

Sofía Pilar Pérez Calahorra

Efecto del consumo de cervezas  
sin alcohol con diferente  
composición de carbohidratos  
sobre la respuesta metabólica  
posprandial

Director/es

Lamiquiz Moneo, Itziar  
Mateo Gallego, Rocío

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**EFFECTO DEL CONSUMO DE CERVEZAS SIN  
ALCOHOL CON DIFERENTE COMPOSICIÓN DE  
CARBOHIDRATOS SOBRE LA RESPUESTA  
METABÓLICA POSPRANDIAL**

Autor

**Sofía Pilar Pérez Calahorra**

Director/es

Lamiquiz Moneo, Itziar  
Mateo Gallego, Rocío

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud y del Deporte

2022



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE ENFERMERIA Y FISIATRÍA**



**Universidad  
Zaragoza**

**EFFECTO DEL CONSUMO DE CERVEZAS SIN ALCOHOL CON  
DIFERENTE COMPOSICIÓN DE CARBOHIDRATOS SOBRE LA  
RESPUESTA METABÓLICA POSPRANDIAL**

**SOFÍA PILAR PÉREZ CALAHORRA**

TESIS DOCTORAL

-2022-



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE ENFERMERIA Y FISIATRÍA**



**Universidad**  
Zaragoza

**EFFECTO DEL CONSUMO DE CERVEZAS SIN ALCOHOL CON  
DIFERENTE COMPOSICIÓN DE CARBOHIDRATOS SOBRE LA  
RESPUESTA METABÓLICA POSPRANDIAL**

Memoria presentada por:

**SOFÍA PILAR PÉREZ CALAHORRA**

para optar el Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Dirigida por

**Dra. ITZIAR LAMIQUIZ MONEO**

**Dra. ROCÍO MATEO GALLEGO**

-Febrero 2022-

DÑA. **ITZIAR LAMIQUIZ MONEO**, Doctora en Bioquímica, Biología Celular y Molecular . Profesora Ayudante Doctor en el Departamento de Anatomía y Histología Humanas en la Universidad de Zaragoza e Investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón).

DÑA. **ROCÍO MATEO GALLEGO**, Doctora en Medicina. Profesora Ayudante Doctor en el Departamento de Enfermería y Fisiatría de la Universidad de Zaragoza e Investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón).

Codirectores de esta Tesis Doctoral,

CERTIFICAN

Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada: “**EFFECTO DEL CONSUMO DE CERVEZAS SIN ALCOHOL CON DIFERENTE COMPOSICIÓN DE CARBOHIDRATOS SOBRE LA RESPUESTA METABÓLICA POSPRANDIAL**”, presentada por **DÑA.SOFÍA PILAR PÉREZ CALAHORRA**, ha sido realizada en la Unidad de Investigación Traslacional del Instituto Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón) ubicada en el Hospital Universitario Miguel Servet bajo su dirección, de acuerdo a los objetivos presentados en proyecto de tesis aprobado por el Programa de Doctorado de ciencias de la salud y del deporte, reúne los requisitos para ser presentada por su autora para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza y autorizan su presentación.

Zaragoza, 3 de Febrero del 2022.

LAMIQUIZ  
MONEO  
ITZIAR - DNI  
76924903T

Firmado digitalmente  
por LAMIQUIZ  
MONEO ITZIAR - DNI  
76924903T  
Fecha: 2022.02.01  
12:03:47 +01'00'

Fdo.: Itziar Lamiquiz Moneo

MATEO  
GALLEGO  
ROCIO - DNI  
72995601H

Firmado digitalmente  
por MATEO GALLEGO  
ROCIO - DNI  
72995601H  
Fecha: 2022.02.01  
21:43:33 +01'00'

Fdo.: Rocío Mateo Gallego





*A mis padres*

*A mi hermana*

*A mis hijos*

*A Carmelo*



## AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, quiero agradecer a todas las personas que forman y han formado parte de mi vida, tanto a nivel personal como laboral, ya que sin ninguna de ellas esto seguramente no hubiese sido posible, y en especial todas las experiencias y momentos vividos con cada uno de ellos, han contribuido en las decisiones más importantes. Agradecer a cada uno de ellos, el apoyo, el cariño y la ayuda recibida, porque han permitido que no abandone, y luche día a día para conseguir uno de los objetivos más importantes de mi vida. Agradecer el apoyo ofrecido, en este largo camino, a veces insidioso, pedregoso y con alguna sombra, pero que a su vez ha permitido obtener cosas tan maravillosas, como un aprendizaje valioso en todos los sentidos, sentirme reconfortada por mis decisiones basadas en mis valores, pero lo más valioso de todo, es que me ha permitido darme cuenta de las personas que de verdad valen la pena, y con las que voy a caminar el resto de mi vida.

Quiero continuar mi agradecimientos, dando mi más sincero agradecimiento a dos personas, mis directoras de tesis. Ellas son la Dra. Rocío Mateo Gallego y la Dra. Itziar Lamiquiz Moneo, las cuales me han dado la oportunidad de llegar hasta este momento. Tanto a la Dra. Rocío Mateo-Gallego como a la Dra. Itziar Lamiquiz, les podría dedicar líneas y líneas de buenas palabras, palabras de admiración, pero también de cariño y de amistad. De modo individual, quiero agradecer a Rocío, quien hace más de 10 años fue quien apostó por mí y me dio la posibilidad que descubriera el mundo de la investigación. Agradecerle especialmente, el haberme enseñado el amor por la investigación, el esfuerzo, el sacrificio y la recompensa, pero también todo el apoyo y ayuda ofrecida además de su amistad, y en donde el trabajo en equipo fue la pieza angular. Su humildad, su carisma, su personalidad, su disponibilidad, su honradez, su transparencia y su capacidad de trabajo bien hecho, ha supuesto en mí admiración plena en todos los sentidos. Agradezco del mismo modo a Itziar, que aunque durante menos tiempo compartimos equipo fue igual de intenso. Agradecerle toda su dedicación, sus enseñanzas, su compromiso y excelencia en cada una de las cosas que hace, su ayuda, amabilidad, bondad, educación y gratitud, y en especial su disponibilidad para facilitar el proceso y ayudar, pero sin olvidar ni mucho menos su amistad. Tanto Rocío como Itziar son dos personas maravillosas que me llevo para el resto de mi vida y que espero que el camino que ahora comience, nos permita en parte caminar juntas.

Muchas personas han formado parte de esta andadura laboral, y más concretamente a nivel de investigación, entre ellas y en especial Estibaliz, Lucía, Ana B, Charo, y aunque hace un tiempo que ya no compartimos espacios, quería agradecerles su ayuda así como los muchos momentos vividos durante esos años. Continuo con Rosa, que de forma corta pero intensa, se

## AGRADECIMIENTOS

---

convirtió en una amiga, su carácter, su modo de ver la vida y vivir, su esencia, su color y su cariño extremo en todo lo que hace, la convirtió en otra de las personas especiales que este mundo laboral y de investigación me ha ofrecido, y a la cual también quiero agradecerle toda su ayuda y apoyo mostrado todos estos años.

También quería agradecer en concreto, aquellas personas especiales presentes en mi vida, y con las que he vivido momentos únicos. En esta ocasión quería darle las gracias de corazón a Rubén, mi primo, pero también ha sido el mejor amigo que siempre he tenido, fue mi compañero en clase, mi amigo, y sobre todo mi familia. Solo él sabe los muchos momentos buenos que hemos pasado juntos desde pequeños, y que a día de hoy sigue siendo una persona muy importante en mi vida; al igual que Marta, su mujer y amiga, y que la quiero mucho. A Rocío y Raquel, amigas desde hace más de 25 años. Son piezas que componen el puzle de mi vida, cuando estoy con ellas transforman todo, la magnifican y lo extrapolan a un mundo más feliz, por ello quería darles las gracias por ser mis confidentes pero también mi alegría. Continúo con Patricia, Fani y Laura, tres amigas que conocí en mi etapa universitaria y con las cuales he vivido grandes momentos, comparto profesión con Patricia y Fani, e incluso con Laura familia política. Las tres son diferentes pero únicas y especiales para mí. Pero sobre todo quiero agradecerles todos momentos buenos y malos que hemos vivido y que seguimos juntas. También agradecer a Judith y José María, por toda la ayuda que nos han prestado en todos los sentidos, y que son dos personas importantes y maravillosas en mi vida y que les tengo mucho cariño.

Y por último, no podía dejar mi agradecimiento, más puro, sincero y de corazón a mi familia. Esta parte la quiero comenzar agradeciendo a mis padres su dedicación, amor y esfuerzo, para facilitarme las cosas más importantes de la vida, por su ayuda, y porque siempre han estado a mi lado. A mi padre, darle las gracias porque solo su presencia es importante, aunque el no lo crea, y por su gran corazón. A mi madre, agradecerle su lucha, dedicación a mí y a mis hijos, su constancia, ayuda y apoyo diario para que consiguiera cada una de mis metas en mi vida y por abrirme camino en cada una de las decisiones tomadas. Gracias a ella, hoy he conseguido un objetivo del cual estará orgullosa, pero quiero que sepa que sin su presencia esto no hubiese sido posible. A mi hermana, la persona que llego para revolucionar mi confort, pero llego para complementar todo lo que me faltaba. Ella es un torbellino, inteligente, trabajadora, inquieta y como yo le digo, un poco "folclórica", pero sin ella mi vida no sería igual. Ella sabe lo mucho que me he esforzado y me ha costado llegar hasta aquí, los momentos difíciles apunto de tirar la toalla, pero que gracias a su apoyo y amor, estoy aquí. A Carmelo, el que aguanta, el mejor compañero de vida que puedo tener, el padre de mis hijos, mi amigo, mi confidente, el que ha

## AGRADECIMIENTOS

---

vivido y sufrido todo este proceso, y el que me ha ayudado por encima de todo. Agradecer toda su paciencia, pero sobre todo, por ser tan buen padre y por estar siempre a mi lado, por quererme y por intentar que todo sea más fácil todos los días. Y para finalizar, agradecer a las dos personitas más importantes de mi vida, los dos amores más verdaderos y más puros, pero a la vez mi preocupación y mi felicidad, ellos Álvaro y Claudia, han sido el motor que ha guiado este proceso, por los que no perdía las ganas día a día, trabajando y luchando por y para ellos. Llegaron para revolucionar mi vida, pero sobre todo para hacerla más intensa y más feliz.

# INDICE





**INDICE DE CONTENIDOS**

	<b>PÁG</b>
RESUMEN/ABSTRACT-----	1-2
INTRODUCCIÓN.....	3-106
<b><u>1. DIABETES MELLITUS</u></b>	
<b>1.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES MELLITUS .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. CLASIFICACIÓN Y TIPOS DE DIABETES MELLITUS .....</b>	<b>4-9</b>
1.2.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1: DM1A Y DM IDIOPÁTICA O DM1B .....	4
1.2.1.1. Diabetes Autoinmune o Diabetes Mellitus tipo 1A .....	4
1.2.1.2. Diabetes Idiopática o tipo 1B .....	5
1.2.2 PREDIABETES Y DM2 .....	5
1.2.3 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL .....	7
1.2.4. OTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DM POR OTRAS CAUSAS .....	8
<b>1.3. CRIBADO Y DIAGNÓSTICO DE PREDIABETES Y DIABETES MELLITUS .....</b>	<b>10-14</b>
1.3.1 CRIBADO DEL RIESGO DE LA DM2 .....	10
1.3.2 CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA DM2 .....	10
1.3.2.1. Pruebas diagnósticas para la DM .....	10
1.3.2.2. Diagnóstico de Prediabetes .....	14
<b>1.4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA DIABETES MELLITUS .....</b>	<b>15-20</b>
1.4.1. PREVALENCIA A NIVEL MUNDIAL DE LA DM .....	15
1.4.2. PREVALENCIA EN ESPAÑA DE DM .....	19
1.4.3. IMPACTO SOCIO-SANITARIO Y MORTALIDAD DE DM .....	19
<b><u>2. ETIOPATOGENIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2</u></b>	
<b>2.1.FISIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS B-PANCREÁTICAS, SECRECIÓN DE INSULINA Y METABOLISMO DE GLUCOSA</b>	<b>21-25</b>
2.1.1 SECRECIÓN DE INSULINA POR LA CÉLULA $\beta$ . .....	21
2.1.2. FISIOLOGÍA DE LA INSULINA .....	23
2.1.3. METABOLISMO DE LA GLUCOSA .....	25
<b>2.2.ETIOPATOGENIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 .....</b>	<b>26-40</b>
<b>2.2.1 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA DIABETES TIPO 2 .....</b>	<b>28</b>
2.2.1.1 GLUCOTOXICIDAD Y DISFUNCIÓN DE LAS CÉLULAS B PANCREÁTICAS .....	28
2.2.1.2 RESISTENCIA A LA INSULINA .....	30
2.2.1.2.1. Alteraciones en el músculo esquelético .....	33
2.2.1.2.2.Alteraciones en tejido adiposo .....	33
2.2.1.2.3. Alteraciones en el hígado .....	36
2.2.1.2.3.1.RI hepática y trastornos metabólico .....	36
2.2.1.2.3.2.Dislipemia: Alteración del metabolismo de las lipoproteínas en la RI .....	37

	<b>PAG</b>
2.2.1.3 INFLAMACIÓN SISTÉMICA ASOCIADA A LA OBESIDAD COMO CAUSA DE LA DM2 .....	37
2.2.1.4.DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL .....	40
<b>2.3.FACTORES DE RIESGO DE LA DM2 .....</b>	<b>41-47</b>
<b>2.3.1 FACTORES DE RIESGO NO MODIFICABLES .....</b>	<b>41</b>
2.3.1.1.PREDISPOSICIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA, ANTECEDENTES FAMILIARES Y ETNIA .....	41
2.3.1.2. SEXO .....	42
2.3.1.3. ENVEJECIMIENTO .....	43
<b>2.3.2 FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES .....</b>	<b>43</b>
2.3.2.1 OBESIDAD Y DEPÓSITO DE TEJIDO ADIPOSO .....	43
2.3.2.2 FACTORES NUTRICIONALES Y DIETA .....	44
2.3.2.3 SEDENTARISMO .....	45
2.3.2.4 OTROS FACTORES AMBIENTALES .....	46
2.3.2.5 MICROBIOTA INTESTINAL .....	47
<b>2.4.COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA DM2 .....</b>	<b>48-55</b>
2.4.1 ENFERMEDADES MICROVASCULARES .....	48
2.4.1.1 NEFROPATÍA DIABÉTICA .....	48
2.4.1.2 RETINOPATÍA DIABÉTICA .....	49
2.4.1.3 NEUROPATÍAS DIABÉTICAS .....	49
2.4.2 ENFERMEDADES MACROVASCULARES .....	51
2.4.2.1 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y DM .....	52
2.4.2.1.1 Aterosclerosis y su relación con la DM2 .....	52
2.4.2.1.2 Patogenia de la ECV en la DM2 .....	53
 <b>3. MANEJO TERAPÉUTICO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2</b>	
<b>3.1.TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO EN LA DM2 .....</b>	<b>57-60</b>
3.1.1.BIGUANIDAS: METFORMINA .....	57
3.1.2.OTROS ANTIDIABÉTICOS ORALES: SULFONILUREAS O TIAZALODONAS .....	57
3.1.3.AGONISTAS DEL RECEPTOR DE PÉPTIDO 1 (GLP-1) .....	58
3.1.4.INHIBIDORES DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA (SGLT-2) .....	58
3.1.5.INHIBIDORES DE LA DIPEPTIDIL PEPTIDASA-4 (DPP-4) .....	59
3.1.6.INSULINA .....	59
<b>3.2. INTERVENCIÓN SOBRE EL ESTILO DE VIDA .....</b>	<b>61-81</b>
<b>3.2.1 INFLUENCIA DE LA DIETA Y FACT.DIETÉTICOS SOBRE LA DM2 .....</b>	<b>61-70</b>
3.2.1.1. INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LA DM2 .....	61
3.2.1.2. RECOMENDACIONES DE MACRONUTRIENTES EN LA DM2 .....	63
3.2.1.2.1.Hidratos de Carbono (HC) .....	63
3.2.1.2.2.Proteínas .....	64
3.2.1.2.3.Grasas .....	64

	<u>PAG</u>
3.2.1.3. OTRAS RECOMENDACIONES DIETÉTICAS EN LA DM2 .....	64
3.2.1.3.1. El consumo de alcohol en la DM2	64
3.2.1.3.2. El consumo de socio en la DM2	66
3.2.1.4. PATRONES DIETÉTICOS .....	66
3.2.1.5. INFLUENCIA DE LA DIETA MEDITERRÁNEA SOBRE LA DM2 .....	67
<b>3.2.2. INFLUENCIA DE LOS CARBOHIDRATOS SOBRE EL METABOLISMO GLUCÍDICO Y SU ROL CON LAS ENFERMEDADES CARDIOMETABÓLICAS.....</b>	<b>71-79</b>
3.2.2.1. TIPOS DE CARBOHIDRATOS	73
3.2.2.2. OTROS CARBOHIDRATOS DE INTERÉS: ISOMALTULOSA Y MALTODEXTRINA RESISTENTE .....	76
3.2.2.3. EFECTO EFECTO DE LA FIBRA DIETÉTICA SOBRE LA RESPUESTA POSPRANDIAL .....	77
3.2.2.4. ÍNDICE GLUCÉMICO Y CARGA GLUCÉMICA .....	79
<b>3.3 INFLUENCIA DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE LA DM2 .....</b>	<b>82-85</b>
3.3.1. BENEFICIOS DE LA ACTIVIDAD FÍSICA EN LA SALUD DE LOS SUJETOS CON DM2	82
3.3.2. RECOMENDACIONES DEL TIPO DE ACTIVIDAD FÍSICA EN SUJETOS CON DM2....	83
3.3.2.1. Entrenamiento aeróbico	83
3.3.2.2. Entrenamiento de fuerza o resistencia	84
3.3.2.3. Entrenamiento combinado de ejercicios aeróbicos y de resistencia	84
3.3.2.4. Entrenamiento de flexibilidad y equilibrio	85

**4. REGULACION HORMONAL DE LA GLUCEMIA POSPRANDIAL Y DEL APETITO O SACIEDAD**

<b>4.1. REGULACION HORMONAL DE LA GLUCEMIA POSPRANDIAL Y DEL APETITO O SACIEDAD .....</b>	<b>86-89</b>
<b>4.2. HORMONAS INCRETINAS .....</b>	<b>90-96</b>
4.2.1. PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGÓN TIPO 1 (GLP-1) .....	86
4.2.1.1. Acciones extra pancreáticas de GLP-1	91
4.2.2. POLIPÉPTIDO INHIBIDOR GÁSTRICO (GIP) .....	92
4.2.3. RESPUESTA DE GIP Y GLP-1 EN LA INGESTA DE ALIMENTOS .....	94
4.2.4. EFECTO DE LA ISOMALTULOSA Y LA SECRECIÓN DE HORMONAS INCRETINAS	95
<b>4.3. OTRAS HORMONAS REGULADORAS DEL ESTADO POSPRANDIAL Y SACIEDAD</b>	<b>97-106</b>
4.3.1. INSULINA .....	97
4.3.2. GLUCAGÓN .....	98
4.3.3. GRELINA .....	99
4.3.4. LEPTINA .....	100
4.3.5. NEUROPÉPTIDO Y, PÉPTIDO Y Y POLIPÉPTIDO PANCREÁTICO .....	101
4.3.5.1 PÉPTIDO Y (PY) .....	102
4.3.5.2 POLIPÉPTIDO PANCREÁTICO (PP) .....	103
4.3.5.3 NEUROPÉPTIDO Y (NPY) .....	103
4.3.6. ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (AGNE) .....	104

	<b>PÁG.</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>107-108</b>
<b>HIPOTESIS</b> .....	<b>109</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>109-110</b>
1. Objetivo general	<b>109</b>
2. Objetivos específicos	<b>110</b>
 <b>MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	 <b>111-129</b>
1. SUJETOS A ESTUDIO .....	<b>111</b>
2. CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	<b>112</b>
3. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	<b>112</b>
3.1 visitas a estudio	<b>120</b>
4. VARIABLES DETERMINADAS A LO LARGO DEL ESTUDIO	<b>120</b>
4.1 variables clínicas	<b>120</b>
4.2 variables antropométricas	<b>121</b>
4.3 variables bioquímicas	<b>121</b>
4.4 valoración dietética y de ejercicio físico	<b>122</b>
4.5 análisis de la composición del pan blanco	<b>123</b>
4.6 valoración de efectos adversos	<b>123</b>
5. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS .....	<b>124</b>
5.1 determinación de variables bioquímicas	<b>124</b>
5.2 determinación de metabolitos: glucagón, GLP-1, GIP, PY, PP, grelina, leptina	<b>124</b>
5.3 determinación de ácidos grasos no esterificados (AGNE)	<b>126</b>
6. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL (ESTUDIO 1 Y ESTUDIO 2) .....	<b>127</b>
7. ANÁLISI ESTADISTICO .....	<b>128</b>
 <b>RESULTADOS</b> .....	 <b>130-166</b>
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOQUIMICAS BASALES DE TODOS LOS SUJETOS INCLUIDOS EN AMBOS ESTUDIOS (ESTUDIO 1 Y 2). .....	<b>130</b>
2. EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANTOPOMÉTRICAS Y DIETÉTICAS DE LOS SUJETOS A LO LARGO DE AMBOS ESTUDIOS (ESTUDIO 1 Y 2). .....	<b>133</b>
3. PARÁMETROS DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA .....	<b>139</b>
<u>3.1 ESTUDIO 1</u> .....	<b>139-147</b>
3.1.1. Variación e incremento de la glucosa	<b>139</b>
3.1.2. Variación e incremento de la insulina	<b>141</b>
3.1.3. Variación e incremento de GIP	<b>143</b>
3.1.4. Variación e incremento de GLP-1	<b>145</b>
<u>3.2 ESTUDIO 2</u> .....	<b>148-156</b>
3.2.1. Variación e incremento de la glucosa	<b>148</b>
3.2.2. Variación e incremento de la insulina	<b>150</b>
3.2.3. Variación e incremento de GIP	<b>152</b>
3.2.4. Variación e incremento de GLP-1	<b>154</b>

	<b>PAG</b>
<b>4. VARIACIÓN DE LAS HORMONAS SACIEDAD.....</b>	<b>157-162</b>
4.1 Variación de los niveles de grelina, glucagón, leptina, PP y PY	<b>157</b>
<b>5. PARÁMETROS DEL PERFIL LIPÍDICO.....</b>	<b>162-166</b>
<b><u>5.1 ESTUDIO 1</u> .....</b>	<b>162-163</b>
5.1.1 variación de los niveles de TG y AGNE	<b>162</b>
<b><u>5.2 ESTUDIO 2</u> .....</b>	<b>163-166</b>
5.2.1. Variación de los niveles de CT, c-HDL, c- LDL, TG y AGNE	<b>163-166</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>167-171</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>172-173</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>174-189</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>190-192</b>
PUBLICACIONES PRINCIPALES DE DATOS EXTRAIDOS DE LA TESIS .....	<b>190</b>
PUBLICACIONES COMPLEMENTARIAS DURANTE EL PERIODO DE TESIS.....	<b>191-192</b>

