang KC, Chen CH: Electronegative low-density lipoprotein induces cardiomyocyte apoptosis indirectly through endothelial cell-released chemokines. *Apoptosis* 2012; 17(9):1009-1018.
- (190) Lu J, Yang JH, Burns AR, Chen HH, Tang D, Walterscheid JP, Suzuki S, Yang CY, Sawamura T, Chen CH: Mediation of electronegative low-density lipoprotein signaling by LOX-1: a possible mechanism of endothelial apoptosis. *Circ Res* 2009; 104(5):619-627.
- (191) Benitez S, Perez A, Sanchez-Quesada JL, Wagner AM, Rigla M, Arcelus R, Jorba O, Ordonez-Llanos J: Electronegative low-density lipoprotein subfraction from type 2 diabetic subjects is proatherogenic and unrelated to glycemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23(1):26-34.
- (192) Zalewski A, Macphee C: Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(5):923-931.
- (193) Koenig W, Khuseynova N: Lipoprotein-associated and secretory phospholipase A2 in cardiovascular disease: the epidemiological evidence. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009; 23(1):85-92.
- (194) Bhatti S, Hakeem A, Cilingiroglu M: Lp-PLA(2) as a marker of cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep* 2010; 12(2):140-144.
- (195) Nelson TL, Biggs ML, Kizer JR, Cushman M, Hokanson JE, Furberg CD, Mukamal KJ: Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) and future risk of type 2 diabetes: results from the Cardiovascular Health Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(5):1695-1701.
- (196) Oei HH, van dM, I, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM, Witteman JC: Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* 2005; 111(5):570-575.
- (197) Noto H, Chitkara P, Raskin P: The role of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in the metabolic syndrome and diabetes. *J Diabetes Complications* 2006; 20(6):343-348.
- (198) Hatoum IJ, Hu FB, Nelson JJ, Rimm EB: Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and incident coronary heart disease among men and women with type 2 diabetes. *Diabetes* 2010; 59(5):1239-1243.
- (199) Nelson TL, Kamineni A, Psaty B, Cushman M, Jenny NS, Hokanson J, Furberg C, Mukamal KJ: Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and future risk of subclinical disease and cardiovascular events in individuals with type 2 diabetes: the Cardiovascular Health Study. *Diabetologia* 2011; 54(2):329-333.
- (200) Kizer JR, Umans JG, Zhu J, Devereux RB, Wolfert RL, Lee ET, Howard BV: Lipoprotein-associated phospholipase A(2) mass and activity and risk of cardiovascular disease in a population with high prevalences of obesity and diabetes: the Strong Heart Study. *Diabetes Care* 2012; 35(4):840-847.