**INDICE DE FIGURAS**

	<b><u>PÁG.</u></b>
1. Criterios diagnósticos de Diabetes Mellitus	<b>13</b>
2. Prevalencia mundial de Diabetes Mellitus por grupos de edad en 2019, 2030, 2045.	<b>15</b>
3. Prevalencia de Diabetes Mellitus en adultos de 20-19 años que viven en zonas urbanas y rurales en 2019, 2030, y 2045.	<b>17</b>
4. Prevalencia de Diabetes Mellitus en diferentes países a nivel mundial en 2019.	<b>18</b>
5. Mecanismo fisiológico de secreción de insulina en la célula $\beta$ pancreática.	<b>23</b>
6. Estadios de la fisiopatología de la Diabetes Mellitus tipo 2.	<b>27</b>
7. Estructura y composición de las células endocrinas de un islote de Langerhans normal y los potenciales cambios de las células $\beta$ que conducen a la diabetes mellitus tipo 2.	<b>29</b>
8. Perspectiva fisiológica integrada sobre la resistencia a la insulina tisular.	<b>32</b>
9. Alteraciones estructural de los adipocitos como causa de un estado crónico de sobrenutrición y las alteraciones metabólicas que genera.	<b>35</b>
10. Interacción de los macrófagos en los islotes de Langerhans y las células $\beta$ en la inflamación en la obesidad.	<b>39</b>
11. Efecto fisiopatológico de la distribución del tejido adiposo según sexo.	<b>42</b>
12. Factores involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis en la Diabetes Mellitus tipo 2.	<b>54</b>
13. Componentes de la calidad de los carbohidratos en la dieta, especialmente como fibra dietética	<b>72</b>
14. Características definitorias de la calidad de los carbohidratos independientemente a los efectos cardiometabólicos sobre la salud.	<b>81</b>
15. Regulación del apetito por hormonas gastrointestinales	<b>87</b>
16. Relación entre el vaciado gástrico y la homeostasis de la glucosa	<b>89</b>
17. Acciones de GLP-1 en tejidos periféricos	<b>92</b>
18. Acciones de GIP en tejidos periféricos	<b>93</b>
19. Diagrama de diseño de estudio 1	<b>115</b>
20. Diagrama de diseño de estudio 2.	<b>118</b>
21. Protocolo de preparación de la curva de calibrado	<b>125</b>
22. Diagrama del desarrollo para ambos estudios.	<b>131</b>

---

	<u>PÁG</u>
23. Variación (A) e incremento máximo de glucosa en sangre (B) producidos tras el consumo de cada tipo de bebida en el estudio 1.	<b>140</b>
24. Variación (A) e incremento máximo de insulina en sangre (B) producidos tras el consumo de cada tipo de bebida en el estudio 1.	<b>142</b>
25. Variación (A) e incremento máximo de GIP en sangre (B) producidos tras el consumo de cada tipo de bebida en el estudio 1.	<b>144</b>
26. Variación (A) e incremento máximo de GLP-1 en sangre (B) producidos tras el consumo de cada tipo de bebida en el estudio 1.	<b>146</b>
27. Variación (A) e incremento máximo de glucosa en sangre (B) producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2	<b>149</b>
28. Variación (A) e incremento máximo de insulina en sangre (B) producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.	<b>151</b>
29. Variación (A) e incremento máximo de GIP en sangre (B) producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.	<b>153</b>
30. . Variación (A) e incremento máximo de GLP-1 en sangre (B) producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.	<b>155</b>
31. Variación de grelina A) y de glucagón B) producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2	<b>158</b>
32. Variación de PY A) y de PP B) producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2	<b>160</b>
33. Variación de leptina tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.	<b>161</b>
34. Variación de los niveles de TG (A) y AGNE (B) producidos tras el consumo de cada tipo de bebida en el estudio 1.	<b>162-163</b>
35. Variación de las concentraciones de TG (A), AGNE (B), colesterol total (C), colesterol LDL (D) y colesterol HDL (E) tras el consumo de pan blanco combinado con las diferentes bebidas fermentadas en el estudio 2.	<b>164-166</b>

**INDICE DE TABLAS**

	<b>PAG.</b>
<b>Tabla 1.</b> Análisis de la composición de las tres cervezas sin alcohol utilizadas en las diferentes intervenciones del estudio 1 y 2.	<b>119</b>
<b>Tabla 2.:</b> Preparación curva estándar ácidos grasos no esterificados (AGNE).	<b>127</b>
<b>Tabla 3.</b> Características clínicas y bioquímicas basales de todos sujetos incluidos en estudio 1 y 2.	<b>132</b>
<b>Tabla 4.</b> Evolución de las características clínicas y antropométricas de los sujetos durante el estudio 1.	<b>134</b>
<b>Tabla 5.</b> Evolución de las características dietéticas de los sujetos durante el estudio 1.	<b>135</b>
<b>Tabla 6.</b> Evolución de las características clínicas y antropométricas de los sujetos durante el estudio 2.	<b>137</b>
<b>Tabla 7.</b> Evolución de las características dietéticas de los sujetos durante el estudio 2.	<b>138</b>
<b>Tabla 8.</b> AUC de glucosa en sangre después de la ingesta de las bebidas correspondientes al estudio 1.	<b>139</b>
<b>Tabla 9.</b> AUC de insulina en sangre después de la ingesta de las bebidas correspondientes al estudio 1.	<b>141</b>
<b>Tabla 10.</b> AUC de GIP en sangre después de la ingesta de las bebidas correspondientes al estudio 1.	<b>143</b>
<b>Tabla 11.</b> AUC de GLP-1 en sangre después de la ingesta de las bebidas correspondientes al estudio 1.	<b>145</b>
<b>Tabla 12.</b> Incremento máximo de glucosa, insulina, GIP y GLP-1 en sangre producidos tras el consumo de cada una de las bebidas en el estudio 1.	<b>147</b>
<b>Tabla 13.</b> AUC de glucosa producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2.	<b>148</b>
<b>Tabla 14.</b> AUC de insulina producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2.	<b>150</b>
<b>Tabla 15.</b> AUC de GIP producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2.	<b>152</b>
<b>Tabla 16.</b> AUC de GLP-1 producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2.	<b>154</b>



---

	<b>PAG.</b>
<b>Tabla 17.</b> Incremento máximo de glucosa, insulina, GIP y GLP-1 producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.	<b>156</b>
<b>Tabla 18.</b> AUC de las concentración de grelina, glucagón producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.	<b>157</b>
<b>Tabla 19.</b> AUC de las concentración de PP y PY producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.	<b>159</b>
<b>Tabla 20.</b> AUC de las concentración de leptina tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.	<b>161</b>

# ABREVIATURAS



## ABREVIATURAS

ADA	American Diabetes Association
AG	Aparato de Golgi
ATP	Adenosín trifosfato
ADP	Adenosín difosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGL	Ácidos grasos libres
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
ACV	Accidente cerebro vascular
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AgRP	Proteína relacionada con Agouti
AUC	Área bajo la curva
Cols. células $\beta$	Colaboradores Célula beta-pancreática
CICR	Liberación insulina inducida por $Ca^{2+}$
c-LDL	colesterol LDL
c-HDL	colesterol HDL
CT	Colesterol total
CI	Cardiopatía isquémica
CV	Cardiovascular
CG	Carga glucémica
CCK	Colecistoquinina
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidasa 4
DASH	Dietary Approaches to Stop Hypertension
DMed	Dieta Mediterránea
ECV	Enfermedad cardiovascular
EHGNA	Enfermedad de hígado graso no alcohólica
EEUU	Estados Unidos
ERO <sub>2</sub>	Especies reactivas de oxígeno
EC	Enfermedad coronaria
EAP	Enfermedad arterial periférica
FRCV	Factores de riesgo cardiovascular
FID	Federación internacional de Diabetes
FR	Factor (es) de riesgo (s)
GWAS	Estudio completo del genoma humano
GPA	Glucosa plasmática en ayunas
GBA	Glucosa basal alterada en ayunas
GGT	Gamma Glutamil transpeptidasa
GLP-1	Péptido similar al glucagón 1
GLUT(1-5)	Transportador de glucosa

GIP	Polipéptido insulíntrópico dependiente de glucosa
GOT	Transaminasa glutámico-oxalacética
GPT	Transaminasa glutámico pirúvico
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HTG	Hipertrigliceridemia
HC	Carbohidratos
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HIIT	Ejercicios de intervalos de alta intensidad
IMC	Índice de masa corporal
INRS	Receptor de insulina en las células
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IM	Infarto de miocardio
IG	Índice glucémico
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
LNH	Lipogénesis <i>de novo</i> hepática
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MODY	Diabetes monogénica ( <i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i> )
NHANES	National Health and Nutrition Examination survey
NArq	Núcleo Arcuato
OMS	Organización Mundial de la Salud ( <i>World Health Organization</i> )
PCR	Proteína C reactiva
POMC	Molécula de pro-opiomelanocortina
PY	Péptido Y
PP	Polipéptido pancreático
RE	Retículo Endoplasmático
RI	Resistencia a la insulina
RCV	Riesgo cardiovascular
SNC	Sistema nervioso central
SOG	Sobrecarga oral de glucosa
SGLT-2	Co-transportador de sodio-glucosa tipo2
SREBP	Proteína de unión al elemento regulador de esteroides
TAG	Tolerancia alterada a la glucosa
TG	Triglicéridos
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VO <sub>2</sub>	Volumen de oxígeno

# RESUMEN



## **Antecedentes y objetivo**

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), y otras enfermedades cardiometabólicas como obesidad, enfermedades cardiovasculares (ECV) o las dislipemias, entre otras, son la principal causa de morbi-mortalidad en todo el mundo. En la etiología de estas enfermedades intervienen múltiples factores y aunque los mecanismos fisiopatológicos de la DM2 no se conocen completamente, se sabe que las personas con sobrepeso u obesidad y exceso de grasa corporal, sedentarias, y con hábitos dietéticos poco saludables, como consumo elevado de contenido calórico, carbohidratos (HC) refinados y bebidas azucaradas, entre otros, presentan una alta probabilidad de desarrollar DM2 y otras enfermedades cardiometabólicas. Además, las bebidas azucaradas, que incluyen refrescos carbonatados y no carbonatados, bebidas a base de frutas y bebidas deportivas, son la mayor fuente de azúcar agregada a la dieta y proporcionan un exceso de calorías con baja calidad nutricional.

Debido al aumento exponencial de la incidencia de estas patologías crónicas en los últimos años, y el impacto de la dieta sobre su desarrollo, los nuevos enfoques terapéuticos se dirigen a la modificación de estos factores dietéticos poco saludables, incidiendo en la calidad de los HC e índice glucémico (IG) o consumo de fibra dietética, y la promoción de mejores patrones dietéticos. Los cambios en la calidad de los HC y una adherencia adecuada a estos patrones saludables, ha demostrado la reducción de la incidencia de la DM2.

El consumo elevado y constante de alcohol resulta perjudicial el manejo terapéutico de la DM2. Sin embargo, diferentes estudios epidemiológicos relacionan la ingesta moderada de alcohol con efectos beneficiosos a nivel cardiovascular e incluso un menor riesgo de padecer DM2. Este hecho únicamente ha sido atribuido al consumo de bebidas fermentadas, como vino o cerveza. La cerveza sin alcohol aporta componentes bioactivos beneficiosos, pero elimina el contenido de alcohol, aunque su IG continúa siendo relativamente alto, por lo que su consumo está restringido en personas con DM2.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo es explorar el efecto posprandial de una cerveza sin alcohol con composición modificada en los HC, que incluye la fermentación casi completa de los mismos y la adición de isomaltulosa y una maltodextrina resistente (CIM), y que previamente, en un estudio desarrollado por nuestro equipo, demostró beneficios en la homeostasis de la glucemia en personas con prediabetes o diabetes y sobrepeso u obesidad, tras su consumo durante 10 semanas. Este trabajo pretende dilucidar los posibles mecanismos responsables del mencionado beneficio, con la hipótesis de que la cerveza con composición modificada en HC inducirá un menor IG que una cerveza sin alcohol con composición estándar (CE). Además, el consumo combinado de esta cerveza modificada, CIM, junto con 50 gramos de HC procedentes de pan blanco, generará una mejor



respuesta metabólica posprandial, incluyendo una mayor síntesis de incretinas y una mayor inhibición de la saciedad, en comparación con la ingesta de una CE o agua.

### **Métodos**

Para la consecución del objetivo general del estudio, se realizaron dos estudios controlados, con un diseño doble ciego, aleatorios y cruzados. Un primer estudio, de 4 semanas de duración, se incluyeron 10 voluntarios sanos, que recibieron en ayunas 25 g de HC provenientes de: a) cerveza sin alcohol con composición estándar (CE), b) cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de los HC y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/ 100 mL) (CIM), c) cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de los HC y enriquecida con maltodextrina resistente (2,0 g/100 mL) (CM), y d) bebida a base de glucosa (25 g de glucosa). En el segundo estudio, de 5 semanas de duración, se incluyeron 20 voluntarios sanos, que recibieron en ayunas: a) 50 g de HC de pan blanco más agua; b) 50 g de HC de pan blanco pan junto con 14,3 g de HC provenientes de una CIM; c) 50 g de HC de pan blanco pan junto con 14,3 g de HC provenientes de una CM; c) 50 g de HC de pan blanco pan combinados con 14,3 g de HC provenientes de una CE; e) 50 g de HC de pan blanco mas 14,3 g de pan blanco. Se obtuvieron muestras de sangre previas a cada ingestión y cada 15 min durante 2 h. En estas muestras se determinaron las concentraciones de glucosa, insulina, hormonas incretinas, triglicéridos y ácidos grasos no esterificados (AGNE). Los valores de colesterol total, HDL y LDL, así como las concentraciones de grelina, leptina, glucagón, polipéptido pancreático y polipéptido Y se determinaron en las muestras basales, a los 60 y a los 120 minutos en el estudio 2.

### **Resultados**

Las características clínicas, antropométricas, así como la evolución dietética, se mantuvieron constantes en todos los sujetos a lo largo de los dos estudios. El aumento de glucosa, insulina y GIP generado tras el consumo de CIM y CM fue significativamente menor que tras el consumo de la CE. El consumo de pan blanco en combinación con la CIM y la CM indujo un menor aumento en los niveles de glucosa que el consumo de pan blanco en combinación con agua y pan blanco con CE ( $p=0,006$  y  $p<0,001$ , respectivamente). Ninguna de las intervenciones evaluadas alteró las concentraciones séricas de las hormonas relacionadas con saciedad o los valores lipídicos posprandiales.

### **Conclusiones**

El consumo de una cerveza sin alcohol con una fermentación casi completa de los HC y enriquecida en maltodextrina e isomaltulosa es capaz de atenuar y mejorar la respuesta posprandial a la ingesta de HC en la comida. Estos hallazgos avalarían la hipótesis de que esta mejora en la respuesta posprandial constituiría uno de los mecanismos responsables de que el consumo de este tipo de cerveza sin alcohol en las comidas, durante 10 semanas, contribuyó a la mejora de la resistencia periférica a la insulina en personas con prediabetes o DM2 y sobrepeso u obesidad.

# INTRODUCCIÓN



## 1.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de trastornos metabólicos heterogéneos caracterizados por hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos (HC), grasas y proteínas debido a defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambas (1). A largo plazo, la hiperglucemia crónica esta asociada a un mayor riesgo de desarrollar complicaciones graves por el daño y disfunción que ocasiona en los diferentes órganos como son la retinopatía y nefropatía, entre otras, además de acelerar el proceso aterosclerótico y aumentar el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares (2).

La Asociación Americana de Diabetes, *American Diabetes Association* (ADA), ha determinado que la DM es una enfermedad que implica un altísimo riesgo cardiovascular (RCV). Independientemente del tipo de DM, aunque la etiología sea diferente, el rasgo común y principal es la hiperglucemia a través de la cual se diagnostica la enfermedad y es la causa de gran parte de las complicaciones que afectarán a la calidad de vida y morbimortalidad a largo plazo. La aparición de las manifestaciones clínicas, la gravedad y rapidez de instauración de las complicaciones, así como la necesidad de tratamiento farmacológico y/o insulina, dependerá de cada individuo y de las causas subyacentes (1, 3). Los procesos fisiopatológicos que están involucrados en el desarrollo y aparición de la DM son varios: destrucción autoinmune o afectación de la integridad de las células beta-pancreáticas (células  $\beta$ ) por diferentes mecanismos involucrados y defecto en la secreción de insulina o resistencia a la acción de la insulina. La base de las alteraciones que provoca la DM es la disfunción que se produce sobre el metabolismo de los HC y las grasas principalmente, y en menor medida sobre las proteínas, como resultado de la disfunción de la acción de la insulina sobre los tejidos diana, bien por la secreción inadecuada por parte del páncreas y/o respuestas tisulares disminuidas en uno o más puntos en las vías moleculares y hormonales donde actúa la insulina. El deterioro de la secreción de insulina y los defectos en la acción suelen presentarse con frecuencia en el mismo paciente, y a menudo no hay causa clara que lo explique, pero se sabe que la hiperglucemia es la única causa presente en todos ellos.

## 1.2. CLASIFICACIÓN Y TIPOS DE DIABETES

La ADA en 2021, clasifican la DM en 4 categorías generales con la siguiente clasificación: 1) Diabetes Mellitus tipo 1: causada por la destrucción autoinmune de la células  $\beta$ , y que conduce a la deficiencia absoluta de insulina; 2) Diabetes Mellitus tipo 2: debido a una pérdida progresiva de la secreción adecuada de insulina por las células  $\beta$ , frecuentemente en un contexto de resistencia a la insulina; 3) Diabetes gestacional, y 4) Otros tipos específicos de diabetes por otras causas: diabetes monogénica (MODY) o diabetes neonatal, por defectos genéticos en la acción de la insulina, por enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, por fármacos o agentes químicos, infección, etc. La diabetes tipo 1 (DM1) y la diabetes tipo 2 (DM2) son los tipos de DM con mayor incidencia respecto al resto de causas de DM, tanto en la presentación clínica como en la progresión de la enfermedad (1). La aparición de ambas enfermedades puede darse en cualquier momento de la vida, descartando la idea clásicamente aceptada de que DM1, debuta solo en niños y adolescentes, mientras que la DM2 es diagnosticada siempre en adultos (4).

### 1.2.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1

La diabetes mellitus tipo 1 engloba dos subtipos:

#### 1.2.1.1. Diabetes autoinmune o tipo A.

La DM1, denominada clásicamente “diabetes insulino dependiente” o “diabetes de inicio juvenil”, representa el 5-10 % de los casos de DM y se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ . Esta destrucción celular, hace necesario la incorporación de insulina exógena para evitar complicaciones e incluso la muerte en estos individuos. La DM1 es una enfermedad autoinmunitaria protagonizada por la presencia de anticuerpos propios que producen la destrucción de los islotes de Langerhans. Dentro de estos anticuerpos se incluyen el ácido glutámico descarboxilasa (GAD65), anti-islote pancreático, anti-insulina, anti-tirosinas fosfatasa (IA-2 e IA-2b), por lo que su presencia permite obtener diagnóstico antes de que haya una manifestación clínica de la enfermedad. De este modo, la presencia de estos elementos inmunológicos pone en marcha el proceso de autoinmunidad en el que se sintetizan elementos implicados en la señalización celular, dando lugar a otro proceso inmunitario citotóxico que culmina con la destrucción de las células  $\beta$ . La predisposición a este tipo de DM puede venir determinada por causas genéticas, como mutaciones en el gen del complejo de histocompatibilidad humano o los genes *DQA*, *DQB* y *DRB*, además de la existencia de causas

ambientales que pueden ayudar a desencadenar la enfermedad (5, 6). Con frecuencia estos pacientes debutan de forma aguda con cetoacidosis, aunque la manifestación clínica dependerá de la velocidad de destrucción de las células  $\beta$  y la influencia de factores ambientales como la dieta, un estilo de vida no saludable, infecciones o tóxicos, entre otros. La mayor incidencia de la DM1 se produce en la infancia y adolescencia, siendo este momento del ciclo vital la etapa más frecuente, aunque el debut de esta enfermedad puede darse a cualquier edad (4).

### **1.2.1.2. Diabetes idiopática o tipo 1B**

Los pacientes con DM1B o idiopática presentan una insulinopenia endógena crónica y son individuos propensos a sufrir cetoacidosis. Sin embargo, a día de hoy no se conoce con exactitud cuales son los mecanismos de autoinmunidad de células  $\beta$  que provocan una cetoacidosis. Este tipo DM1B es más frecuente en pacientes de origen africano y asiático con elevada penetrancia, sin asociación causal del gen del complejo de histocompatibilidad humano, pero es necesaria más investigación para determinar la causa de la destrucción de las células  $\beta$  (1).

## **1.2.2. PREDIABETES Y DIABETES MELLITUS TIPO 2**

### **1.2.2.1. Prediabetes**

El término clínico prediabetes es utilizado el diagnóstico de aquellas personas cuyos niveles de glucosa no cumplen los criterios diagnósticos de DM, pero son demasiado elevados para ser considerados normales. En la actualidad, se considera prediabético aquel individuo con valores de glucosa en ayunas superiores a 100 e inferiores a 125 mg/dL y/o hemoglobina glicosilada (HbA1c) superior a 5,6 e inferior a 6,5% (1). Desde el 2002 el término prediabetes volvió a ser utilizado por la ADA para englobar las categorías de tolerancia alterada de glucosa (TAG) y glucosa basal alterada en ayunas (GBA), incluyendo el antecedente de haber sido diagnosticado de diabetes mellitus gestacional. La TAG y GBA son afecciones donde los niveles altos de glucosa en sangre exceden los límites normales, pero se encuentran por debajo del umbral de diagnóstico de DM. La TAG y GBA son importantes por tres motivos: en primer lugar, implican un riesgo para el desarrollo en el futuro de la DM2 (7); en segundo lugar, parecen tener un alto riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (ECV); y por último, si se detecta a tiempo permite que se adopten intervenciones para prevenir la aparición definitiva de DM2. La prediabetes no debe verse como una entidad clínica en sí misma, sino más bien como un estado de mayor riesgo de aparición DM2 y ECV (1).

### 1.2.2.2. Diabetes Mellitus tipo 2

La DM2, denominada clásicamente como diabetes no insulino dependiente, representa el 90-95% de todas las DM. El riesgo de desarrollo de DM2 aumenta conforme aumenta la edad, y el pico de incidencia ocurre a partir de los 35-40 años, en individuos sedentarios, con obesidad o mujeres con diabetes gestacional, siendo incluso la incidencia mayor en ciertos grupos étnicos como son los amerindios, afrocaribeños y sudasiáticos. Es importante remarcar que la DM2 tiene una fuerte predisposición genética, incluso mayor que en la DM1, cuyo componente poligénico no es completamente conocido (8).

Existen diferentes causas que ocasionan DM2. En primer lugar es importante destacar que en la DM2 no se produce la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ , como si sucede en la DM1, aunque sí que existe afectación de la integridad de las células  $\beta$  y posible muerte celular. Esta afectación de la integridad de las células que conforman los islotes pancreáticos provoca que disfunción en los mecanismos de las células  $\beta$ , provocando una deficiencia de secreción de insulina relativa. Esta deficiencia en la secreción de la insulina suele combinarse con una resistencia periférica a la insulina (RI), debido principalmente a la obesidad y sobrepeso, condiciones muy frecuentes en estos pacientes. La obesidad, y muy especialmente la grasa depositada a nivel visceral, es uno de los factores causales de un estado de disfunción metabólica generando glucolipototoxicidad, inflamación crónica y RI sobre los tejidos (9). En consecuencia, las células  $\beta$  se ven sometidas a una toxicidad que altera la homeostasis del metabolismo glucídico y lipídico, como causa de la excesiva ingesta de nutrientes y depósito de grasa ectópica que producen unos hábitos dietéticos no saludables. Este estrés metabólico e inflamación crónica tiene como resultado final la pérdida de la masa de los islotes pancreáticos y, por lo tanto, pérdida de células  $\beta$  (10). La RI mejora con la reducción de peso y/o el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia, pero rara vez se restablece a la normalidad (1).

La DM2 se acompaña de otros factores de riesgo cardiovascular (FRCV), siendo el sobrepeso y la obesidad los principales. Además, esta obesidad presenta un patrón de depósito de grasa abdominal, con mayor porcentaje de grasa visceral, junto con hipertensión y dislipidemia. La aparición sinérgica de estas condiciones de todas se conoce como síndrome metabólico. En estos individuos, además, pueden confluir con otros FRCV clásicos junto a ese estado inflamatorio y metabólico donde se produce neoglucogénesis hepática y producción endógena de mediadores bioquímicos proinflamatorios que provocan una importante resistencia a la acción de la insulina (8).

La forma de presentación de la DM2 suele ser mucho más disfrazada que la DM1, donde muchas

ocasiones se realiza el diagnóstico tras observar hiperglucemia en analíticas de rutina durante varios años de seguimiento, sin que el individuo manifieste una clínica patognómica. En ocasiones, el individuo puede tener clínica aguda, caracterizada por polidipsia, polifagia, poliuria y pérdida de peso, pero raramente se presentará como hiperosmolar. El coma hiperosmolar principalmente se presentará en sujetos de edad avanzada o con limitación a una correcta hidratación, lo que provoca una deshidratación secundaria. La evolución de la enfermedad previa a un diagnóstico, se asocia a una mayor incidencia de complicaciones macro y microvasculares, en estos individuos, por lo que un diagnóstico precoz contribuirá al mejor pronóstico de la enfermedad. La necesidad de insulina no es vital como sucede en la DM1, sobretodo en los estadios iniciales, pero si será necesaria en muchas ocasiones para el control de la enfermedad (8).

### **1.2.3. DIABETES MELLITUS GESTACIONAL**

Desde hace años, la diabetes mellitus gestacional fue definida como cualquier grado de intolerancia a la glucosa reconocida durante el embarazo, independiente del grado existente de hiperglucemia. Esta definición facilitó una estrategia uniforme para la detección y clasificación, aunque muestra importantes limitaciones. La importancia clínica de esta condición se debe a las graves consecuencias que tiene la hiperglucemia a corto y a largo plazo sobre la gestante y el desarrollo fetal, ya que se sabe que existen mayor riesgo de malformaciones congénitas en el feto en situaciones de hiperglucemia (11).

El aumento de las cifras de obesidad ha ocasionado mayor incidencia de DM2 en mujeres en edad fértil no diagnosticada, y, por tanto, aumento en la incidencia de diabetes mellitus gestacional (12). Se ha observado que la mayor parte de estas mujeres con diabetes mellitus gestacional, son diagnosticadas de DM2, y una minoría de DM1 o diabetes monogénica. A causa de la mayor incidencia, es necesario evaluar los factores de riesgo del desarrollo de DM2 en una visita prenatal inicial. La diabetes mellitus gestacional suele indicar que existe una disfunción de las células  $\beta$ , existiendo mayor riesgo de desarrollo de DM2 en el futuro (13). Para evitar en mayor medida el desarrollo de DM2 en el futuro, es necesario e importante disponer de intervenciones de prevención efectivas (1, 14), como la realización de cribados de por vida de prediabetes para reducir el riesgo y permitir el tratamiento lo antes posible (13), sobre todo a través fomento de un estilo de vida saludable en el manejo de la diabetes mellitus gestacional, junto con el control del peso y la actividad física (15).



#### 1.2.4. OTROS TIPOS ESPECIFICOS DE DIABETES POR OTRAS CAUSAS

La DM también puede surgir como consecuencia de otros factores. Según la última clasificación de DM realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y ADA, tenemos diferentes tipos de DM como la diabetes monogénica, que se origina por mutaciones funcionales en un solo gen causando la disfunción de las células  $\beta$ , lo que la diferencia de las DM1 y DM2 donde existen defectos múltiples genes combinados con factores ambientales. Este tipo de DM es menos común, ya que se estima que representa entre el 1,5% y el 2% de los casos de DM en todo el mundo. Estos tipos monogénicos se presentan en un amplio espectro, que van desde DM neonatal, o monogénica infantil, DM tipo MODY o juvenil de inicio en la madurez y la DM asociada con enfermedades sindrómicas poco frecuente. La DM neonatal aparece antes de los 6 meses de edad, puede encontrarse entre el 80-85% de los casos de causa monogénica, siendo transitoria o permanente y se debe a la sobreexpresión de genes del cromosoma 6 o mutaciones en los genes *KNCJ11*, *ABCC8* y *KATP*. La DM tipo MODY, denominada así por el término "*Maturity Onset Diabetes of the Young*", engloba a un heterogéneo de DM no insulino dependiente producidas por alteraciones genéticas de las células  $\beta$ . MODY se caracteriza por la aparición de hiperglucemia en edades inferiores a los 25 años, aunque también puede ocurrir a edades más avanzadas y presenta un patrón autosómico dominante con anomalías en al menos 14 genes (16). Sin embargo, en los últimos años, gracias al aumento y acumulación de evidencia de estudios genéticos de genoma completo (GWAS), se han descubierto una cantidad importante de tipos monogénicos de DM (17), por lo que se piensa que la verdadera prevalencia de estos tipos puede estar siendo subestimada.

Además de estas DM monogénicas, existen una serie de enfermedades con baja prevalencia que pueden generar una DM, como los síndromes de Leprechaunismo o el de Rabson-Mendenhall que cursan con defectos genéticos en la acción de la insulina. Así como cualquier lesión sobre el tejido pancreático puede ocasionar una DM tanto estructural como funcional, donde esa hiperglucemia debida a la disfunción pancreática se ha denominado "diabetes tipo 3c" (1). Además, diferentes patologías pueden provocar alteraciones hormonales que actúan produciendo descompensaciones sobre el metabolismo hidrocarbonado, como la enfermedad de Cushing, la acromegalia, el glucagonoma y el feocromocitoma. La hiperglucemia asociada a endocrinopatías suele resolverse con la curación de la mismas (18).

Finalmente, comentar que existen una serie de tratamientos farmacológicos que pueden favorecer la aparición de hiperglucemias, favoreciendo la RI (1, 14), como la Pentamicina y el Vacor

intravenosos, que producen una destrucción directa de las células  $\beta$ , o los glucocorticoides que disminuyen la acción de la insulina favoreciendo la gluconeogénesis y la glucogenólisis. Destacar también el efecto de las estatinas, que son fármacos muy utilizados en pacientes con DM, debido al elevado riesgo cardiovascular (RCV) que tienen. Diferentes estudios, entre ellos, el estudio JUPITER han asociado el consumo de estatinas de alta dosis (rosuvastatina, atorvastatina y simvastatina) con elevaciones de la glucemia y la HbA1c, y por tanto un aumento de las tasas de incidencia de DM. En contraste, estudios donde se analizaba el efecto de estatinas de baja potencia, como el WOSCOPS (realizado en sujetos en prevención primaria) o el estudio LIPID (desarrollado en pacientes en prevención secundaria), se observó una reducción en el riesgo de DM. Por tanto, parece que el efecto diabético que producen las estatinas, puede ser debido al tipo de estatina, pero también a la dosis empleada (19, 20).

### 1.3. CRIBADO Y DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES Y PREDIABETES

#### 1.3.1 CRIBADO DEL RIESGO DE DIABETES MELLITUS

La aparición de la DM se puede predecir por la presencia de manifestaciones clínicas agudas y la gravedad de las mismas, pero también por el momento de aparición como sucede a edades tempranas en la DM1, DM neonatal o monogénicas. Además, el desarrollo recientemente de test genéticos, metabólicos e inmunológicos permiten obtener diagnóstico concreto y específico del tipo de DM en concreto, y en muchos de los casos obtener la causa subyacente que la provoca (1).

La realización del cribado de sujetos con DM2, con el objetivo de obtener un diagnóstico preventivo, se ha visto que resulta beneficioso tanto individualmente como para el sistema. Esto se debe a que es una patología con alta prevalencia e incidencia y que además suele ser diagnosticada en la mayor parte de los casos una vez que aparecen las complicaciones irreversibles. Sí el cribado de DM2 se lleva a cabo sobre los sujetos con alto riesgo, es posible retrasar o impedir la progresión de la misma, a través de intervenciones sobre el estilo de vida, especialmente dieta y actividad física, y/o fármacos, manejo precoz de la hiperglucemia y los FRCV existentes. Sin embargo, es importante tener en cuenta que sería poco práctico pretender un cribado de toda la población, por lo que lo adecuado sería un cribado sistemático de los sujetos de alto riesgo, tales como sujetos con sobrepeso u obesidad (definido por  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ), mujeres diagnosticadas de diabetes mellitus gestacional previamente en los últimos 3 años, pacientes diagnosticados de prediabetes según los criterios ADA (1). En los sujetos sin factores de riesgo se recomienda el cribado cada 3 años a partir de los 45 años de edad. La prueba más adecuada para realizar el cribado a la población es la determinación de la glucemia plasmática en ayunas, aunque la prueba de sobrecarga oral de la glucosa (SOG) sería el método “*Gold estándar*”. Debido a la complejidad de la prueba y la relación coste-efectividad, esta prueba diagnóstica se reserva para la realización de la confirmación definitiva del diagnóstico de DM. Hoy en día, también se admite la determinación de HbA1c para el cribado con cifras de  $HbA1c \geq 5,7 \%$  (39 mmol/L).

#### 1.3.2. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE DIABETES MELLITUS y PREDIABETES

##### 1.3.2.1 Pruebas diagnósticas para la diabetes.

La DM se puede diagnosticar a través de tres determinaciones bioquímicas: determinación de valores de glucosa plasmática, ya sea el valor en ayunas (GPA) o el valor de glucosa plasmática a las 2 horas de duración mediante la prueba de SOG de 75 g o la determinación de HbA1c (21) (**Figura 1**).

Para el diagnóstico definitivo de DM se requiere que al menos dos determinaciones de glucemia plasmática o HbA1c, independientemente del método utilizado, que estén alteradas con valores por encima del umbral diagnóstico. Únicamente se realiza el diagnóstico con una sola muestra cuando esta coexisten con síntomas clásicos de DM, tales como poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida injustificada de peso y visión borrosa, o en situaciones más graves, como la cetoacidosis diabética o coma hiperosmolar, que se sospecha pudieran estar ocasionadas por la hiperglucemia (8).

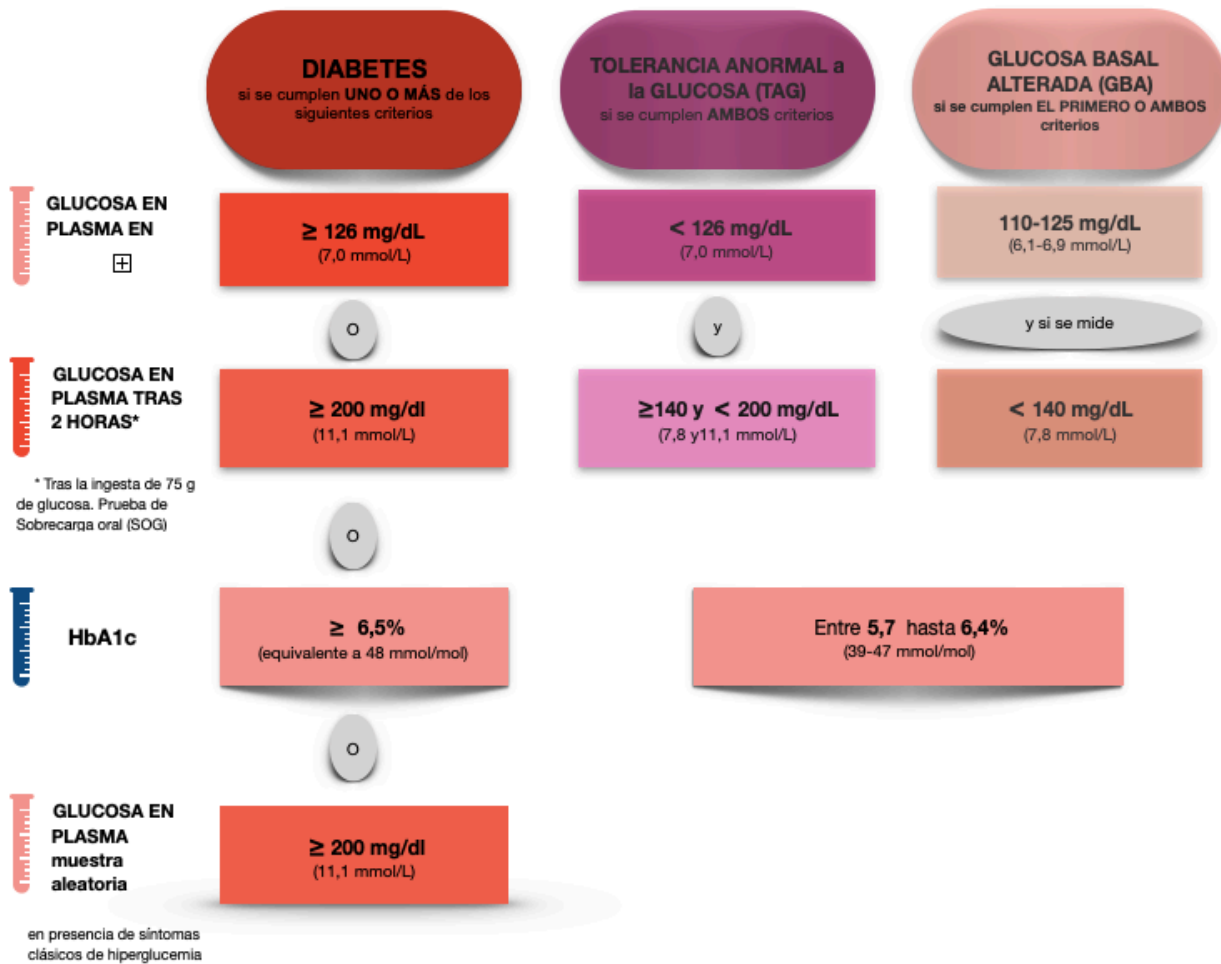
En 1997 el primer comité de la ADA propuso la reducción del umbral diagnóstico de DM en ayunas de 140 mg/dL (7,8 mmol/L) a 126 mg/dL (7,0 mmol/L), evitando así la prueba de SOG de 75 g, y estimaron que este valor de 126 mg/dL corresponde con la aparición de complicaciones específicas, principalmente retinopatía diabética. Para llegar a ello, el comité de la ADA examinó datos de estudios epidemiológicos trasversales en diferentes poblaciones. Evaluaron la retinopatía mediante pruebas de imagen oftalmológicas y midieron la glucemia como GPA, glucosa plasmática a las 2 h y/o HbA1c. A través de estos estudios pudieron demostrar que en aquellas personas con niveles de glucosa por debajo de 126 mg/dL, existía una baja prevalencia de retinopatía, mientras que para valores superiores aumentaba la prevalencia de forma lineal al valor de glucosa, siendo los valores consistentes para las distintas poblaciones estudiadas (23). Estos estudios de intervención, permitieron la confirmación del punto de corte diagnóstico de glucosa plasmática a las 2 horas tras SOG de 75 g en 200 mg/dL (11,1 mmol/L) y GPA a valores menores a 126 mg/dL (7,0 mmol/L) (1). En relación a la realización de la prueba de GPA, es necesario un ayuno previo a la extracción de la muestra de sangre venosa entre 8-12 horas. La prueba SOG, fue estandarizada en 1954 por Fajans y Conn con determinación de la glucemia plasmática a las 2 horas tras la ingesta de 75 g de glucosa (en solución acuosa) tras el previo ayuno nocturno (24).

La HbA1c es un biomarcador refleja los niveles medios de glucosa plasmática durante un periodo de 2 a 3 meses. Hace más de 20 años la determinación de HbA1c fue establecida y reconocida como posible método diagnóstico de la DM, gracias a la correlación con las complicaciones asociadas, pero no existía estandarización de método de determinación. No es hasta el 2009 cuando el *International Expert Committee* recomendó su uso como método diagnóstico, siempre y cuando la estandarización del método fuese la adecuada. La ADA decidió incluir su uso en 2010 estableciendo el umbral diagnóstico para la DM en 6,5 %. Según la ADA el requisito para el uso de HbA1c como método diagnóstico, es que se debía determinar mediante el método certificado por el *National Glycohemoglobin Standardization Program* y estandarizado según el ensayo *Diabetes Control and Complications Trial*. En la actualidad, esta recomendación de la ADA se utiliza a nivel global (1, 21).

La determinación de la HbA1c como diagnóstico de DM tiene una serie de ventajas sobre GPA y glucosa plasmática a las 2 h (prueba de SOG de 75 g de glucosa), entre las que se incluye mayor comodidad, ya que no es necesario que el individuo este en ayunas, mayor estabilidad preanalítica y menor perturbación diaria relacionada con el estrés, enfermedad o dieta. Además, la HbA1c desempeña un papel muy importante en el tratamiento de los individuos con diabetes, permitiendo una evaluación y adecuado manejo glucémico en la clínica gracias a una buena correlación con las complicaciones microvasculares y macrovasculares (1). Sin embargo, todas estas ventajas se ven contrarrestadas por el mayor coste y la menor disponibilidad en ciertas partes del mundo en desarrollo, y la baja sensibilidad entre los valores de HbA1c y glucosa en ciertos individuos. Además, hay que tener en cuenta cuando se utiliza la determinación de HbA1c para el diagnóstico de DM, es una medida indirecta de los valores medios de glucosa plasmática, y que ciertas formas de anemia, hemoglobinopatías, VIH, el embarazo, tratamientos como la hemodiálisis, edad o la raza afectan a la glicación de la hemoglobina independientemente de la glucemia, por lo que su interpretación pudiera estar sesgada en estas condiciones. En estas situaciones, se utilizarán los criterios de glucosa, ya sea por la determinación de GPA o glucosa plasmática a las 2 horas por SOG de 75g (1).

Si no existe una clínica evidente con signos clásicos de hiperglucemia, el diagnóstico definitivo requiere, como se ha comentado anteriormente, dos valores anormales en una o ambas pruebas diagnósticas de GPA y/o glucosa plasmática a las 2 h por SOG de 75 g y/o HbA1c (25). Sin embargo, en el caso de la presencia de síntomas clínicos significativos el diagnóstico se realiza a través de dicha clínica y única muestra aleatoria de glucosa plasmática  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L), como sucede en pacientes con hiperglucemia graves o aquellos que presentan síntomas hiperglucémicos clásicos graves o crisis hiperglucémicas. Si se utilizan dos pruebas diagnósticas diferentes, como pueden ser la determinación de HbA1c y GPA, y ambas resultan valores por encima del umbral establecido, se confirma el diagnóstico de diabetes. Sin embargo, cuando se utiliza una misma prueba para realizar el diagnóstico (dos pruebas de HbA1c), es necesario que las dos determinaciones no se retrasen en el tiempo para establecer el diagnóstico definitivo y confirmatorio. Por otro lado, si un individuo obtiene resultados discordantes de dos pruebas diferentes, por ejemplo, HbA1c y GPA, se deberá repetir la prueba diagnóstica cuyo resultado este por encima del umbral de diagnóstico (**Figura 1**). Además, si en un individuo los resultados de las pruebas diagnósticas se encuentra próximos a los valores de normalidad, será el profesional sanitario quien junto con la sintomatología clínica del paciente deberá de repetir la prueba en 3 a 6 meses para confirmar el diagnóstico (1).

Figura 1. Criterios diagnósticos de diabetes mellitus.



SOG: Prueba sobrecarga oral de glucosa; GBA: Glucosa basal alterada; TAG: Tolerancia anormal de la glucosa. La prueba de sobrecarga de glucosa postprandial de dos horas se debe realizar tras la ingesta con una solución glucosada que contenga el equivalente a 75g de glucosa anhidra disuelta en agua; La determinación de HbA1c necesaria la realización en un laboratorio con método certificado por el National Glycohemoglobin Standardization Program y estandarizado para el ensayo sobre el control. Adaptación de los criterios diagnósticos de diabetes según Federación Internacional de diabetes (22) y criterios diagnósticos de diabetes de la ADA 2020 (1).

### 1.3.2.2. Diagnóstico de prediabetes

El término prediabetes se utiliza para aquellos individuos cuyos niveles de glucosa no cumplen los criterios de DM establecidos (**Figura 1**), pero son demasiado elevados para ser considerados normales (26, 27). La ADA engloba las categorías de diagnóstico de prediabetes en: aquellos sujetos que presentan TAG y GBA, incluyendo a las mujeres con antecedente de diagnóstico de diabetes mellitus gestacional. Tras un diagnóstico de prediabetes, el riesgo de desarrollar DM en un futuro es importante. Entre el 5-10 % personas-año evolucionaran a DM, y la misma proporción volverán a normogluemia (28). Los criterios de diagnóstico de prediabetes establecidos para las categorías englobadas se muestran en la (**Figura 1**) (1). Otros aspecto importante para del diagnóstico de prediabetes, es que se asocia con RI y disfunción de las células  $\beta$  cuyas alteraciones están presentes mucho antes de detectarse los variaciones en los niveles de glucosa. Además la prediabetes se asocia con aparición de comorbilidades microvasculares tempranas de nefropatía, enfermedad renal crónica, neuropatía de fibras pequeñas, retinopatía diabética y mayor riesgo de enfermedad macrovascular. Por todo ello, la modificación del estilo de vida es la piedra angular de la prevención de prediabetes y por tanto del desarrollo de DM, con evidencia de una reducción del riesgo relativo del 40-70% (28).

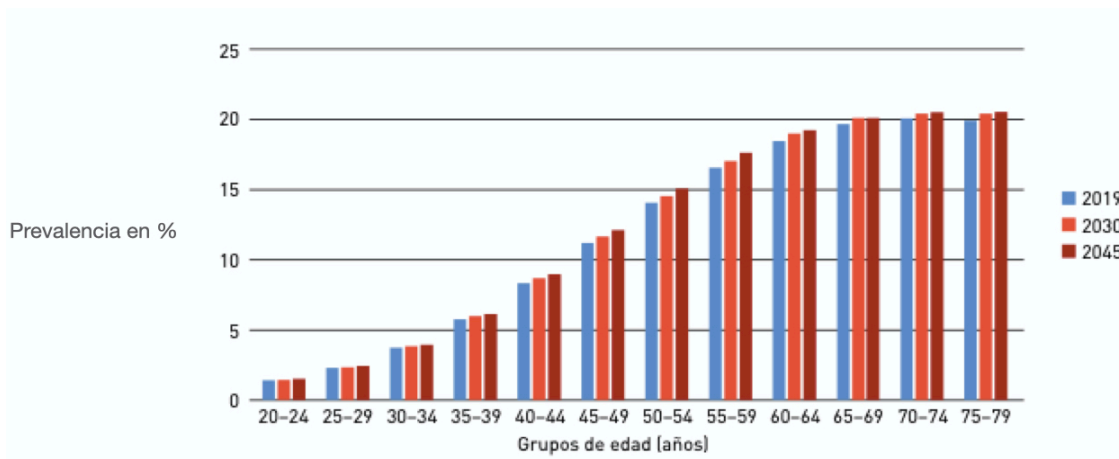
## 1.4.EPIDEMIOLOGÍA DE LA DIABETES MELLITUS

La DM es una de las enfermedades crónicas más prevalentes en la mayoría de países, con importantes implicaciones sociales, financieras y sanitarias, pero además con una importante influencia sobre el desarrollo en los países con ingresos medios y bajos. Los datos actuales de DM a nivel global, reafirman que estamos ante una epidemia mundial. Los factores de este progresivo aumento son múltiples, siendo la obesidad el más relevante, pero también influyen de modo muy importante el envejecimiento de la población, dietas poco saludables y con elevada ingesta de calorías, el sedentarismo e incluso la rápida urbanización, se posicionan como principales causantes de este problema de salud pandémico al que nos enfrentamos a día de hoy y para las próximas décadas (29, 30). Además otros factores como los determinantes socioeconómicos especialmente un nivel socioeconómico bajo se asocio con aumento entre 40-60 % del riesgo relativo que aquellos con un nivel socioeconómico elevado, donde los principales factores que contribuyen es un estilo de vida inadecuado (31).