- (201) Kujiraoka T, Iwasaki T, Ishihara M, Ito M, Nagano M, Kawaguchi A, Takahashi S, Ishi J, Tsuji M, Egashira T, Stepanova IP, Miller NE, Hattori H: Altered distribution of plasma PAF-AH between HDLs and other lipoproteins in hyperlipidemia and diabetes mellitus. *J Lipid Res* 2003; 44(10):2006-2014.
- (202) Mitsutake R, Miura S, Zhang B, Saku K: HDL-associated factors provide additional prognostic information for coronary artery disease as determined by multi-detector row computed tomography. *Int J Cardiol* 2010; 143(1):72-78.
- (203) Onat A, Hergenc G, Can G, Ugur M, Nartop F: Dual activity of serum lipoprotein-associated phospholipase A(2) yielding positive and inverse associations with cardiometabolic risk. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(8):1349-1357.
- (204) Gazi I, Lourida ES, Filippatos T, Tsimihodimos V, Elisaf M, Tselepis AD: Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of small, dense LDL particles in human plasma. *Clin Chem* 2005; 51(12):2264-2273.
- (205) Rallidis LS, Tellis CC, Lekakis J, Rizos I, Varounis C, Charalampopoulos A, Zolindaki M, Dargès N, Nastasiou-Nana M, Tselepis AD: Lipoprotein-associated phospholipase A(2) bound on high-density lipoprotein is associated with lower risk for cardiac death in stable coronary artery disease patients: a 3-year follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60(20):2053-2060.
- (206) Wagner AM, Jorba O, Bonet R, Ordonez-Llanos J, Perez A: Efficacy of atorvastatin and gemfibrozil, alone and in low dose combination, in the treatment of diabetic dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(7):3212-3217.
- (207) Sanchez-Quesada JL, Vinagre I, Juan-Franco E, Sanchez-Hernandez J, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J, Perez A: Effect of improving glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus on low-density lipoprotein size, electronegative low-density lipoprotein and lipoprotein-associated phospholipase A2 distribution. *Am J Cardiol* 2012; 110(1):67-71.
- (208) Gonen B, White N, Schonfeld G, Skor D, Miller P, Santiago J: Plasma levels of apoprotein B in patients with diabetes mellitus: the effect of glycemic control. *Metabolism* 1985; 34(7):675-679.
- (209) Rizkalla SW, Taghrid L, Laromiguiere M, Huet D, Boillot J, Rigoir A, Elgrably F, Slama G: Improved plasma glucose control, whole-body glucose utilization, and lipid profile on a low-glycemic index diet in type 2 diabetic men: a randomized controlled trial. *Diabetes Care* 2004; 27(8):1866-1872.
- (210) Wagner AM, Jorba O, Rigla M, Bonet R, de LA, Ordonez-Llanos J, Perez A: Effect of improving glycemic control on low-density lipoprotein particle size in type 2 diabetes. *Metabolism* 2003; 52(12):1576-1578.
- (211) Gaubatz JW, Gillard BK, Massey JB, Hoogeveen RC, Huang M, Lloyd EE, Raya JL, Yang CY, Pownall HJ: Dynamics of dense electronegative low density lipoproteins and their preferential association with lipoprotein phospholipase A(2). *J Lipid Res* 2007; 48(2):348-357.

- (212) Benitez S, Perez A, Sanchez-Quesada JL, Wagner AM, Rigla M, Arcelus R, Jorba O, Ordonez-Llanos J: Electronegative low-density lipoprotein subfraction from type 2 diabetic subjects is proatherogenic and unrelated to glycemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23(1):26-34.
- (213) Gambino R, Uberti B, Alemanno N, Pisu E, Pagano G, Cassader M: In vivo oxidizability of LDL in type 2 diabetic patients in good and poor glycemic control. *Atherosclerosis* 2004; 173(1):103-107.
- (214) Zhang B, Kaneshi T, Ohta T, Saku K: Relation between insulin resistance and fast-migrating LDL subfraction as characterized by capillary isotachopheresis. *J Lipid Res* 2005; 46(10):2265-2277.
- (215) Gazi I, Lourida ES, Filippatos T, Tsimihodimos V, Elisaf M, Tselepis AD: Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of small, dense LDL particles in human plasma. *Clin Chem* 2005; 51(12):2264-2273.
- (216) Bancells C, Benitez S, Ordonez-Llanos J, Oorni K, Kovanen PT, Milne RW, Sanchez-Quesada JL: Immunochemical analysis of the electronegative LDL subfraction shows that abnormal N-terminal apolipoprotein B conformation is involved in increased binding to proteoglycans. *J Biol Chem* 2011; 286(2):1125-1133.
- (217) Lund-Katz S, Laplaud PM, Phillips MC, Chapman MJ: Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies: implication for LDL receptor interaction. *Biochemistry* 1998; 37(37):12867-12874.
- (218) Camont L, Chapman MJ, Kontush A: Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med* 2011; 17(10):594-603.
- (219) Papatheanasiou AI, Lourida ES, Tsironis LD, Goudevenos JA, Tselepis AD: Short- and long-term elevation of autoantibody titers against oxidized LDL in patients with acute coronary syndromes. Role of the lipoprotein-associated phospholipase A2 and the effect of atorvastatin treatment. *Atherosclerosis* 2008; 196(1):289-297.
- (220) Tsimihodimos V, Karabina SA, Tambaki AP, Bairaktari E, Goudevenos JA, Chapman MJ, Elisaf M, Tselepis AD: Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(2):306-311.
- (221) Sanchez-Quesada JL, Otal-Entraigas C, Franco M, Jorba O, Gonzalez-Sastre F, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J: Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1999; 84(6):655-659.
- (222) Musliner TA, Krauss RM: Lipoprotein subspecies and risk of coronary disease. *Clin Chem* 1988; 34(8B):B78-B83.
- (223) Oliveira JA, Sevanian A, Rodrigues RJ, Apolinario E, Abdalla DS: Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. *Clin Biochem* 2006; 39(7):708-714.