### 1.4.1 PREVALENCIA A NIVEL MUNDIAL DE DIABETES MELLITUS

En 2019 la prevalencia total de DM a nivel mundial fue de 9,3% (IC 95%: 7,4-12,2%) entre los 20-79 años, (Figura 2).

**Figura 2.** Prevalencia mundial de diabetes por grupos de edad en 2019, 2030 y 2045



\*Adaptada de la 9ª Edición del Atlas de Diabetes de la FID (32).



Traducido a número de personas, supone unos 463 millones de adultos a nivel mundial tienen DM según datos de la Federación Internacional de Diabetes (FID) (22). Entre los 20-64 años, esta cifra se sitúa en 351,7 millones de personas, estando una buena proporción de ellos sin diagnosticar, por lo que la ADA hace especial hincapié en el cribado en aquellos grupos de mayor riesgo donde un diagnóstico precoz y un manejo terapéutico temprano y efectivo se asocia con una menor morbimortalidad (32). El pronóstico de una tendencia al alza para la próxima década en adultos entre 20-79 años es que aumente hasta 578 millones para 2030 e incluso a 700 millones para 2045, lo que supone un 10,2 % y un 10,9 %, respectivamente del total de la población mundial, (**Figura 2**) (32).

Un aspecto importante es que conforme aumenta la edad, la prevalencia de DM es incluso mayor, especialmente en sujetos con edades superiores a los 65 años (22). En 2019, había 135,6 millones de personas entre 65-99 años con DM, pero lo peor está por llegar pues, según las estimación de la FID, esta cifra será de 195,2 millones y 276,2 millones de personas entre 65-99 años con DM en el mundo, en 2030 y 2045, respectivamente (33).

Estos datos indican y confirman el crecimiento significativo, rápido y continuo de la DM, y especialmente en aquellas sociedades envejecidas, lo que va generar un gran impacto social con importantes desafíos de salud pública y económicos, además de un aumento de la carga asistencial (34, 35). También es relevante el número de personas que se ha estimado presentan TAG, llegando a 374 millones de personas, lo que equivale a 7,7 % población mundial entre 18 y 99 años en 2017, con una previsión de nuevo al alza hasta 454 millones para 2030 y 548 millones en 2045, siendo un 8,0% y un 8,6 %, respectivamente. Casi un 50 %, es decir 180 millones de los adultos entre 20-79 años con TAG no superan los 50 años de edad, y casi un tercio (28,3%) entre los 20 y 39 años tienen TAG. Estos datos son preocupantes, ya que sino se toman medidas al respecto, el riesgo de desarrollo de DM2 en todos estos individuos y complicaciones es muy elevado (22, 34).

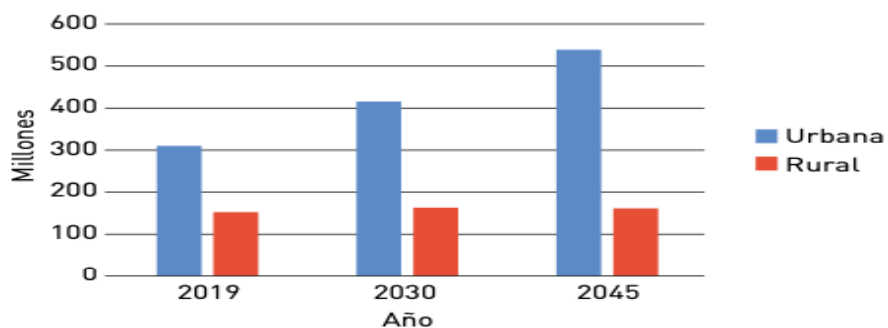
Anteriormente, estas estimaciones de la tendencia al alza en el número de casos de DM en el mundo ya se hacia previsible. Si miramos al pasado, el estudio Framingham, un estudio a gran escala principalmente realizado con población blanca no hispánica, estimó que las tasas de incidencia de DM2 en 1990 se habían duplicado, respecto a 1970. Otros estudios, como el NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) o estudios realizados por la OMS, también mostraron estimaciones del aumento de la prevalencia de DM. En 1980 la OMS estimó que había 108 millones de personas que vivían con diabetes en el mundo, multiplicándose por cuatro las estimaciones realizadas en el año 2014 (36). Desde el año 2000, la FID mide la prevalencia de DM nacional, regional y globalmente. Sus estimaciones confirman los pronósticos al alza y la tendencia que mostraban los estudios Framingham,

NHANES y OMS. Según los datos publicados por la FID, la prevalencia mundial en personas de edades comprendidas entre 20-79 años fue de 151 millones en el año 2000, 194 millones en 2003, 246 millones en 2006, 285 millones en 2009, 366 millones en 2011, 382 millones en 2013, 415 millones en 2015 y el año 2017 cerca de unos 425 millones de adultos entre los 20-79 años o 451 millones entre 18-99 años fueron diagnosticadas a nivel mundial de DM (22).

Este crecimiento continuo de la prevalencia de DM a nivel mundial depende en gran medida del aumento de la edad, donde las personas entre 20-24 años muestran un aumento menor y no es superior al 2%, mientras que las personas en el grupo de edad entre 75-79 años aumenta hasta el 19,9% en el 2019 (32). Según los datos publicados, la prevalencia de diabetes aumenta conforme aumenta edad, es por ello que los grupos de edad avanzada, son los que soportan y soportarán la mayor prevalencia de DM, (**Figura 2**).

Existen diferencias entre hombres y mujeres, donde la prevalencia calculada en mujeres entre 20-79 años, en 2019 es un poco inferior que en varones con 9,0% frente a un 9,6 %, respectivamente tienen DM en el mundo. La previsión es que la incidencia aumente en las próximas década tanto en varones como en mujeres en los próximos años, aunque la prevalencia de DM en hombres seguirá siendo superior que en mujeres (32). Además, del total de personas que viven con DM, el 67 % viven en zonas urbanas. La prevalencia de DM en las zonas urbanas duplican a la prevalencia de las zonas rurales, lo que supone un porcentaje del 10,8 % frente al 7,2%, respectivamente. La previsión es que aumente en la próxima década, posiblemente consecuencia de los cambios socioeconómicos, que conducen a cambios en el estilo de vida donde predomine el sedentarismo y el estilo de vida no saludable, así como la rápida urbanización y occidentalización global (22, 32), (**Figura 3**).

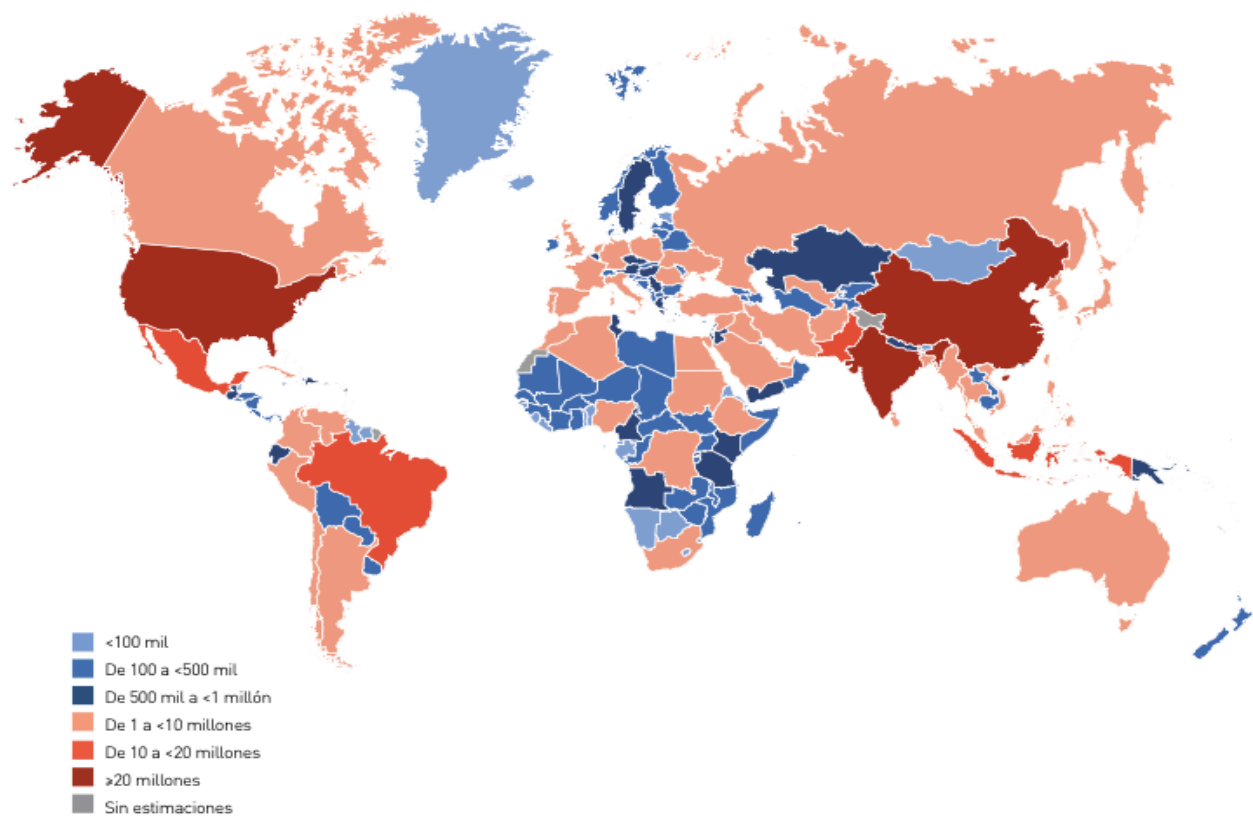
**Figura 3.** Prevalencia de diabetes en adultos de 20-79 años que viven en zonas urbanas y rurales en 2019, 2030 y 2045.



\*Adaptada de la 9ª Edición del Atlas de Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes (32).

Por otro lado, uno de los mayores problemas relacionados con la DM, es que uno de cada dos personas adultas con DM no sabe que la sufren, sobre todo entre aquellos que tienen DM2. Se estima que 231,9 millones, de los 463 millones de personas entre 20 y 79 años que presentan DM, no son conscientes de que sufren esta patología, siendo en África o zonas donde existen limitaciones socioeconómicas donde se observan los mayores datos de personas con DM sin diagnosticar. Las regiones de Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental tenían más del 50% de los casos sin diagnosticar. La proporción más baja de DM no diagnosticada se estimó en la región de América del Norte y Europa, presentando aún así porcentajes superiores al 35%, (**Figura 4**) (22). En la Unión Europea, la prevalencia DM de los 27 países que la forman, se encuentra entre 6-12 %, situándose España con una prevalencia entre el 8-9%, al igual que los países próximos geográficamente, como Portugal, Francia e Italia, entre otros (37).

**Figura 4.** Prevalencia de la diabetes en los diferentes países del mundo en 2019.



*Adaptada de la 9ª Edición del Atlas de Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes (32).*

### 1.4.2. PREVALENCIA DE DIABETES EN ESPAÑA

La prevalencia de DM en España ronda el 13,8% en adultos, siendo esta patología más común en hombres (38). Al igual que está sucediendo a nivel mundial, la prevalencia de DM en España muestra un importante incremento en las dos últimas décadas, principalmente en las cifras DM2. En el año 2017, la prevalencia de DM en España entre los 20-79 años fue del 10,4 % y 3,5 millones de personas fueron diagnosticadas de DM durante ese mismo año. De estos, un 62,8 % (2,2 millones de personas) tenían más de 65 años. Además, un agravante de las ya preocupantes cifras conocidas, y en concordancia con los datos a nivel mundial, es el número de personas que sufren DM pero no han sido diagnosticadas, donde se estima que 1 millón de personas aproximadamente están en esa situación (8). Ya en el año 2012, Soriguer y cols. publicaron un gran estudio transversal de base poblacional, estudio Di@bet.es, que incluía una cohorte representativa de la población general de todo el territorio nacional, cuyo objetivo fue determinar la prevalencia global (conocida e ignorada) de DM2 en España. Los resultados publicados mostraron una prevalencia total de DM2, ajustada por edad y sexo de 13,8% (IC 95%: 12,8-14,7), siendo este dato algo superior al descrito anteriormente. El estudio Di@bet.es también mostró que un 7,8% de la muestra poblacional tenían DM conocida, pero un 6% no conocían que la padecían. Además, un 9,2 % tenían TAG, y un 3,4% presentaban GBA (39).

### 1.4.3 IMPACTO SOCIO SANITARIO Y MORTALIDAD DE LA DIABETES MELLITUS

Según los datos y estimaciones publicados, la DM ha adquirido unas dimensiones epidémicas donde la prevención y el tratamiento son en la actualidad uno de los principales objetivos de las políticas públicas de salud. Por lo tanto, existe la necesidad de implantar actividades preventivas para reducir el progreso continuo de esta enfermedad y sus complicaciones de morbimortalidad asociadas. La esperanza de vida de aquellas personas que padecen esta patología se acorta en aproximadamente seis años, en parte debido al hecho de que la diabetes duplica el riesgo de ECV y aumenta el riesgo de otras enfermedades como el cáncer. La DM no solo reduce la calidad de vida y la esperanza de vida, sino que también es una causa importante de una serie de complicaciones microvasculares y macrovasculares que conducen a ceguera, insuficiencia renal, infarto miocárdico (IM) y accidente cerebrovascular (ACV). Por lo tanto, la carga de las complicaciones asociadas a la DM en todo el mundo es un importante problema sanitario al que debemos encontrar soluciones urgentemente (40).

Otro aspecto relevante es como la DM supone un gran impacto económico a nivel mundial sobre los sistemas de salud y la atención sanitaria, además del costo individual y colectivo que deben asumir los individuos y familiares afectados de DM (41). Los costes directos de la DM se atribuyen al gasto

en salud, tanto público como privado. Este aumento de los costes ha aumentado considerablemente de los 232 mil millones gastados en todo el mundo en 2007 hasta los 727 mil millones en 2017 para adultos de 20-79 años. El FID calcula que el gasto total en salud relacionado con la DM alcanzará los 760 millones de dólares, lo que representa un aumento del 4,5 % del cálculo realizado en 2017. Tal y como pronostica el aumento de casos para 2030 y 2045, esto asociaría un gasto que podría alcanzar los 825 mil y 845 mil millones de dólares, representando un aumento del 8,6% y 11,2 %, respectivamente. En cuanto a los costes indirectos, se calcula que suponen el 34,7 % del total de los costes de DM (41).

Referente a la mortalidad, en 2019 se calculó que hubo 4,2 millones de muertes de adultos de entre 20 y 79 años, a causa de la DM y sus complicaciones, lo que equivale a una muerte cada ocho segundos. Se calcula que la DM se asocia con el 11,3% de los fallecimientos a nivel mundial, destacando que el 46,2% de las muertes en personas menores de 60 años están asociadas con esta patología (32).

## **2.1. FISIOLÓGÍA DE LAS CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS, SECRECCIÓN DE LA INSULINA Y METABOLISMO DE LA GLUCOSA**

El páncreas es una glándula exocrina y endocrina. Las células endocrinas del páncreas se localizan en los islotes de Langerhans. Estas células se encuentran repartidas por todo el páncreas, pero con una mayor densidad en la zona de la cola del páncreas. Cada islote contiene miles de células endocrinas que liberan diferentes hormonas específicas tras la respuesta a la señalización celular. Dentro de los islotes existen diferentes tipos de células. Entre ellas, las células mayoritarias y principales son las células  $\beta$ , encargadas de la producción de insulina. Las células  $\beta$  suponen el 60% de la masa total del páncreas, seguidas en número por las células  $\alpha$  que suponen hasta el 20 % y se encargan de la producción de glucagón. Además, existen otras células en menor proporción como células delta que constituyen alrededor del 5 % y producen somatostatina, hormona que regula la producción y liberación de insulina por células  $\beta$  y glucagón por las células  $\alpha$ . Las células épsilon hacen que el estómago produzca y libere grelina, hormona que induce la sensación de hambre, y células PP producen y secretan polipéptido pancreático (PP) que regulan la secreción exocrina del páncreas y estas se encuentran en cantidades mínimas (42, 43).

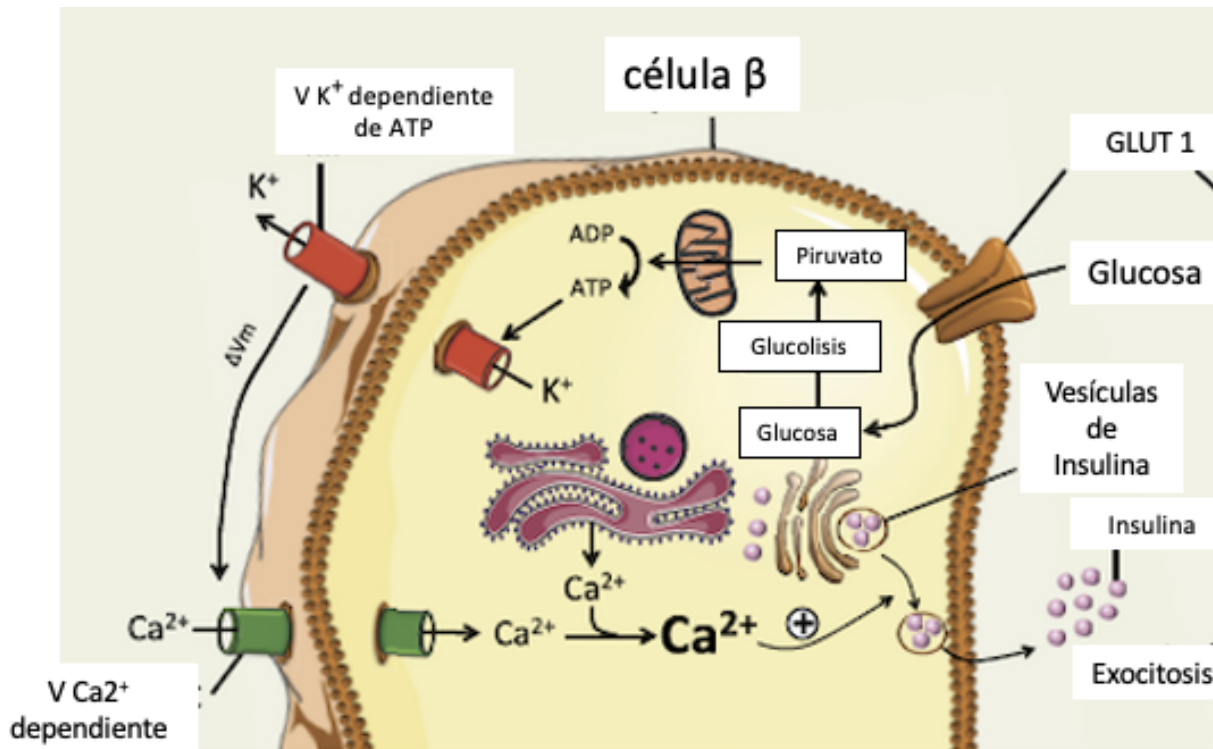
### **2.1.1 SECRECIÓN DE INSULINA POR LAS CÉLULAS $\beta$**

La función principal de las células  $\beta$  es la producción y liberación de insulina del organismo, para regular la homeostasis de la glucosa. La insulina es una hormona peptídica anabólica, que ejerce multitud de efectos en diferentes tejidos diana, de ahí la complejidad del conjunto de mecanismos fisiológicos en los que actúa (42). La insulina inicialmente se sintetiza como pre-proinsulina, que madura al modificar su conformación en el retículo endoplásmico (RE), con la ayuda de otras proteínas y, posteriormente, se convierte en proinsulina. Esta molécula se trasloca desde el RE hacia el aparato de Golgi (AG) y entra en forma de vesículas inmaduras, convirtiéndose en péptido C e insulina (10, 44). La insulina madura, se almacena en forma de gránulos hasta que se activa para ser liberada. La liberación de la insulina, se va a producir cuando existan altas concentraciones de glucosa en sangre, aunque también hay que tener en cuenta que otras moléculas como aminoácidos, ácidos grasos y otras hormonas inducen la liberación de insulina. El mecanismo principal en la célula  $\beta$ , se produce cuando aumenta la concentración de glucosa circulante en sangre. Las células  $\beta$  captan al interior la glucosa circulante a través del transportador de glucosa (GLUT). El transportador GLUT es una proteína transportadora de solutos, pero también como actúa sensor de glucosa para células  $\beta$ .

Cuando la glucosa entra en el interior de la célula, se activa el catabolismo de la glucosa, aumentando la relación ATP/ADP intracelular, lo que provoca activación del cierre de canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP localizados en la membrana plasmática y la despolarización de la membrana. La señal que provoca la despolarización de la membrana celular genera la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes del voltaje, y permite que el Ca<sup>2+</sup> entre en la célula. El aumento en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> desencadena la liberación de la insulina almacenada en los gránulos localizados en la membrana plasmática (44, 45), (**Figura 5**).

También conviene destacar que existen otras señales y rutas metabólicas mucho más complejas, mediadas por diferentes señales y receptores, por ejemplo el receptor de la liberación de insulina inducida por calcio (CICR), cuya señalización amplifica la señal de Ca<sup>2+</sup> y favorece la liberación de insulina; o mensajeros como el c-AMP que actúa sobre la liberación de la insulina induciendo la activación de proteína Kinasa A (10), pero no se describen en profundidad porque en este trabajo no se contempla su análisis. Sin embargo, la secreción de insulina también está regulada a través de señales hormonales que reflejan la ingestión de alimentos y el estado energético. En este sentido, un ejemplo importante de esta señalización hormonal, es el conocido “efecto incretina” definido como el aumento de la respuesta de la insulina después de la ingestión oral de glucosa, en comparación con la misma carga de glucosa por vía parenteral. Las dos principales incretinas, péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). Entre sus muchos efectos, es su función glucoreguladora y estimula la secreción de insulina de una manera dependiente de glucosa, denominado efecto incretina pero también suprime el apetito y aumenta la masa de células β reduciendo la apoptosis (46).

**Figura 5.** Mecanismo fisiológico de secreción de insulina en la célula  $\beta$  pancreática.



Adaptada de Müller TD (262). Abreviaturas anteriormente no descritas:  $V_{Ca^{2+}}$  dependiente: Voltaje dependiente de  $Ca^{2+}$ ;  $V_{K^+}$  dependiente de ATP: Canal  $K^+$  Voltaje dependiente de ATP.

### 2.1.2 FISIOLÓGÍA DE LA INSULINA

En condiciones fisiológicas, la insulina se libera tras la ingesta de alimentos, pero solo unos pocos nutrientes provocan la secreción por sí mismos de insulina, y son los denominados iniciadores. Estos iniciadores son la glucosa y leucina, o fármacos como las sulfonilureas. Además, existen otros nutrientes denominados potenciadores o amplificadores, como son la mayoría de aminoácidos, o ácidos grasos, hormonas y neurotransmisores, que requieren de un iniciador para producir la secreción de insulina (47).

La insulina para poder ejercer su acción, debe unirse a los receptores localizados en la membrana plasmática de las células diana provocando una respuesta anabólica integrada según la



disponibilidad de nutrientes (42). Las principales acciones metabólicas de las diferentes vías en las que actúa la insulina, son estimular la captación de glucosa en el músculo esquelético y en tejido adiposo, inducir la síntesis de glucógeno en el músculo esquelético, suprimir la producción de glucosa por parte del hígado, e inhibir la lipólisis en los adipocitos (48). Por lo tanto, la insulina tiene un papel relevante en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Esta regulación se lleva a cabo a través de efectos directos e indirectos que ejerce la insulina sobre los tejidos diana (42).

Los efectos directos de la insulina se producen a través de señales bioquímicas que activan las vías metabólicas mediante la transducción de señales específicas de cada una de las células en los diferentes órganos diana. Los tejidos diana con efecto directo de la insulina son: el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo, específicamente el tejido adiposo blanco. En el músculo esquelético, la insulina favorece tanto la captación como la utilización y el almacenamiento de glucosa, para ello induce el aumento del transporte de glucosa y la síntesis neta de glucógeno. En el hígado, la insulina promueve la gluconeogénesis, induce la expresión de genes lipogénicos y disminuye la expresión de genes gluconeogénicos (47). En el tejido adiposo, en concreto en el tejido adiposo blanco, la insulina inhibe la lipólisis y aumenta el transporte de glucosa y la lipogénesis. Además de los efectos directos, la insulina tiene importantes efectos indirectos sobre los tejidos diana, como es la supresión de la lipólisis del tejido adiposo blanco y la gluconeogénesis hepática, o el control metabólico periférico a través de su acción sobre el sistema nervioso central. Este control metabólico periférico se produce por el paso de la insulina sobre la barrera hematoencefálica y los receptores de insulina (INRS) localizados en las membranas de las neuronas como las células gliales, ejerce la función en el mecanismo de la supresión del apetito (47).

Desde el punto de vista metabólico, ante una situación de hiperglucemia, se producirá un aumento de los niveles de insulina. Si esta hiperinsulinemia permanece elevada de manera constante, indica que existe sensibilidad disminuida de los tejidos diana a la insulina, lo que se denomina RI. Esta situación clínica suele presentar en estadios patológicos como la prediabetes y en la DM2, el síndrome de ovario poliquístico o enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). Esto hace aumentar los requerimientos de insulina, por lo que el páncreas está sometido a un estrés por mayor carga de producción de insulina, provocando descompensación celular del mismo. Esta descompensación provocada por la RI, es uno de los mecanismos relevantes del desarrollo de DM2. Además, la RI se considera el mejor predictor a largo plazo del desarrollo de complicaciones en pacientes diabéticos (42).

### **2.1.3 METABOLISMO DE LA GLUCOSA**

La señal para producir la secreción de insulina no suele ser inicialmente la glucosa, sino que a través de los neurotransmisores que se liberan a través de los sentidos vista y olfato o por medio de las hormonas incretinas o péptidos liberados en el intestino por presencia de la comida, se provoca la señal inicial para la secreción y liberación de insulina. A nivel celular, una de las funciones esenciales del metabolismo glucídico es ajustar la secreción de insulina proporcionalmente al nivel de glucosa en plasma. Cuando aumentan los niveles extracelulares de glucosa, el metabolismo glucídico permite la entrada de glucosa mediante difusión facilitada en las células  $\beta$  a través de transportadores de glucosa GLUT. Posteriormente, la glucosa en el espacio intracelular sufrirá el proceso de glucólisis, donde el piruvato obtenido entrará a formar parte del ciclo de Krebs, lo que permitirá la generación de moléculas transceptoras de electrones (NADH y FAD) que se metabolizarán en la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial generando grandes cantidades de moléculas energéticas de ATP. El aumento de ATP citoplasmático provoca el cierre de los canales  $K^+$  dependientes de ATP, lo que conduce a la despolarización de la membrana, la entrada de  $Ca^{2+}$  y la secreción de insulina por parte de la células  $\beta$  (42).

## 2.2. ETIOPATOGENIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

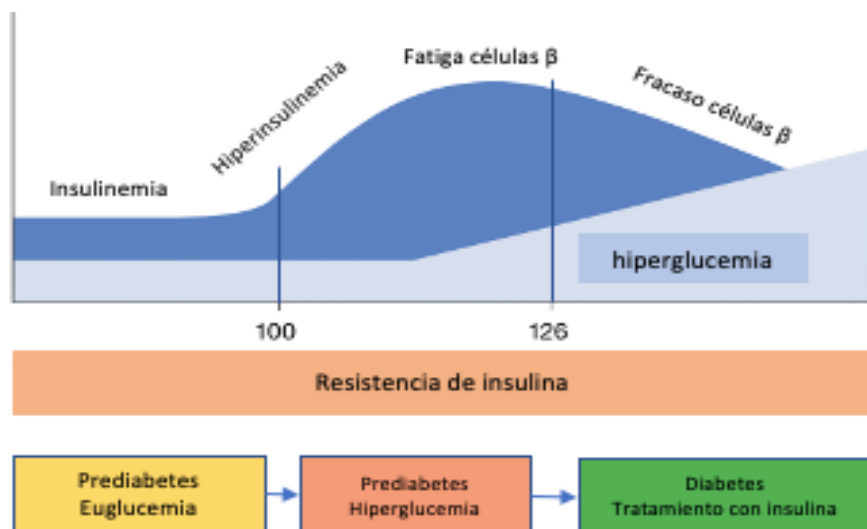
La DM2 es uno de los trastornos metabólicos crónicos con mayor prevalencia en todo el mundo, sobre todo en países desarrollados, llegando a representar el 90-95% de todos los casos de DM. Independientemente de los factores causales individuales, la característica común, es la hiperglucemia crónica ocasionada por la combinación de dos mecanismos fisiopatológicos: una secreción defectuosa o deficiente de insulina por las células  $\beta$  y/o una RI en los tejidos diana donde ejerce su acción la insulina. Los órganos implicados en la etiopatogenia de la DM2 incluyen el páncreas (células  $\beta$  y células  $\alpha$ ), hígado, músculo esquelético y tejido adiposo como órganos principales, pero también riñones, cerebro, intestino delgado (49) En consecuencia, estos mecanismos fisiopatológicos impiden contrarrestar la hiperglucemia ocasionada y regular la homeostasis del metabolismo de la glucosa (50, 51).

Tanto en la aparición como la evolución de la DM2, entra en juego una compleja interacción de los factores genéticos y ambientales. Dentro de los factores ambientales, la obesidad es el principal factor de riesgo (FR) de aparición de DM2, ya que induce al mecanismo fisiopatológico de RI en los tejidos diana (11). Destacar que la obesidad suele estar presente en la mayoría de personas con DM2, pero existen importantes FR que pueden contribuir al desarrollo de DM2 como factores dietéticos, sedentarismo, disfunción microbiota intestinal, entre otros. Cuando se considera obesidad únicamente por un elevado valor del índice de masa corporal (IMC), donde solo se tiene en cuenta el peso corporal y talla del individuo, no sería suficiente para ser considerado un factor causal de desarrollo de DM2 (52). Sin embargo, un estado de obesidad producido por una excesiva ingesta de nutrientes y calorías persistente, con un exceso de acúmulo de grasa corporal, especialmente grasa visceral (zona abdominal) y ectópica caracterizada por adipocitos grandes e hipertróficos, junto a unos hábitos de vida no saludables, conforman los factores causales más importantes que contribuyen al desarrollo de RI y, por tanto, DM2 (29). En concreto, un ambiente obesogénico persistente somete a las células  $\beta$  a un estrés celular provocado por el continuo aporte de sustratos, generando un desequilibrio de los mecanismos biológicos de las mismas, favoreciendo la desregulación y disfunción de los mecanismos que controlan la homeostasis de la glucosa. El resultado final es una deficiente secreción de insulina y una RI sistémica (53).

Desde el punto de vista fisiopatológico de la DM2, generalmente se observan tres estadios bien definidos, (**Figura 6**). Una primera fase se produce aparición de RI, habitualmente asociada a valores de normoglucemia, lo que generalmente produce un estado de prediabetes. En una segunda fase, la RI

es mayor a nivel de tejidos periféricos, con una hiperinsulinemia que no alcanza a controlar los niveles de glucosa, y, en consecuencia, se produce una hiperglucemia postprandial, manteniendo así un estado de prediabetes o intolerancia a la glucosa. Por último, un estadio final asociado a la fatiga o estrés celular genera la disfunción de las células  $\beta$ , y provoca la disminución de la síntesis de insulina, alteraciones de mecanismos celulares a causa de la glucolipototoxicidad y/o fracaso celular por la apoptosis o muerte celular. En el estadio final existe una hiperglucemia crónica en ayuno, lo que desarrollará la DM2 y hará necesario aplicar tratamientos e intervenciones terapéuticas para lograr el control glucémico ocasionado por la disfunción celular existente (8).

**Figura 6.** Estadios de la fisiopatología de la Diabetes Mellitus tipo 2.



*Adaptada de Mañe Serra (8).*

Como ya hemos descrito, el mal funcionamiento de los mecanismos biológicos de control entre la secreción y acción de la insulina, tiene como resultado una hiperglucemia plasmática (54). Cuando se produce la disfunción de las células  $\beta$ , la secreción de insulina disminuye y se limita la capacidad para mantener los niveles normales o fisiológicos de glucosa. Por otro lado, la RI contribuye a aumentar la producción de glucosa en el hígado y reduce la captación de glucosa en órganos diana. Sin embargo, cuando ambos mecanismos están alterados simultáneamente, la disfunción de las células  $\beta$  como la RI, la hiperglucemia se amplifica y produce la progresión de la DM2 (55). Además, la evidencia actual de DM2 sugiere que también la alteración de las adipocinas, la inflamación crónica celular, anomalías en

la microbiota intestinal, así como hormonas producidas a nivel intestinal y el sistema nervioso son mecanismos fisiopatológicos que actúan sobre las células  $\beta$  y la regulación del metabolismo de la glucosa (56, 57) e influyen en el desarrollo de RI (53).

### **2.2.1. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2**

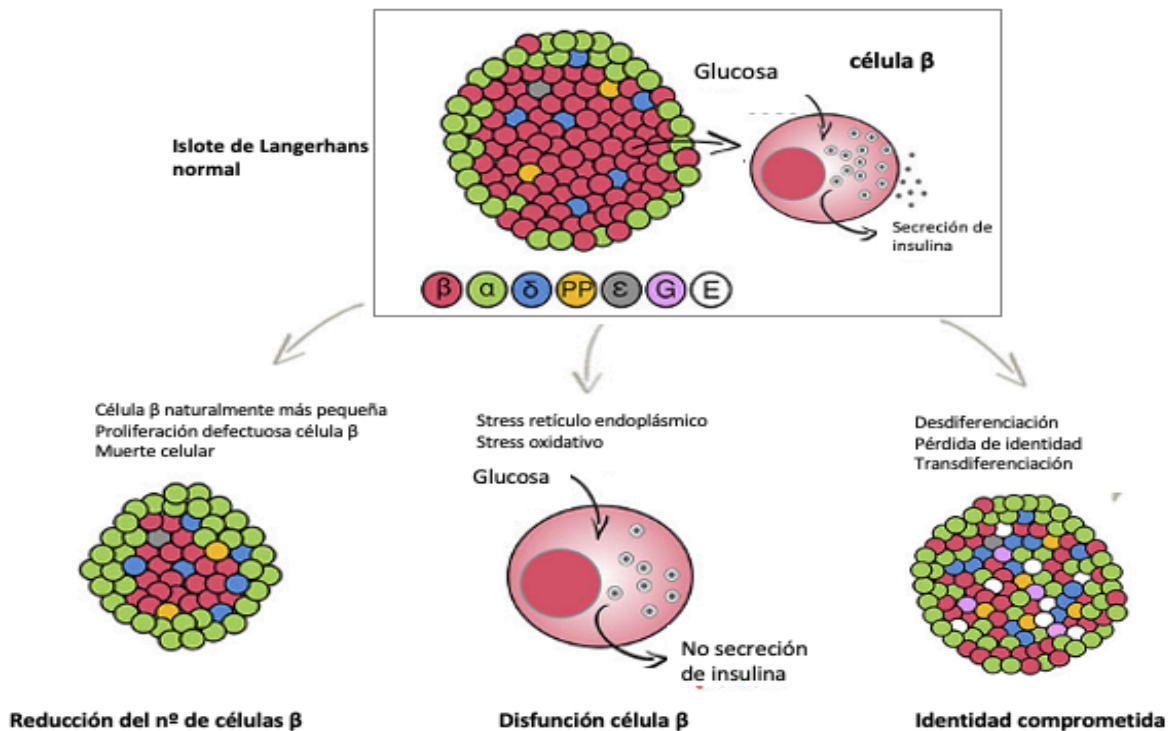
Para una correcta regulación de la glucosa, es esencial que tanto los factores celulares intrínsecos como extrínsecos se encuentren en sintonía, así como la regulación de los mecanismos de la secreción de insulina sean precisos para satisfacer la demanda metabólica. Por esa razón, una integridad adecuada de los islotes pancreáticos, así como de las células  $\beta$ , es esencial para dar una respuesta acorde a las necesidades metabólicas (10).

#### **2.2.1.1. GLUCOLIPOTOXICIDAD Y DISFUNCIÓN DE LAS CÉLULAS B-PANCREÁTICAS**

Tradicionalmente, la disfunción de las células  $\beta$  se ha asociado con la destrucción de las mismas (9), por lo que la reducción del número de células  $\beta$  funcionales se considera uno de los mecanismos fisiopatológicos de la DM2 (11), (**Figura 7**). Sin embargo, la evidencia actual sugiere que la disfunción de las células  $\beta$  podría deberse a una red compleja de interacciones entre el medio ambiente y diferentes vías moleculares. Uno de los mecanismos que más evidencia ha generado como una de las causas más importantes de disfunción de las células  $\beta$  es la glucolipotoxicidad, en especial la lipotoxicidad (58, 59). Es decir, la célula  $\beta$  se ve sometida a una toxicidad por exceso crónico y persistente de glucosa y ácidos grasos a través de la alimentación provocando su desregulación, (**Figura 7**). La glucolipotoxicidad se define como el deterioro de funciones celulares, tales como la respiración mitocondrial, la transducción de proteínas y la inducción de la muerte celular ocasionada por la acumulación excesiva de ácidos grasos libres (AGL) y/o el daño producido por la glicación de moléculas y tejidos a causa hiperglucemia crónica (60). En realidad, los mecanismos involucrados son complejos y el desequilibrio depende de varios factores alterados sobre la captación, el almacenamiento y la utilización de AGL y glucosa. Recientemente, se ha propuesto cambiar el término glucolipotoxicidad por “estrés nutricional”, ya que en condiciones fisiológicas las células  $\beta$  están expuestas a una mezcla de nutrientes como son glucosa, ácidos grasos y aminoácidos (58). Un estado de sobrenutrición como sucede en el patrón dietético occidental y moderno, rico en azúcares y grasas, genera un estado de hiperlipidemia, aumento del depósito de grasa ectópica e hiperglucemia, lo que favorece la RI y un

estado de inflamación crónica (9). Este exceso de nutrientes se ha confirmado en diferentes estudios *in vitro* como desencadenantes de la RI basal por ese estrés intracelular crónico al que está sometida la células  $\beta$  aunque se desconoce los límites a los que se origina (10).

**Figura 7.** Estructura y composición de las células endocrinas de un islote de Langerhans normal y los cambios potenciales de las células  $\beta$ .



Adaptada de Swisa A.(14). Parte superior se presenta la estructura un islote de Langerhans normal. Parte inferior se muestran los posibles cambios en la células  $\beta$  y que conducen a la disfunción celular y desarrollo de DM2

Está demostrado que una hiperglucemia mantenida a largo plazo y altas concentraciones de AGL provocan efectos glucolipotóxicos sobre las células  $\beta$  que influyen en la alteración de la regulación de vías de señalización celular, estrés oxidativo o metabolitos tóxicos de la propia degradación del metabolismo de los lípidos, disfunción mitocondrial, inflamación, y dediferenciación y autofagia celular (61). La glucotoxicidad y lipotoxicidad, el estrés oxidativo y el hiperglucemia inhiben los

mecanismos fisiológicos de secreción y liberación de insulina por las células  $\beta$ , aumenta la biosíntesis de pro-insulina y polipéptidos amiloides acumulándose con una conformación anómala que genera la síntesis especies reactivas de oxígeno (ERO<sub>2</sub>) (10). El aumento de ERO<sub>2</sub> y el daño del ADN ocasionado, produce disfunción de las células  $\beta$ , disminuyendo la capacidad regenerativa, y como resultado provoca el deterioro del mecanismo de producción y secreción de insulina. Como resultado final, la glucolipotoxicidad ocasiona la producción de señales apoptóticas de pro-insulina, inducen liberación de interleucina (IL), y produce el reclutamiento de macrófagos provocando la inflamación de los islotes pancreáticos, viéndose afectada su integridad celular (62) . Por tanto, la glucotoxicidad como la lipotoxicidad se sabe que contribuyen al desarrollo y progresión de DM2 (1).

### **2.2.1.2. RESISTENCIA A LA INSULINA (RI)**

La RI es el resultado de la alteración y reducción de la respuesta metabólica de los tejidos diana donde actúa la insulina, (**Figura 8**), y esto produce que los niveles de glucosa se mantengan elevados y no desciendan a niveles fisiológicos. La RI se manifiesta en tejidos periféricos como hígado, músculo y tejido adiposo principalmente, cuyo efecto provoca la reducción de la captación y utilización de glucosa en estos tejidos, con el resultado de niveles elevados de glucosa circulante. Cuando las células  $\beta$  del páncreas no logran compensar la RI a través de una hiperinsulinemia, se produce agotamiento y disfunción de las células  $\beta$ , intolerancia a la glucosa, y finalmente DM2.

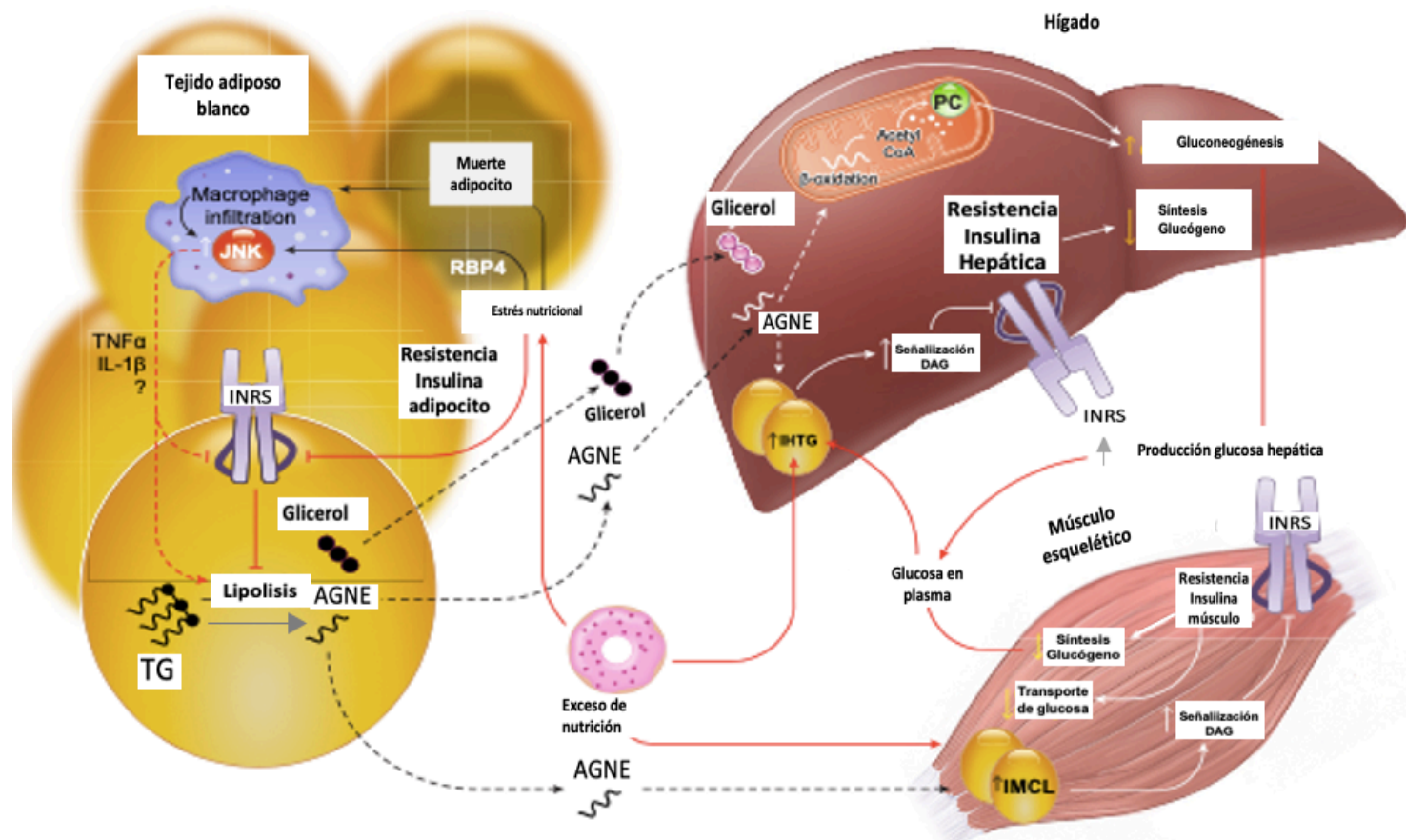
La RI está relacionada con factores genéticos y ambientales (63), entre los que hay que destacar como factores más importantes la obesidad y el aumento de la adiposidad junto con la inflamación asociada, el sedentarismo y el envejecimiento (64, 65). A día de hoy, se conocen una serie de mecanismos subyacentes a la RI, a causa de cualquier mecanismo molecular defectuoso entre los cuales destaca los defectos en la señalización postreceptor o la respuesta o acción defectuosa de la insulina sobre los tejidos diana (10).

La sobrenutrición crónica promueve la acumulación de lípidos en el músculo esquelético y hígado, siendo causa de RI. Además, se genera un estrés nutricional en el adipocito provocando RI de los mismos y la muerte de los adipocitos. Aumentos en RBP4 y otras señales proinflamatorias conducen al reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo blanco. La señalización inflamatoria de los macrófagos, incluida la activación de JNK conduce a la síntesis de factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1, y otros. Estas citocinas inflamatorias pueden aumentar la lipólisis de los adipocitos, ya sea directa o indirectamente al afectar la insulina señalización. El aumento de la lipólisis en los adipocitos

aumenta los AGNE y el recambio de glicerol. Esto produce efectos directos sobre la conversión de glicerol en glucosa e indirectos sobre acetil-CoA derivado de AGNE por la activación de piruvato carboxilasa, efectos estimulantes sobre la gluconeogénesis, y promueve la acumulación de triglicéridos intrahepáticos y la consiguiente RI inducida por lípidos, que altera la estimulación de la insulina de la síntesis de glucógeno hepático neto. Juntos estos efectos aumentan la producción de glucosa hepática. El aumento crónico de la lipólisis también puede facilitar la acumulación de lípidos intramiocelulares y promover la RI muscular inducida por lípidos. La disminución de la eliminación de glucosa de la RI muscular, aumenta la disponibilidad de glucosa para el hígado, lo que a su vez promueve la acumulación de IHTG y empeora la RI hepática.



Figura 8. Perspectiva fisiológica integrada sobre la resistencia a la insulina tisular.



Adaptada de Petersen (47). Abreviaturas anteriormente no descritas (IHTG): triglicéridos intrahepáticos; (IMCL): lípidos intramiocelulares; RBP4: Proteína transportadora de retinol tipo 4; JNK: Jun N-terminal quinasa.

#### **2.2.1.2.1. Alteraciones en el músculo esquelético por RI**

El músculo esquelético es uno de los órganos diana más importante asociado a la RI, y por tanto, en el desarrollo de DM2 (66). En condiciones normales, la insulina estimula la síntesis de glucógeno muscular después de captar la glucosa circulante. Inicialmente, la insulina se une al INRS, posteriormente GLUT-4 se trasloca desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática transportando así la glucosa al interior de la célula, para ser utilizada como sustrato energético o almacenada en forma de glucógeno muscular. La captación de glucosa por el miocito permite reducir, a su vez, los niveles plasmáticos de la misma (10). Por tanto, aquellos defectos genéticos en los INRS o GLUT-4, así como cualquier anomalía en alguna de las vías de señalización de este mecanismo, reducirán la captación de glucosa circulante en el músculo, ocasionando hiperglucemia (67).