- (224) Baars T, Konorza T, Kahlert P, Mohlenkamp S, Erbel R, Heusch G, Kleinbongard P: Coronary aspirate TNFalpha reflects saphenous vein bypass graft restenosis risk in diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol* 2013; 12:12.
- (225) Fernandez-Berges D, Consuegra-Sanchez L, Penafiel J, Cabrera de LA, Vila J, Felix-Redondo FJ, Segura-Fragoso A, Lapetra J, Guembe MJ, Vega T, Fito M, Elosua R, Diaz O, Marrugat J: Metabolic and Inflammatory Profiles of Biomarkers in Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes in a Mediterranean Population. *DARIOS Inflammatory Study. Rev Esp Cardiol* 2014.
- (226) Bertoni AG, Burke GL, Owusu JA, Carnethon MR, Vaidya D, Barr RG, Jenny NS, Ouyang P, Rotter JI: Inflammation and the incidence of type 2 diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care* 2010; 33(4):804-810.
- (227) Krakoff J, Funahashi T, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Tanaka S, Matsuzawa Y, Kobes S, Tataranni PA, Hanson RL, Knowler WC, Lindsay RS: Inflammatory markers, adiponectin, and risk of type 2 diabetes in the Pima Indian. *Diabetes Care* 2003; 26(6):1745-1751.
- (228) Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW: C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(4):972-978.
- (229) Nakhjavani M, Esteghamati A, Asgarani F, Khalilzadeh O, Nikzamir A, Safari R: Association of oxidized low-density lipoprotein and transforming growth factor-beta in type 2 diabetic patients: a cross-sectional study. *Transl Res* 2009; 153(2):86-90.
- (230) Di BE, Campagnolo P, Margariti A, Zampetaki A, Karamariti E, Hu Y, Xu Q: Endothelial lineage differentiation from induced pluripotent stem cells is regulated by microRNA-21 and transforming growth factor beta2 (TGF-beta2) pathways. *J Biol Chem* 2013.
- (231) Muller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, Giani G, Illig T, Thorand B, Kolb H: Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. *Diabetologia* 2002; 45(6):805-812.
- (232) Pickup JC: Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(3):813-823.
- (233) Astrup A, Finer N: Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? *Obes Rev* 2000; 1(2):57-59.
- (234) Isono M, Mogyorosi A, Han DC, Hoffman BB, Ziyadeh FN: Stimulation of TGF-beta type II receptor by high glucose in mouse mesangial cells and in diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278(5):F830-F838.
- (235) Hendarto H, Inoguchi T, Maeda Y, Ikeda N, Zheng J, Takei R, Yokomizo H, Hirata E, Sonoda N, Takayanagi R: GLP-1 analog liraglutide protects against oxidative stress and albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats via

protein kinase A-mediated inhibition of renal NAD(P)H oxidases. *Metabolism* 2012; 61(10):1422-1434.

- (236) Caramori ML, Fioretto P, Mauer M: The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes* 2000; 49(9):1399-1408.
- (237) Muntner P, Coresh J, Smith JC, Eckfeldt J, Klag MJ: Plasma lipids and risk of developing renal dysfunction: the atherosclerosis risk in communities study. *Kidney Int* 2000; 58(1):293-301.