Además, los factores ambientales pueden influir directamente sobre la captación de glucosa por el músculo. Entre ellos, la realización diaria de actividad física produce la activación de los mecanismos celulares para obtener energía, además de aumentar la demanda del flujo sanguíneo por el músculo esquelético, también favorece la captación y el uso de glucosa por las células musculares. Por otra parte, la obesidad y la inflamación asociada a ésta, son dos de los factores más importantes que contribuyen al desarrollo de RI sistémica y, en concreto, y de manera directa su efecto sobre las células musculares. La evidencia actual confirma que un aumento del depósito ectópico de tejido adiposo a nivel intermolecular y perimuscular del miocito a causa de la obesidad, produce síntesis de sustancias proinflamatorias, que provocan la inflamación de las células musculares, alterando el metabolismo de la glucosa y la aparición de RI sobre las células del músculo esquelético, reduciendo así la captación de glucosa, su utilización, provocando la elevación de los niveles de glucosa plasmática. Este mecanismo es considerado uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes del desarrollo de la DM2 (66).

#### **2.2.1.2.2. Alteraciones en el tejido adiposo por RI**

Tradicionalmente, el tejido adiposo se consideraba únicamente un depósito de almacenamiento de energía inerte. A día de hoy, se sabe que es un tejido dinámico metabólicamente y un órgano endocrino por sí mismo, debido a su capacidad de sintetizar una amplia variedad de compuestos activos biológicamente que participan en la regulación de la homeostasis a nivel sistémico. Además, el tejido adiposo está involucrado en numerosos procesos biológicos como son la inmunidad, coagulación, reproducción, regulación del apetito, homeostasis del peso corporal y metabolismo de la glucosa y

lípidos. El papel de la insulina sobre la funcionalidad del tejido adiposo es fundamental e importante y actúa de dos formas diferentes: en primer lugar, estimula la captación de glucosa y la síntesis de triglicéridos (TG); y en segundo lugar, suprime la hidrólisis de TG y facilita la absorción de AGL y glicerol circulantes en plasma, todo ello en función de las demandas energéticas existentes del organismo (68).

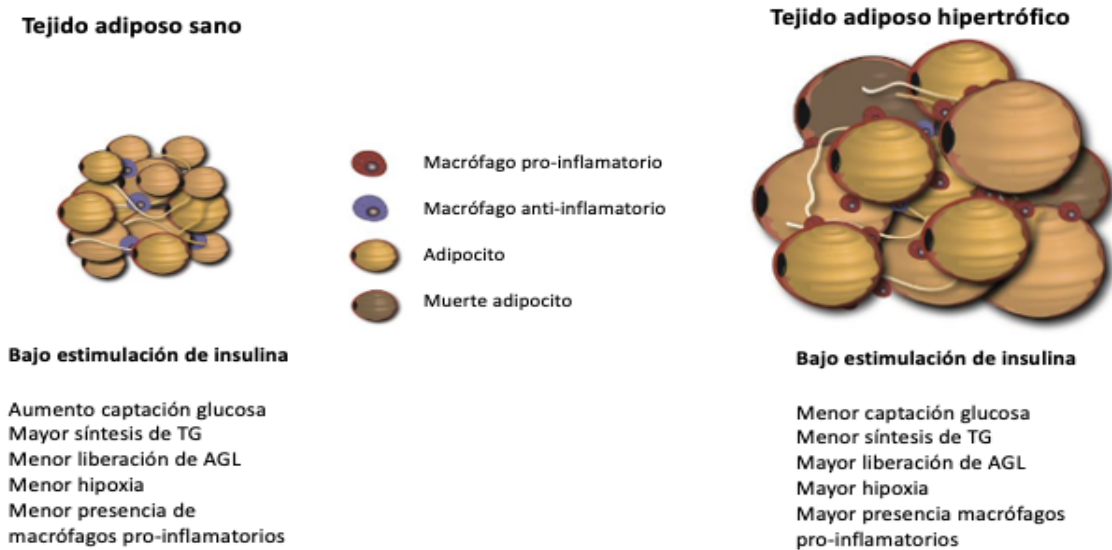
Tras una comida, se produce el aumento de los niveles de glucosa y lipoproteínas circulantes y proteínas en sangre. En un contexto fisiológico de almacenamiento de energía, el tejido adiposo activa el proceso de lipogénesis, la insulina a nivel celular se une al receptor de insulina en la superficie celular y estimula a GLUT-4 para permitir que se capte glucosa desde la sangre al interior celular. De este modo, cuando la glucosa está en el interior de la célula, se activa el proceso de glucólisis para producir glicerol-3-fosfato, y este glicerol-3-fosfato se incorpora a las vías lipogénicas. Posteriormente, el glicerol-3-fosfato junto con los ácidos grasos procedentes de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), se esterifican y forman TG. El TG se almacena en forma de gotitas en el adipocito, para su posterior uso como energía (10).

El tejido adiposo es clave en la patogénesis de la RI, y por ende, en el desarrollo de la DM2, principalmente cuando existe exceso de peso corporal, especialmente localizado en la región visceral. Fisiológicamente, la insulina actúa sobre el tejido adiposo de dos formas diferentes; a) en un estado posprandial, estimula la captación de glucosa por GLUT-4 en el adipocito, se activa la glucólisis produciendo glicerol-3-fosfato e incorporando en las rutas lipogénicas glicerol-3-fosfato junto ácidos grasos esterificados procedentes de VLDL formando TG que se almacenan en los adipocitos; b) en un estado de estrés metabólico, en el adipocito se suprime la hidrólisis de TG e inhibiendo la absorción de AGL y glicerol de la circulación para que ambos sustratos puedan ser usados como energía en otros tejidos. Cuando existe un estado de RI en las células adipocitarias, uno de los mecanismos producidos es la inhibición de la lipólisis. Al inhibirse la lipólisis, se altera la captación de glucosa y, a su vez, se produce una liberación excesiva de AGL al torrente sanguíneo con posterior acúmulo en otros tejidos como músculo e hígado, entre otros. La acumulación de AGL en otros tejidos, provoca una respuesta metabólica indirecta, que, combinada a la respuesta disminuida de la insulina en los tejidos diana provoca alteración de los mecanismos celulares, especialmente en el metabolismo de grasas e HC. Por ejemplo, en el hígado este acúmulo de AGL, provoca una respuesta metabólica indirecta junto a la RI que favorece la gluconeogénesis hepática y glucogenólisis, elevando aún más los niveles de glucosa circulantes además de otros mecanismos como la inflamación celular (53).

Otro mecanismo que también ocurre en el tejido adiposo, es la alteración estructural de los

adipocitos a causa de sobrenutrición crónica y persistente, como sucede en la obesidad. Un estado de sobrenutrición provoca el aumento anormal del tamaño de los adipocitos, generando la aparición de adipocitos hipertróficos y disfuncionales metabólicamente y favoreciendo también un estado inflamatorio crónico, (**Figura 9**). Este continuo y persistente exceso de ingesta de energética provoca que los adipocitos superen su capacidad de almacenamiento de energía, y no son capaces de almacenar más energía en forma de TG. Cuando se produce esta situación, los adipocitos especialmente aquellos que son hipertróficos, se desregulan y se vuelven resistentes al efecto antilipolítico de la insulina y esto provoca la alteración del metabolismo de las grasas (69). Este mecanismo alterado provoca que la grasa se acumule entre otros tejidos como músculo esquelético e hígado incluso en el páncreas favoreciendo la RI (70).

**Figura 9.** Alteración estructural de los adipocitos como causa de un estado crónico de sobrenutrición y la alteraciones metabólicas que produce.



*Adaptada de Galicia-Garcia U (10).*

Además, el tejido adiposo hipertrofiado y disfuncional se ha observado que está asociado con fibrosis, hipoxia e inflamación crónica donde hay participación de células inmunitarias locales como sistémicas como son los macrófagos (71). La hipertrofia de los adipocitos, así como sus propias células locales inmunitarias adipocitarias, contribuyen aumentar los niveles circulantes de citocinas que

provocan inflamación metabólica crónica. La señalización inflamatoria que se produce en los macrófagos, aumenta la producción de citoquinas inflamatorias, TNF- $\alpha$ , IL-1, así como secreción alterada de adipocinas como la leptina, a la par que disminución de secreción de adiponectina en la circulación (53). También se ha demostrado que las adipoquinas estimulan la actividad inflamatoria y tienen un papel diabético, como inductoras de RI y provocan una apoptosis aumentada de la célula  $\beta$  (72). Pero además el aumento de estas adipoquinas con efecto proinflamatorio y con actividad proaterogénico, podrían desencadenar una cascada de RI y el desarrollo de complicaciones cardiovasculares (73).

### **2.2.1.2.3. Alteraciones en el hígado por RI**

#### **2.2.1.2.3.1. Resistencia a la insulina hepática y trastornos metabólicos**

A nivel hepático la insulina regula el metabolismo de los HC mediante la utilización y producción de glucosa, pero paralelamente regula el metabolismo de los lípidos. Desde el punto de vista fisiológico, cuando a nivel plasmático aumentan los niveles de glucosa circulante, las células  $\beta$  secretan insulina. El estímulo de la insulina conlleva la activación de la síntesis de glucógeno, gluconeogénesis, glucólisis y síntesis de lípidos. La acción combinada del glucagón y la insulina permite una regulación precisa de la producción de glucosa por parte del hígado. Mientras que el glucagón induce la producción de glucosa hepática, la insulina actúa como un potente inhibidor de la producción de glucosa cuando su concentración en sangre es elevada (10).

En un estado de RI, tal y como sucede en tejido muscular o en el tejido adiposo, los niveles fisiológicos circulantes de insulina no son capaces de provocar la respuesta adecuada en los hepatocitos. La RI en el hígado altera la síntesis de glucógeno ya que no se suprime la producción de glucosa, sino que incluso aumenta su producción, pero además aumenta la síntesis de proteínas con actividad proinflamatoria como proteína C reactiva (PCR) y aumenta la lipogénesis. Esta producción anormal de proteínas proinflamatorias, junto a un estrés oxidativo por los elevados niveles circulantes de glucosa y lípidos, someten a las células a un estrés metabólico y oxidativo, que pueden favorecer al estado de inflamación. Este estado de inflamación a su vez influye de manera significativa en la respuesta alterada de la insulina a nivel hepático (74).

Desde un punto de vista integrado y global, la sobrenutrición constante provoca un estado de RI, la cual contribuye a establecer un círculo vicioso de hiperinsulinemia y RI, que culmina en una

eventual disfunción de las células, probablemente debido a la glucolipototoxicidad, el estrés oxidativo asociado, alteración del metabolismo de las grasas y glucídico por los órganos diana, y la inflamación producida, lo que conduce al desarrollo de DM2 .

#### **2.2.1.2.3.2. Dislipemia: Alteración del metabolismo de las lipoproteínas en la resistencia de insulina**

La RI afecta de manera significativa al metabolismo de los lípidos y lipoproteínas hepáticas, siendo este uno de los principales mecanismos patogénicos del desarrollo de complicaciones cardiovasculares. Una de las principales alteraciones que ocasiona es la sobreproducción hepática de VLDL (74). Esta dislipidemia se caracteriza por niveles elevados de TG plasmáticos y lipoproteínas pequeñas y densas de baja densidad (LDL) y bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL). La RI controla la producción hepática de VLDL, especialmente de VLDL grandes y ricas en TG, ya que el estado de RI influye a la velocidad de síntesis y degradación de apolipoproteína-B 100 y lipogénesis *de novo* hepática (LNH) (61), así como indirectamente en el aumento del flujo de AGL desde el tejido adiposo al hígado favoreciendo la esteatosis hepática (74). En un estado de RI, el flujo y contenido de lípidos hepáticos aumenta debido al incremento del flujo de AGL procedentes del tejido adiposo, por una mayor captación de los restos de quilomicrones por el hígado y los AGL procedentes de la dieta transportados por los quilomicrones (47). La RI altera la acción de la insulina, no inhibe la lipasa sensible a hormonas, lo que provoca una mayor movilización de TG en el tejido adiposo con mayor lipólisis y mayor flujo de AGL a otros tejidos. En la DM2 y la RI, también se produce una reducción en la expresión de la lipoproteína lipasa, la cual también favorece a la hipertrigliceridemia (HTG) tan importante que se observa en estas situaciones clínicas (74). Las personas con DM2 muestran una disminución de la captación hepática de VLDL, IDL y LDL que genera un aumento de los niveles plasmáticos de las mismas, especialmente en el estado postprandial. En concreto, esta situación se observa cuando existe una marcada deficiencia de insulina o un mal control glucémico en la DM2 (75). Además, la HTG en la DM2 también podría deberse a un catabolismo reducido de VLDL e IDL (74).

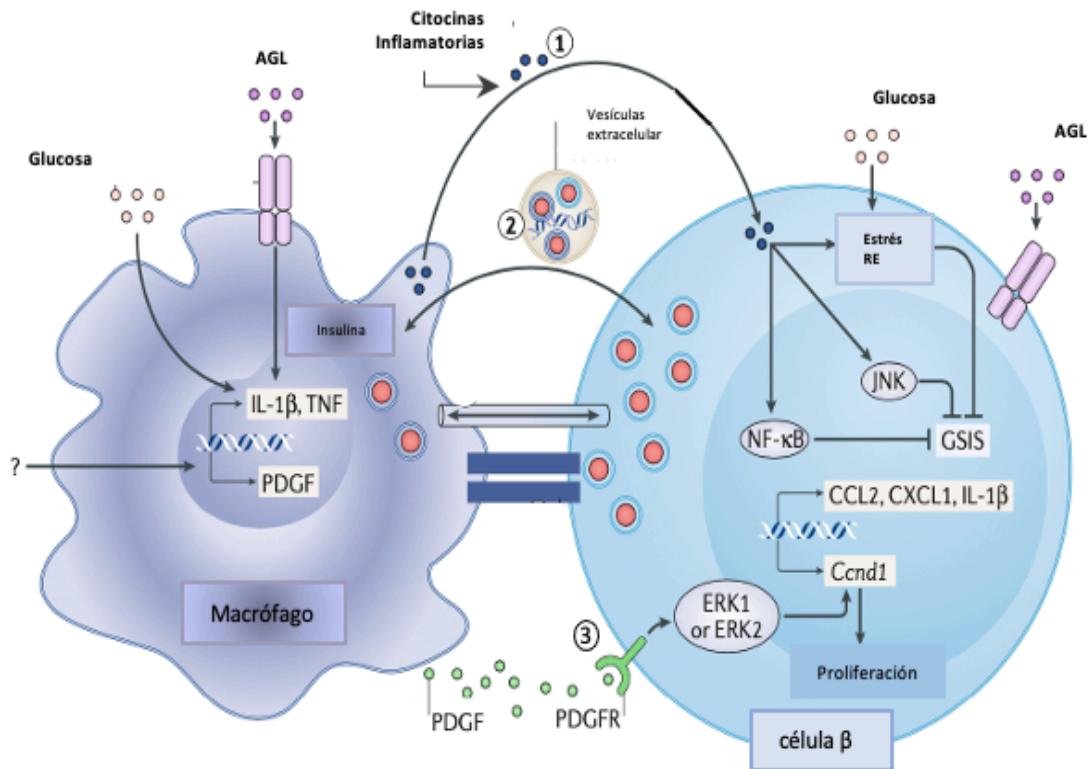
#### **2.2.1.3. INFLAMACIÓN SISTÉMICA ASOCIADA A LA OBESIDAD COMO CAUSA DE LA DM2**

La RI, la obesidad y la DM2 se encuentran estrechamente asociadas con un estado inflamatorio crónico resultado de la producción anormal de citocinas, aumento de las proteínas y otros mediadores con

actividad proinflamatoria (76). La inflamación se considera el mediador común entre ambas enfermedades, y es debido fundamentalmente al aumento y disfunción, como se ha comentado previamente, del tejido adiposo a causa de un balance energético positivo. Esta asociación de la inflamación entre la obesidad y la DM2, se puede explicar por varios mecanismos.

En primer lugar, la obesidad está asociada con el aumento de marcadores inflamatorios en órganos como el hígado, el tejido adiposo, el músculo esquelético, los islotes pancreáticos y el cerebro, los cuales son los principales órganos implicados en el desarrollo de DM2 e incluso existe asociación significativa entre el aumento de estos marcadores de inflamación como PCR, IL-6, el TNF- $\alpha$  o recuento de glóbulos blancos con la incidencia de DM2.

En segundo lugar, el papel diabetogénico que tiene el tejido adiposo con la secreción de adipoquinas con actividad proinflamatoria, que actúan como inductoras de RI y apoptosis incrementada de las células  $\beta$  (8). Además, en la obesidad aumentan ciertos lípidos especialmente AGNE o AGL, los cuales contribuyen al aumento de inflamación de los tejidos diana. Esta sobreproducción de AGL provoca una reacción inmune crónica en el tejido adiposo y hepatocitos entre otros, movilizándolo una gran variedad de células inmunitarias como células  $\beta$ , células NK, células T y otras citocinas como TNF- $\alpha$  o IL-6, que generan un aumento de la actividad de macrófagos proinflamatorios en estos tejidos, (**Figura 10**). Esta inflamación también se observa a nivel de los islotes pancreáticos y de los hepatocitos, cuya reacción inmune contribuye a la disfunción de las células  $\beta$  e incluso apoptosis final (77). El músculo esquelético es uno de los tejidos diana donde se desarrolla RI en la obesidad y la DM2. Sin embargo, el aumento de la adiposidad parece que no activa el proceso inflamatorio en el propio músculo, sino que la inflamación muscular se produce por infusión intralipídica (76).

Figura 10. Interacción de los macrófagos en los islotes y células  $\beta$  en la inflamación en la obesidad.

Adaptada de Ying (81). 1) En la obesidad, niveles plasmáticos elevados de glucosa y AGL pueden inducir un fenotipo proinflamatorio de los macrófagos de los islotes. Estos macrófagos producen un aumento de cantidades de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF. Estas citocinas activan NF- $\kappa$ B y vías JNK en células  $\beta$  y también exacerban el estrés del retículo endoplásmico (RE). Sinérgicamente, estas respuestas amortiguan la secreción de insulina estimulada por glucosa de las células  $\beta$  (GSIS). 2) Otro de los mecanismos incluyen vesículas extracelulares que contienen insulina liberada por las células  $\beta$  y fagocitada por los macrófagos de los islotes. 3) La obesidad aumenta la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en los macrófagos de los islotes a través de mecanismos no conocidos. A través de los receptores de PDGF (PDGFR) expresados en las células  $\beta$ , el PDGF promueve la proliferación de células  $\beta$  al activar aguas abajo la quinasa regulada por señal extracelular (ERK) que induce la expresión del gen del ciclo celular (Ccnd1) favoreciendo la proliferación celular.



#### **2.2.1.4. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL**

Existe evidencia consistente que asocia la disfunción mitocondrial con el desarrollo de DM2, la RI en relación con la senescencia celular y las complicaciones asociadas de la DM2 (10). Se sabe que la biogénesis mitocondrial defectuosa, el estrés oxidativo y posibles mutaciones genéticas que puedan afectar a la integridad mitocondrial, así como el envejecimiento celular, están estrechamente relacionadas con el desarrollo de la DM2 (78).

Fisiológicamente, las mitocondrias tienen funciones muy importantes a nivel celular ya que su función principal es la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa según la demanda metabólica (10). También participan en la producción de diferentes metabolitos que luego son utilizados como precursores de lípidos, proteínas y ADN, y participan en el mantenimiento de la homeostasis iónica, eliminación de radicales de oxidación, responden al estrés oxidativo y ayudan a integrar diferentes rutas de señalización. La disfunción mitocondrial, es un estado que produce una menor producción de energía (ATP) a través de la respiración mitocondrial. Esta disfunción ocasiona menor eficiencia de oxidación de nutrientes, cuyo resultado conduce a una menor síntesis ATP y/o consumo oxígeno, y aumento de la producción y acumulación de  $ERO_2$ , los cuales se oxidarán y dañan estructuras de proteínas, ADN y la membrana mitocondrial, incluso deterioran su función y a veces causan la muerte celular. Este acúmulo de  $ERO_2$  conlleva activación de vías metabólicas que favorecen la disfunción mitocondrial y desarrollo de RI. También el incremento de AGL presente en la DM2 por alteración del metabolismo de los lípidos, provoca efectos negativos a nivel mitocondrial favoreciendo el aumento de la producción y acumulación de  $ERO_2$ , los cuales interfieren con la señalización de la insulina y favorece RI (79). Otro mecanismo es una regulación a la baja de genes involucrados en el metabolismo oxidativo y una disminución de la tasa de resíntesis de la fosfocreatina. Ambos mecanismos son indicadores de deterioro de función mitocondrial (10). Además la dinámica mitocondrial es clave en el mantenimiento de mitocondrias sanas y controlar la cantidad. En este proceso, la fisión promueve la eliminación de las mitocondrias dañadas, a través de la mitofagia. Cuando se altera el proceso de mitofagia, aumenta el estrés celular y la producción de  $ERO_2$ , induciendo la reducción de la sensibilidad a la insulina en el hígado y afectando a la homeostasis de la glucosa, siendo otro de los mecanismos patológicos del desarrollo de DM2. Este mecanismo se ha observado como el inicio de la obesidad y RI (10). También el incremento de AGL presente en la DM2 por alteración del metabolismo de los lípidos, provoca efectos negativos a nivel mitocondrial favoreciendo el aumento de la producción y acumulación de  $ERO_2$ , los cuales interfieren con la señalización de la insulina y favorece RI (79).

## 2.3. FACTORES DE RIESGO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

Existen numerosos FR involucrados en la fisiopatología de la DM2, pudiéndose agrupar en dos grandes bloques: a) factores no modificables tales como la predisposición y susceptibilidad genética, sexo y envejecimiento; y b) factores modificables, como el peso corporal, acúmulo de masa grasa corporal, dieta y actividad física, sobre los que se puede intervenir, previniendo así el desarrollo de la enfermedad o incluso mejorar su manejo terapéutico (61). Numerosos estudios establecen que la mejora de los FR modificables, sobre todo la obesidad, los hábitos dietéticos o el sedentarismo, previenen la mayor parte de casos de DM2 (10).

### 2.3.1. FACTORES DE RIESGO NO MODIFICABLES

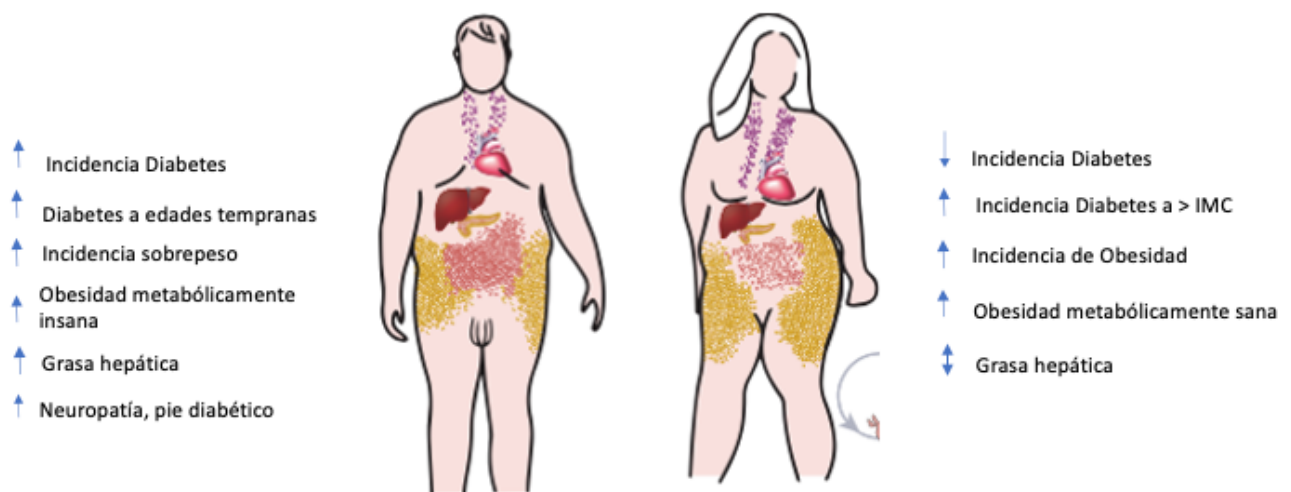
#### 2.3.1.1. PREDISPOSICIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y ANTECEDENTES FAMILIARES.

La DM2 tiene un fuerte componente genético, lo que se ha demostrado en estudios de tasas de concordancia de DM2 en gemelos monocigóticos comparando con gemelos dicigóticos. Además, se sabe que existe un elevado riesgo para los familiares de primer grado de sufrir DM2 a lo largo de su vida, siendo de casi de un 40% si un progenitor padece DM2 y mucho mayor es el riesgo cuando ambos progenitores sufren DM2 (48). Sin embargo, en los últimos diez años gracias al desarrollo de los estudios de asociación del genoma (GWAS) se ha demostrado la naturaleza poligénica de la DM2, identificando más de 130 *loci* con más de 150 variantes que pudieran estar involucradas en la patogenia de la DM2 (8, 10, 48). La mayoría de estas variantes genéticas aumentan el riesgo de desarrollo de DM2 al ejercer efecto sobre mecanismos de secreción de la insulina, función de las células  $\beta$  y, en menor medida, inhibiendo la acción de la insulina que producen RI (10, 63). La heredabilidad general de la DM2 es pequeña, entre el 10-20% de la misma (48), lo que demostraría la compleja interacción entre la genética, los factores ambientales y la epigenética (51). Sin embargo, es importante destacar que la heredabilidad difiere entre las diferentes poblaciones, como en el caso de los grupos indígenas donde existen poblaciones que explican el 100% de casos de DM2. Cabe destacar que los factores ambientales suelen estar compartidos entre los integrantes de la familia donde la potente interacción de los factores modificables sobre el genoma y la expresión de genes (herencia poligénica influye de modo importante. Por tanto, la exposición a un estilo de vida no saludable, (dieta, actividad física, hábitos alimentarios incorrectos) son factores potencialmente capaces de influir en el genoma y modificando la transcripción del gen (8) y aumentando el desarrollo de DM2.

### 2.3.1.2. SEXO

El sexo es un factor biológico que juega un papel clave sobre las diferencias existentes de salud entre hombres y mujeres, y en este caso, sobre la vulnerabilidad de los factores y complicaciones de la DM2 (29). Hoy en día, la DM2 se diagnostica con mayor frecuencia a edades más jóvenes, pero curiosamente con IMC inferiores en los hombres frente a mayores cifras de obesidad en las mujeres, lo que plantea la idea de que existan diferentes mecanismos según el sexo. La relación entre sexo y el tipo de obesidad, depende principalmente de donde se produce la acumulación del tejido adiposo en el organismo. En relación a esto, existen dos tipos de obesidad: obesidad androide donde el acumulo de tejido adiposo se produce a nivel central, especialmente en el abdomen y predomina en los hombres; y la obesidad ginoide con acumulo en la zona glúteo-femoral, y predomina más en las mujeres. La obesidad androide se caracteriza por la acumulación tanto de grasa subcutánea en la región abdominal y la grasa visceral. Se ha demostrado que este tipo de obesidad se asocia con un riesgo tres veces mayor de ECV, promueve el desarrollo de RI y DM2, e incluso se acompaña de hipertensión, dislipemia con altos niveles de TG y partículas de colesterol LDL (c-LDL) así como bajo niveles de colesterol HDL (c-HDL) en comparación con la obesidad ginoide. Además, la obesidad abdominal contribuye a la inflamación que se asocia con la síntesis y secreción de citoquinas proinflamatorias (61, 70), (**Figura 11**).

**Figura 11.** Efecto fisiopatológico de la distribución del tejido adiposo según sexo.



*Adaptada de Kautzky-Willer (29).*

### **2.3.1.3. ENVEJECIMIENTO**

La DM2 es una de las muchas enfermedades asociadas al envejecimiento. El paso de los años biológicamente provoca envejecimiento o senescencia celular (60), asociado con la disminución de la función a nivel celular de todo el organismo, y por tanto, con el aumento de enfermedades (80). Si al propio proceso biológico de envejecimiento, le sumamos los procesos fisiopatológicos: lipotoxicidad, estrés oxidativo, la inflamación sistémica, o un aumento y/o alteración de la distribución de tejido adiposo y su relación con la RI, e incluso la reducción de los mecanismos protectores como la capacidad antioxidante de las células  $\beta$ , el conjunto de estos mecanismos contribuye al aumento de la prevalencia de la DM2. Con la edad, el proceso de envejecimiento celular aumenta la tasa de episodios apoptóticos, mientras que la proliferación celular se ve desfavorecida, con el resultado del aumento del deterioro del páncreas endocrino y disfunción de células  $\beta$  (60).

### **2.3.2. FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES**

La DM está aumentando globalmente a un ritmo independiente de los factores genéticos, lo que revela la importancia del potencial de interacción que tienen los factores ambientales sobre el desarrollo de la DM, especialmente sobre la DM2. Los FR comúnmente asociados con la DM sin distinción del tipo son: la obesidad, los factores dietéticos y nutricionales incorrectos así como un ambiente sedentario, pero también disruptores endocrinos y otros contaminantes ambientales o la composición del microbioma intestinal, se han asociado como FR del desarrollo de DM (51). Un ambiente obesogénico, causado por dietas hipercalóricas y sedentarismo, son dos de los FR más importantes en el desarrollo de DM2, siendo la obesidad el principal FR reconocido en el desarrollo de la DM, cuyas cifras de obesidad aumentan paralelamente junto con la DM2. Las previsiones muestran una tendencia con crecimiento del 3% anual en los hombres y un 1,9% en las mujeres. A nivel mundial, el pronóstico de la prevalencia de obesidad en 2030 del 36% en hombres y del 32% en mujeres (37).

#### **2.3.2.1. OBESIDAD Y DEPÓSITO DE TEJIDO ADIPOSO**

La obesidad se define como un síndrome heterogéneo con una complejísima interacción de factores genéticos y ambientales. La obesidad y la DM están estrechamente ligadas, con una incidencia de casos en paralelo, convirtiéndose en un verdadero problema de salud pública a nivel mundial. La mayor parte de los individuos que tienen DM2 también son obesos. No podemos obviar como muchas de estas

personas obesas son prediabéticas y en un futuro próximo si no existe modificación de su estilo de vida y/o factores ambientales, desarrollaran DM2. El riesgo de desarrollar DM es casi nueve veces mayor en individuos obesos que los que no (81). Además la obesidad es el FR más importante de ECV (1), pero también de otras patologías como son la hipertensión, dislipemias, la apnea del sueño, la EHGNA y ciertas formas de cáncer (51).

Es obvio que los factores del estilo de vida como la ingesta excesiva de calorías y nutrientes, la inactividad física o sedentarismo, juegan un papel importante en el aumento de la prevalencia de la obesidad y DM2 (82). Los principales factores relacionados con la RI, son una ingesta excesiva de calorías y el depósito de grasa visceral y/o ectópica (61). Cuando se define la obesidad únicamente por un elevado IMC  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup> sin tener en cuenta ningún otro FR, parece contribuir menos como FR de DM2 (61) que cuando nos encontramos en situaciones donde la obesidad se produce por una continua y excesiva ingesta de calorías con predominio de una elevada ingesta de azúcares simples y aporte limitado de fibra en la dieta, así como alto contenido en grasas tiene como resultado de un aumento del depósito de grasa visceral, aumento del IMC y circunferencia abdominal, siendo determinantes claves de la RI y en consecuencia, del desarrollo de DM2 (10). Es importante destacar la relevancia que tiene la distribución y acúmulo del tejido adiposo en la obesidad y su relevancia en el desarrollo de RI. Como ya hemos comentado el tipo de obesidad según la distribución puede ser: obesidad androide con acúmulo de tejido adiposo en la zona abdominal (grasa visceral-intraabdominal) o una obesidad ginoide con acúmulo de tejido adiposo en la zona glúteo-femoral, siendo una grasa subcutánea. La obesidad androide, en comparación con la obesidad ginoide se asocia con importantes implicaciones sobre la homeostasis metabólica corporal, desarrollo de enfermedades metabólicas como RI y la intolerancia a la glucosa y desarrollo de DM2, pero además la grasa visceral es el principal impulsor de la RI hepática. A pesar de toda evidencia, solo una tercera parte de las personas con obesidad terminaran desarrollando DM2, lo que indica que puedan existir otros mecanismos implicados (8).

### **2.3.2.2.FACTORES DIETÉTICOS**

Los factores dietéticos se consideran uno de los FR modificables más importante en el manejo terapéutico de la DM2, sobre los cuales se puede realizar una intervención, optimizando así los beneficios de los mismos. Estudios prospectivos han demostrado que una dieta basada en alimentos vegetales y con bajo aporte de calorías se asocian a un menor riesgo de DM2, incluso aportan efectos

protectores, mientras que dietas con bajo aporte de fibra y con un índice glucémico (IG) elevado se asocian con un mayor riesgo de DM2 (82). Otros estudios muestran asociaciones variables del consumo de pescado y los productos lácteos fermentados parecen producir efectos positivos frente a los no fermentados. Además, el consumo constante y frecuente de cereales refinados o las bebidas azucaradas, se han asociado a un mayor riesgo de obesidad, síndrome metabólico y DM2. En relación al consumo de grasa, está demostrado que el consumo excesivo de grasas saturadas se asocia con un mayor riesgo de DM2 independientemente del IMC, mientras que una ingesta elevada de ácido linolénico tiene el efecto inverso reduciendo el riesgo de DM2, especialmente en hombres más delgados y jóvenes (31). Desde esta perspectiva, en varios estudios se ha observado que el consumo de café, té y alcohol parecen ser factores protectores y dependientes de la dosis ingerida. Recientemente un metaanálisis sobre el consumo de café mostró una relación inversa entre la dosis-respuesta del consumo de café con cafeína frente al café descafeinado y el riesgo de DM2. Los resultados mostraron un riesgo entre un 25-30% menor cuando se bebían tres o más tazas al día (83). Estos ensayos controlados a corto plazo solo informan de ligeros cambios en la respuesta de insulina y glucosa después del consumo de café. Sin embargo, parece ser que pueden modificarse otros marcadores de riesgo inflamatorio de la DM2. Estudios sobre el té, en concreto té verde, también sugieren una ligera disminución del riesgo de DM2 entre un 10-15% cuando se beben más de tres tazas al día (31). En el caso del consumo de alcohol está más que demostrado que los riesgos para la salud dependen de la dosis ingerida, donde el consumo moderado de alcohol, es decir 1-2 bebidas al día, parece reducir en un 20 % de media, sin diferenciar entre hombres y mujeres, el riesgo de desarrollo de DM2 (84, 85).

Después de una comida copiosa, se produce una interacción sinérgica en los procesos que producen la inflamación e induce a un estado de estrés oxidativo, con exacerbación de los efectos postprandiales nocivos. Por lo tanto, un estado de estrés nutricional a causa de un elevado consumo de calorías y nutrientes, se ha visto que conduce a un estado pre-oxidante que ocasiona una disfunción dentro de la célula afectando a nivel mitocondrial, estrés celular e induce a la activación de diferentes vías metabólicas que producen una superproducción de moléculas oxidativas que favorecen a un estado de RI y DM2 (86).

### **2.3.2.3. SEDENTARISMO**

Un estilo de vida sedentario es otro FR asociado con la DM2, pues se estima que un individuo que realiza actividad física de manera regular en intensidad moderada reduce el riesgo de desarrollo de

DM2 aproximadamente en un 30% (87). Algunos estudios han demostrado que una actividad física leve, como caminar a paso ligero unos 30 minutos/día, reduce el riesgo de DM2 en un 30% (37). Los principales beneficios de la actividad física sobre el retraso del inicio de la DM2, se produce porque el movimiento muscular provoca la contracción de los miocitos del músculo esquelético, lo que requiere un aumento del flujo sanguíneo en el músculo favoreciendo la captación de glucosa circulante del plasma (88). Se ha demostrado que el ejercicio de intensidad moderada mejora la captación de glucosa en un 40%, pero un hecho importante, es que la actividad física reduce significativamente la grasa intraabdominal, mejorando de ese modo la RI, el cual sabemos que es factor causal de desarrollo de DM. Paralelamente, la actividad física también mejora la sensibilidad de insulina y reduce el peso corporal por la quema de calorías, reduciendo así la obesidad (31). Además, la inflamación y estrés oxidativo se reducen por la mejora de la obesidad y RI (88).

En contraste, un estilo de vida sedentario puede duplicar el riesgo de DM (37). Se ha demostrado que existe una fuerte asociación entre el tiempo que permanecemos sentados y el desarrollo de obesidad o DM, independiente del grado de actividad física realizada. Otro dato a tener en cuenta es que las personas con un estilo de vida sedentario presentan concentraciones más altas de mediadores proinflamatorios circulantes los cuales están asociados al desarrollo de RI y, por tanto, de DM2 (31).

#### **2.3.2.4. OTROS FACTORES AMBIENTALES**

Recientemente, estudios epidemiológicos han analizado el papel de otros FR como el tabaquismo, el estrés emocional, la contaminación ambiental y acústica, la privación de sueño, el déficit de vitamina D, entre otros. En este sentido, la exposición al humo del tabaco tanto forma activa como pasiva se ha observado que esta asociado con un aumento del riesgo de DM2 cuando se compara con sujetos no fumadores. También una mayor contaminación que incluye la exposición al tráfico de las ciudades, el ruido, así como elevadas cantidades de partículas finas en suspensión, están asociadas con un mayor riesgo de desarrollo de DM2 durante los próximos 5-10 años, donde los expuestos tienen un mayor riesgo del 20-40 % que los no expuestos. Los mecanismos causales no están claros, y son necesarios más estudios, pero parece ser que no afectan directamente a la función de las células  $\beta$ , sino que podrían tener efecto indirecto sobre estado inmunológico, la vascularización, el tejido adiposo, microbiota intestinal u otros órganos diana de la DM2 (31).

### 2.3.2.5. MICROBIOTA INTESTINAL

En los últimos años ha aumentado el conocimiento del microbioma humano y su relación con el desarrollo de enfermedades. Numerosos estudios han informado que los cambios producidos en la microbiota intestinal contribuyen al desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad, la DM o enfermedades hepáticas, sino también en enfermedades como el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas. Los diferentes tipos de bacterias intestinales desempeñan diferentes funciones en el mantenimiento o la interacción con su entorno, por tanto, aquellos factores que influyen sobre el entorno de estos microorganismos generan alteraciones sobre microbiota intestinal (47). Recientemente, se demostró que la disfunción de la microbiota intestinal tiene una gran influencia en el desarrollo de DM2. En general, la DM2 se asocia con niveles elevados de adipocinas pro-inflamatorias, mientras que en este sentido, la microbiota actúa sobre la modulación de la inflamación disminuyendo la producción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias, pero también promoviendo la síntesis de productos microbianos antiinflamatorios (82). Otro mecanismo sería la inhibición de citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias por microbios beneficiosos, que previenen la inflamación. Otra de las características que se produce en la DM2, es el aumento de la permeabilidad intestinal dando lugar al paso de productos microbianos a la sangre, siendo causa de endotoxemia metabólica. Sobre este mecanismo, existen diferentes bacterias potencialmente beneficiosas, como *Bacteriodes vulgatus*, y *dorei* o *Akkermansia muciniphila*, reduciendo la permeabilidad intestinal y mejorando la endotoxemia (89).

Además destacar como la microbiota intestinal influye en la homeostasis de la glucosa y RI, así como al afectar la digestión de azúcares y la producción de hormonas intestinales como incretinas y mejorar que controlan este proceso, o productos producidos por la microbiota, como el butirato o ácidos grasos, puede actuar como ligando para receptores acoplados a proteína G en el intestino y promover la liberación de hormonas intestinales como GLP-1 y PY (90). Existen bacterias que producen ácidos grasos de cadena corta y aumentan la oxidación de los AG en el tejido adiposo. Por ejemplo *Lactobacillus gasseri* ha sido demostrado que reduce la obesidad al aumentar los genes de oxidación de ácidos grasos y reducción de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos. Este mecanismo, favorece la modulación del metabolismo de los AG y del gasto energético, con beneficio sobre la obesidad, y DM2 acompañante (89)



## 2.4. COMPLICACIONES Y COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

Con frecuencia el desarrollo de las complicaciones asociadas a la DM2 es progresivo, dependiente de la gravedad de los mecanismos etiopatogénicos específicos e influenciado por los factores genéticos y ambientales que entran en juego en el desarrollo de la DM2. Las complicaciones metabólicas agudas asociadas con la mortalidad incluyen cetoacidosis diabética debido a la hiperglucemia. Sin embargo, las complicaciones que se producen a largo plazo se agrupan en: a) enfermedades microvasculares por daño en los pequeños vasos sanguíneos, e incluyen retinopatía, nefropatía y neuropatía; y b) enfermedades macrovasculares por daño de grandes vasos, que engloban aterosclerosis acelerada, manifestada principalmente en IM y ACV, así como enfermedad arterial periférica (EAP) (82, 91).

El principal factor de la evolución de las complicaciones crónicas asociadas a la DM, es un mal y/o insuficiente control glucémico donde los niveles elevados de glucosa se mantienen en el tiempo y ocasionan daño o lesión en los órganos susceptibles. Según la ADA, en la práctica clínica recomienda el uso de la HbA1c como marcador de un correcto control glucémico; habiéndose observado que un valor de HbA1c  $\leq 7\%$  previene complicaciones microvasculares (11). Además, la evidencia actual informa que la detección temprana de estas complicaciones y un control glucémico adecuado puede retrasar la aparición de las mismas y mejorar la calidad de vida (92). Estudios de referencia, como el *Diabetes Control and Complications Trial* y el *United Kingdom Prospective Diabetes Study*, han demostrado que el control intensivo de los niveles de glucosa en sangre y el control estricto de la presión arterial reducen el riesgo de complicaciones relacionadas con la DM (93).

### 2.4.1 ENFERMEDADES MICROVASCULARES

#### 2.4.1.1. NEFROPATÍA DIABÉTICA

La nefropatía diabética es una de las complicaciones microvasculares más graves asociadas a la DM, y la principal causa de enfermedad renal terminal en las sociedades occidentales (91). La manifestación temprana es la presencia de microalbuminuria, pero según avanza la nefropatía diabética los pacientes tienen un elevado riesgo de insuficiencia renal y de eventos y muerte cardiovascular. La microalbuminuria se considera un indicador de disfunción del endotelio renal, así como un predictor independiente de riesgo cardiovascular en individuos con o sin DM (94).

#### **2.4.1.2. RETINOPATÍA DIABÉTICA**

La retinopatía diabética es otra de las complicaciones microvasculares que ocurre en la DM, siendo la causa principal de ceguera en Europa y afecta casi al 2% de las personas con DM en adultos entre 20-74 años (95, 96). La retina es la región más vascularizada del cuerpo por la gran demanda de oxígeno que necesita para realizar la función de conversión de luz en imágenes. La hiperglucemia crónica causa daño en los vasos retinianos con el resultado de aparición de edemas y/o hemorragias, que se originan por la permeabilidad producida por los cambios metabólicos que ocasiona la hiperglucemia. Además existe asociación entre otras complicaciones presentes en la DM, hipertensión, aterosclerosis y nefropatía diabética, las cuales a su vez son FR de desarrollo de retinopatía (94). La evolución de la retinopatía diabética se divide en dos etapas: la retinopatía diabética no proliferativa y retinopatía diabética proliferativa. La retinopatía diabética no proliferativa se produce en los primeros estadios de la enfermedad por el aumento de la permeabilidad vascular y obstrucción de los capilares. La retinopatía diabética proliferativa es el estadio más avanzado y grave, caracterizado por neovascularización, con un resultado final del deterioro grave de la visión o ceguera. La ceguera se produce generalmente por hemorragia vítrea o el desprendimiento de retina. La causa más común de pérdida de visión por retinopatía diabética, es el edema macular diabético. Este edema macular se caracteriza por hinchazón o engrosamiento de la mácula debido a la acumulación de líquido en la mácula provocada por la ruptura de la barrera de los vasos de la retina. El edema macular diabético puede ocurrir en cualquier etapa de la retinopatía diabética y es la causa más frecuente de distorsión de las imágenes visuales y disminución de la agudeza visual. Esta complicación depende de factores asociados como mal control glucémico con HbA1c elevada, así como presión arterial sistólica elevada, el tipo de DM y duración de la enfermedad (94, 96).

#### **2.4.1.3. NEUROPATÍAS DIABÉTICAS**

Las neuropatías diabéticas son un grupo heterogéneo de trastornos con diferentes manifestaciones clínicas causadas por la lesión o daño de los nervios que provoca la hiperglucemia crónica. El reconocimiento temprano y el manejo adecuado de las mismas es fundamental para su prevención y manejo terapéutico adecuado (94). La neuropatía diabética puede asociarse con úlceras del pie, amputaciones, heridas cutáneas que no cicatrizan, pero también con otras manifestaciones como son molestias digestivas, alteraciones cardíacas y disfunción sexual (97).

La afectación más común e importante de la neuropatía es la lesión de los nervios periféricos afectando a piernas y pies; se denomina neuropatía periférica diabética. El daño producido sobre los nervios periféricos da como resultados pérdida de la sensibilidad protectora en los pies que provoca la formación de callos, ulceración y otras lesiones por la insensibilidad que ocasiona, pero también puede producirse infección de la piel como celulitis y gangrena (82, 94). La neuropatía periférica diabética es la complicación más frecuente en pacientes con DM2 y afecta principalmente a las extremidades inferiores distales y se divide en neuropatía periférica sensorial, motora y autónoma (98). Según las fibras sensoriales afectadas, los síntomas son variables pero aquellos más tempranos y comunes son dolor y disestesia, debido a la lesión de fibras pequeñas. Cuando la lesión se produce en fibras grandes el síntoma será entumecimiento y pérdida de la sensación protectora y provoca polineuropatía distal. Esta pérdida de la sensación protectora es el principal factor de riesgo de ulceración del pie diabético (94). Actualmente el mejor tratamiento posible para la neuropatía periférica diabética consiste en llevar a cabo un buen control glucémico, ya que permite prevenir eficazmente la neuropatía periférica diabética pero, una vez que se produce el daño neuronal, éste no se revierte. Las estrategias terapéuticas a través de terapias farmacológicas como no farmacológicas, alivian el dolor neuropático de la neuropatía periférica diabética y mejoran la calidad de vida (94, 99).

La neuropatía periférica sensorial o también denominada "síndrome de pies ardientes", es la disminución o pérdida del sentido de la vibración y sensibilidad superficial, así como parestesia subjetiva, simétrica al inicio y localiza en zona más distal de las extremidades inferiores (98). Además, la neuropatía sensorial puede estar acompañada de disminución de la percepción de la temperatura, lo que aumenta el riesgo de quemaduras en el momento de la higiene diaria, siendo la causa principal de las gangrenas (98).

La pérdida de sensibilidad ocasiona tres tipos de complicaciones: a) la ausencia de sensibilidad al dolor que, junto con la presión constante en la zona, pueden producir una necrosis por isquemia local; b) presión muy alta de la zona durante poco tiempo ocasiona lesiones directas e inmediatas posiblemente no detectadas en el momento justo y conllevan a la infección o gravedad de la misma, y c) presión moderada repetitiva ocasiona inflamación de la zona, lo que genera ulceraciones. Entre todos los diabéticos, el riesgo de desarrollar una ulceración del pie diabético es del 25% (100). En comparación con los no diabéticos, la necesidad de una amputación mayor es de 30 a 40 veces mayor en pacientes con DM2. La tasa de mortalidad a cinco años después de la amputación se estima en 39-68%. La neuropatía motora se observa con la presencia de atrofia de músculos pequeños del pie, ocasionado por una mala posición de los dedos del pie, habitualmente por dedos en garra. También

puede manifestarse con pérdida de reflejos musculares, en concreto, reflejo del tendón de Aquiles y paresia motora. La combinación de neuropatía periférica sensorial y motora conduce a una carga desigual del pie acompañada de una marcha insegura y con el tiempo el desarrollo de una hiperqueratosis plantar (98).

#### **2.4.2 ENFERMEDADES MACROVASCULARES**

En la DM2 las complicaciones macro y microvasculares se deben principalmente a la exposición prolongada a la hiperglucemia crónica, fruto de un mal control glucémico junto con otros FR como hipertensión arterial, la enfermedad renal, dislipidemia (91). Además la evidencia ha demostrado que existe una clara relación sobre el desarrollo de aterosclerosis avanzada y la DM, independientemente de otros FRCV tradicionales (101).

La causa principal de las complicaciones, así como eventos cardiovasculares en personas con DM, es la aterosclerosis acelerada, que se manifiesta como enfermedad coronaria o cardiopatía isquémica (EC-CI), accidente cerebrovascular isquémico, EAP e insuficiencia cardíaca (102), además de una importante discapacidad (103) y elevada mortalidad por estas causas, especialmente en personas más jóvenes. El riesgo de EC en pacientes con DM es muy elevado, ya que el riesgo de IM en personas DM sin antecedentes a los 7 años es del 20 % frente al 3,5 % comparado con los no diabéticos. De modo similar, ocurre para personas con antecedentes de IM y DM, donde el riesgo de volver a sufrir IM a los 7 años es del 45 % frente al 18,8 % para los no diabéticos. Estos datos nos indican como la DM contribuye significativamente al desarrollo de IM y riesgo de EC. Dentro de las ECV asociadas a la DM, la EAP es una complicación macrovascular frecuente en estos pacientes junto a la discapacidad y complicaciones asociadas. La evidencia ha demostrado como pacientes con edad superior a 65 años tienen 2 veces más de riesgo de sufrir EAP, definida mediante la prueba de índice tobillo-brazo < 0,9, así como 2,5 veces más de riesgo de sufrir claudicación intermitente. En los pacientes diagnosticados de EAP, el riesgo de desarrollo de una ulceración isquémica aumenta en más de un 20% en 10 años, con una probabilidad 3 veces mayor el riesgo entre los diabéticos (101). Otra de las complicaciones comunes es el riesgo de ACV, que también es muy elevado en personas con DM. Respecto a los datos de riesgo de ACV se demostrado en un metaanálisis de 102 estudios prospectivos como el riesgo de ictus en pacientes con DM tenían 2,3 veces más de riesgo de sufrir un ictus isquémico y 1,6 veces más de riesgo de sufrir ictus hemorrágico que los que no eran diabéticos pero, además, tener DM está asociado con mayor discapacidad y/o dependencia funcional y mortalidad por estas causa (101).

Destacar que aproximadamente dos tercios de las muertes en personas con DM se deben a ECV, de las cuales un 40% aproximadamente son por CI, un 15% por otras formas de enfermedad cardíaca, principalmente insuficiencia cardíaca congestiva, y cerca del 10% de ACV (104). La causa más común de mortalidad en pacientes diabéticos, la mortalidad por ECV representa el 52% de las muertes en DM2 (101). Las personas diabéticas con riesgo de ECV requieren un manejo con tratamientos intensivos que incluyen un control glucémico estricto, la administración de fármacos que reducen la presión arterial, especialmente aquellos que su principio activo se dirige al sistema renina-angiotensina, terapia para reducir lípidos mediante estatinas y/o fibratos y antiagregantes plaquetarios, como aspirina (91).

#### **2.4.2.1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR y DM2**

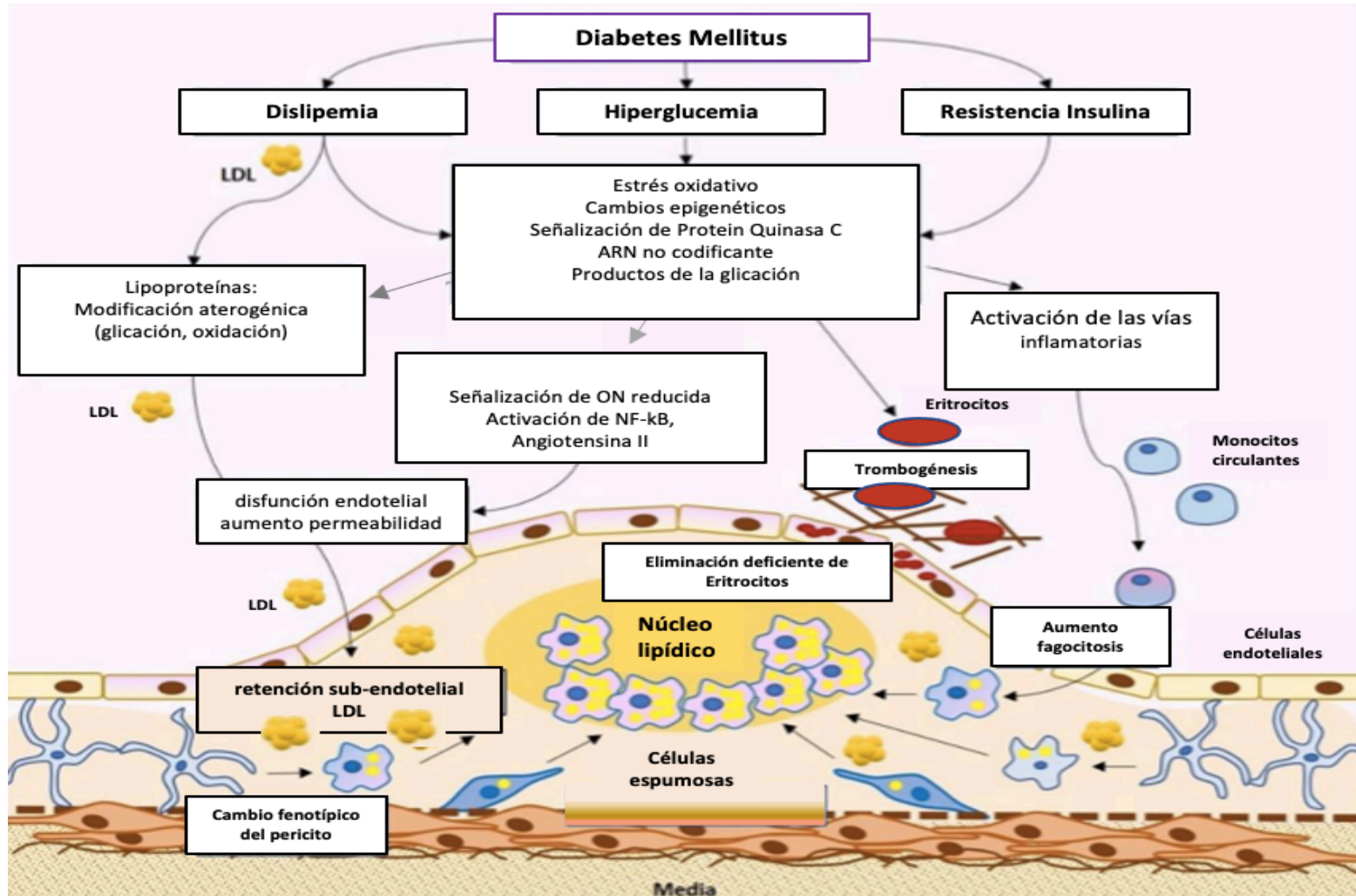
##### **2.4.2.1.1. Aterosclerosis y su relación con la DM2**

La aterosclerosis es un trastorno crónico inflamatorio y complejo de la pared arterial, donde se ven involucrados numerosos procesos celulares y que, en última instancia, conducen al acúmulo de lípidos, (**Figura 12**). Cuando la aterosclerosis está en fase muy avanzada, se manifiesta como lesión de la capa íntima de la pared arterial y acumulación de placas de ateroma que reducen o bloquean la luz de la arterial, limitando de ese modo el paso de sangre y provocando isquemia de la zona mal irrigada junto a cambios metabólicos en dichos tejidos (105). Estas placas ateroscleróticas complejas pueden desestabilizarse y romperse, dando lugar a un IM, angina inestable o ACV (106).

Se desconoce la causa que inicia el proceso, sin embargo, parece ser que la disfunción dentro del endotelio es un factor inicial relevante, donde se genera la disfunción del endotelio por factores como tabaquismo o la obesidad, entre otras causas (105). Además, el endotelio es esencial en el mantenimiento de la homeostasis vascular, asegurando que se mantenga un equilibrio entre los factores vasoactivos que controlan su permeabilidad, adhesividad e integridad como la angiotensina II y el óxido nítrico. En la DM2 se ha observado una disfunción endotelial conduce a la aterogénesis, generada por una respuesta inmunitaria de células del sistema inmunológico circulantes, incluidos los macrófagos y las células T, que se unen a los vasos provocando señalización para resto de células inmunitarias (91). Los monocitos circulantes se adhieren a la zona lesionada de la pared arterial y penetran en su interior. A su vez, los macrófagos captan lípidos, principalmente c-LDL mediante fagocitosis, generando células espumosas y vetas grasas, y contribuyen a la producción de mediadores de inflamación (105). Este fenómeno se da, en mayor medida, cuando las partículas LDL están oxidadas

o han sido sometidas a un proceso de glicación, a consecuencia de la hiperglucemia característica de la DM2. En último lugar, la proliferación de las células del músculo liso y la deposición de la matriz asociada con frecuencia a una necrosis, dan como resultado la formación de una placa aterosclerótica compleja, la cual puede ocluir el vaso sanguíneo en el que se encuentre o desprenderse y alcanzar la circulación cerebral, provocando así un ACV (91).

Figura 12. Factores involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis en la diabetes mellitus.



Adaptada de Poznyak (105).

#### **2.4.2.1.2. Patogenia de la ECV en la DM2**

El desarrollo de ECV está íntimamente ligado con la presencia de DM2, así como de los FR que suelen acompañar a esta patología. La obesidad juega un papel fundamental en este fenómeno, proporcionando un vínculo muy importante entre la DM2 y la ECV, ya que el exceso de grasa corporal conduce a alteraciones en el metabolismo de los lípidos, desregulación de ejes hormonales, estrés oxidativo, inflamación sistémica y distribución de la grasa ectópica. La unión de AGL al receptor tipo Tol activa el factor nuclear NF- $\kappa$ B, que desencadena la transcripción de moléculas inflamatorias, contribuyendo a la RI y al desarrollo de aterosclerosis acelerado, lo que sugiere un importante papel de NF- $\kappa$ B en el desarrollo de ECV. Además, el desarrollo de la RI tiene efectos aterogénicos promoviendo el desarrollo de dislipemias aterogénicas caracterizadas por alto niveles de TG, lipoproteínas remanentes, apolipoproteína B y c-LDL y bajos niveles de c-HDL. Simultáneamente a los cambios ateroscleróticos que se producen, la trombosis también está asociado con un estado de RI, generando una situación protrombótica y un aumento de los eventos coronarios principalmente. Este hecho se debe a las alteraciones de la homeostasis vascular por disfunción endotelial y las células musculares lisas que favorecen un estado proinflamatorio-trombótico que finalmente conduce a la aterotrombosis (107). Además, el mal funcionamiento de la insulina en un estado de RI provoca la acumulación de calcio en las plaquetas, favoreciendo así la agregación plaquetaria cuyo resultado final es un mayor desarrollo de ECV causada por la calcificación de la placa de ateroma (101).

La hiperglucemia, característica común en todas personas con DM, también es una de las causas del aumento del riesgo de evento cardiovascular por sí sola, ya que está establecido que por cada 1% que aumenta la HbA1c, aumenta entre 11-16 % el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares (104). El desencadenante inicial, cuando existen niveles elevados de glucosa, es el desequilibrio entre la biodisponibilidad y la acumulación de ERO2 en las mitocondrias que provocan la disfunción endotelial. Además, el aumento de la producción de ERO2 contribuye a la ECV, ya que desencadena la activación de la Proteín Kinasa C, provocando la alteración de la homeostasis vascular y predisposición a complicaciones vasculares.



### **3. MANEJO TERAPÉUTICO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2**

En las últimas décadas, el tratamiento de la DM2 ha mejorado en calidad y cantidad debido a la notable mejora de los enfoques farmacológicos, permitiendo disponer de un amplio abanico de pautas terapéuticas. La última guía de tratamiento de la ADA del 2022 para la DM2 incluye criterios específicos relacionados con la eficacia esperada de la terapia, los posibles efectos secundarios, el coste y los efectos sobre el peso corporal, además de ciertos factores individuales como el RCV, las complicaciones microvasculares y las preferencias del paciente (108, 109).

Además, un estilo de vida poco saludable contribuye claramente al desarrollo de la DM. Por tanto, la adquisición de unos hábitos de vida adecuados constituyen el tratamiento de primera línea en el manejo de esta patología, siendo igualmente importante aunque se inicie terapia farmacológica. La intervención del estilo de vida incluye un nivel adecuado de actividad física, dieta saludable y el abandono del hábito tabáquico (110). Los cambios adecuados en el estilo de vida tienen efectos beneficiosos sobre la reducción de parámetros antropométricos como el peso corporal, el IMC, la circunferencia de la cintura así como los parámetros sanguíneos relacionados con los perfiles de lípidos y glucosa (111). Desafortunadamente, en muchas ocasiones la dieta y el ejercicio no siempre son eficaces para conseguir un buen control metabólico, debido a una eficacia insuficiente, a la dificultad de una adecuada adherencia o la realización de las pautas correctas, lo que implica la necesidad de instaurar un programa de tratamiento farmacológico para obtener un control glucémico adecuado (112).

Actualmente, las opciones del tratamiento farmacológico de la DM2 son muy amplias, puesto que han aumentado gracias al conocimiento reciente de nuevos mecanismos fisiopatológicos. El objetivo del tratamiento, además de conseguir minimizar los defectos de los mecanismos que producen la DM2, debe estar centrado en los factores subyacentes del paciente e ir más allá de un control glucémico o reducción del RCV. El consenso unánime de sociedades científicas es plantear un enfoque gradual y progresivo del tratamiento farmacológico, donde las intervenciones sobre cambios del estilo de vida, incluida la dieta y la realización de actividad física, sean el pilar principal del manejo de la DM2. Se recomienda iniciar monoterapia generalmente con metformina junto con intervenciones del estilo de vida. Sin embargo, es importante individualizar la prescripción del tratamiento farmacológico. La individualización farmacológica depende de los objetivos de HbA1c específicos del paciente como el efecto sobre el peso corporal, la tolerabilidad y seguridad del fármaco, además de las comorbilidades y posibles efectos adversos que pueda generar la terapia, como por ejemplo hipoglucemia, entre otros factores (113)

### 3.1 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA DM2

Los principales de agentes antidiabéticos son:

#### 3.1.1. BIGUANIDAS: METFORMINA

La metformina es el fármaco de primera elección para el tratamiento de la DM2, excepto cuando esté contraindicado o no se tolere. El mecanismo que produce la metformina consiste en suprimir la producción de glucosa hepática y mejorar la sensibilidad a la insulina (114). Está demostrado que es un fármaco seguro y eficaz, además de ser un fármaco de bajo coste e incluso reduce el riesgo de eventos cardiovasculares y la mortalidad (113, 115). Entre sus efectos beneficiosos, además de mejorar el control glucémico, mejora la disfunción endotelial, la hemostasia, el estrés oxidativo, la RI, los perfiles de lípidos y la redistribución de la grasa corporal (113, 116). Su principal ventaja es el bajo riesgo de producir hipoglucemia y la posibilidad de ser administrado con cualquier otro fármaco hipoglucemiante de los que se disponen actualmente, como sulfonilureas, las tiazolidinedionas, los Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) y los inhibidores co-transportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT-2). Sus efectos secundarios provocan alteraciones gastrointestinales a causa de hinchazón, malestar abdominal y diarrea que parece aliviarse o reducirse, cuando el aumento de la dosis es gradual y progresivo, y una fórmula de liberación prolongada. Sin embargo, estos efectos secundarios han hecho que sea la terapia oral antidiabética con peor cumplimiento.

#### 3.1.2. OTROS ANTIDIABÉTICOS ORALES: SULFONILUREAS Y TIAZOLIDINEDIONAS

Las sulfonilureas y tiazolidinedionas o glitazonas son una alternativa a la metformina en monoterapia o una opción para la terapia dual o triple (113). Las sulfonilureas son secretagogos, es decir estimulan la secreción de insulina del páncreas al unirse al receptor en el canal de K<sup>+</sup> dependiente de ATP en la membrana de la célula  $\beta$  (117), lo que en muchos casos lleva a un agotamiento precoz de ésta.

Las glitazonas modulan la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico en hígado, músculo y tejido adiposo promoviendo así la sensibilidad a la insulina en estos tejidos (113).

Estos dos fármacos tienen importantes efectos secundarios, por lo que no se consideran el tratamiento antidiabético de elección. Las sulfonilureas tienen alto riesgo de producir hipoglucemia y la glitazonas favorecen insuficiencia cardiaca, además que ambos fármacos favorecen el aumento de peso. Sin embargo, las sulfonilureas y glitazonas, según datos mostrados en los ensayos clínicos producen buen control glucémico, con reducciones importantes de HbA1c (113, 118).

### **3.1.3. AGONISTAS DEL PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGÓN TIPO 1 (GLP-1)**

Los agonistas de GLP-1 es una hormona incretina liberada en el intestino tras la ingestión y dependiente de la concentración de glucosa. La estimulación del receptor de GLP-1 favorece la liberación de insulina y disminuye la secreción de glucagón en el páncreas, y además, produce retraso del vaciamiento gástrico ayudando este efecto a la supresión del apetito (119).

Los agonistas del receptor de GLP-1 son análogos sintéticos de GLP-1 humano natural pero con propiedades farmacocinéticas mejoradas y perfiles farmacodinámicos más estables que el compuesto biológico (120). Los agonistas del receptor del GLP-1 se asocian con un riesgo bajo de hipoglucemia, excepto si se usan con insulina o sulfonilureas. Además, según diferentes ensayos clínicos donde se administran en combinación con otros antidiabéticos orales se observaron reducciones en la HbA1c que oscilaron hasta el 1,9%, logrando incluso reducciones en los niveles de glucosa plasmática en ayunas y postprandial, resultado del retraso en vaciamiento gástrico (113, 121). Los trastornos gastrointestinales son los eventos adversos más frecuentes de estos fármacos, como náuseas o molestias gástricas severas, pero se ha observado que estos efectos adversos tienden a disminuir a medida que avanza el tratamiento.

### **3.1.4. INHIBIDORES DEL CO-TRANSPORTADOR DE SODIO-GLUCOSA TIPO 2 (SGLT-2)**

Los inhibidores de SGLT2 actúan sobre la función del riñón promoviendo la excreción urinaria de glucosa, para disminuir la hiperglucemia (122). En condiciones normales, el riñón reabsorbe casi toda la glucosa filtrada, y prácticamente no se excreta glucosa en la orina. La reabsorción de glucosa renal se produce en el túbulo proximal, principalmente por la proteína transportadora de glucosa y, en menor medida, por el cotransportador de glucosa y sodio. Las personas con DM2 presentan un aumento de la expresión de SGLT2, lo que provoca el aumento de la reabsorción de glucosa y tiene como resultado el mantenimiento de los niveles elevados de glucosa en sangre (122). Por tanto, la inhibición de SGLT2 reduce la capacidad renal de reabsorción de glucosa en un 30-50%, favoreciendo la glucosuria (123). El mecanismo de acción es no dependiente de insulina, por lo que los inhibidores de SGLT2 pueden ser utilizados en combinación con cualquier clase de agente hipoglucemiante y en cualquier estadio de la enfermedad y tienen un bajo riesgo de producir hipoglucemia, a menos que se tomen en combinación con insulina o sulfonilureas (122).

Uno de los efectos secundarios que tienen estos inhibidores de SGLT2 por el aumento de la excreción de glucosa en la orina, es mayor riesgo de infección micótica genital, sobre todo, en mujeres. Además, provoca eventos adversos relacionados con la volemia, debido a diuresis osmótica y la

reducción del volumen intravascular como hipotensión ortostática y mareos posturales, en pacientes susceptibles como son ancianos, personas con insuficiencia renal, presión arterial sistólica baja en tratamiento con diuréticos. Por tanto, se debe evaluar el estado del volumen y corregir la hipovolemia en estos individuos a riesgo o en situaciones donde la ingesta oral sea reducida o haya excesivas pérdidas de líquidos (103, 124).

### **3.1.5. INHIBIDORES DE LA DIPEPTIDIL PEPTIDASA-4 (DPP-4)**

Los inhibidores de DPP-4 disminuyen la degradación enzimática de las hormonas incretinas (GLP-1 y GIP) al reducir la actividad de la DPP-4 sérica en un 80%. Este efecto produce una mayor disponibilidad de incretinas endógenas, estimulando la secreción de insulina de las células  $\beta$  e inhibiendo la liberación de glucagón de las células  $\alpha$  pancreáticas de una manera dependiente de la glucosa (125). Estos agentes pueden usarse como monoterapia o terapia de combinación, y están disponibles como combinaciones de píldora única con metformina o metformina de liberación prolongada o en combinación con una tiazolidinediona (113).

Según un metaanálisis, los inhibidores de DPP-4 se asociaron con reducciones significativas desde el inicio en la HbA1c, y otro metaanálisis informó disminuciones moderadas en la presión arterial sistólica y diastólica en comparación con placebo o sin tratamiento (121, 126). Sin embargo, los ensayos clínicos no han demostrado ningún efecto sobre el peso corporal ni sobre la reducción de eventos cardiovasculares. La amplia experiencia clínica con los inhibidores de la DPP-4 ha demostrado ser seguros, tolerados y con un bajo riesgo de hipoglucemia, excepto si se usan en combinación con insulina o sulfonilureas. Como efectos adversos se ha observado con cierta frecuencia nasofaringitis y reacciones de hipersensibilidad, incluso artralgias graves e incapacitantes o pancreatitis por lo que, en estos casos, sería necesario su suspensión (113).

### **3.1.6. INSULINA**

La insulina es el agente hipoglucemiante más potente recomendado cuando se mantienen niveles elevados de HbA1c a pesar del tratamiento con otro agente hipoglucídico en monoterapia o terapias combinadas. El inicio de la terapia con insulina debe ser progresiva y tiene ciertas limitaciones como la auto-inyección por el paciente, un conocimiento limitado sobre las nuevas formulaciones de insulina o disponer de tiempo limitado para la educación al paciente (113, 127). La decisión de añadir insulina además de estar centrada en objetivos glucémicos y la sintomatología, debe ser una decisión consensuada entre el médico y el paciente, donde es necesario tener en cuenta aspectos como la

motivación, los factores individuales del paciente, la edad, el riesgo de hipoglucemia y las complicaciones cardio-renales existentes, entre otros (109, 128). La educación integral con respecto a la automonitorización de la medición de la glucosa en sangre y la dieta, así como la prevención y tratamiento adecuado de la hipoglucemia, son de vital importancia en cualquier paciente al cual se le pauten la administración de insulina (128).

La ADA recomienda agregar insulina inyectable en monoterapia o en terapia dual inicial si la HbA1c > 9% (118). Sin embargo, la American Association of Clinical Endocrinology recomienda comenzar la terapia inicial de insulina basal, en combinación con metformina u otros agentes hipoglucemiantes, cuando la HbA1c sea superior al 9% y existan síntomas de hiperglucemia (118). En general, la recomendación global es el uso de insulina basal en pacientes con DM2 que ya lleven dos fármacos hipoglucemiantes orales y, a pesar de ello, presenten una HbA1c > 8%, o en casos de DM de larga evolución. En los pacientes con DM2 recién diagnosticada, la ADA sugiere iniciar una terapia inyectable combinada, que incluye insulina basal junto insulina postprandial y dependerá de niveles de glucosa postprandial, o la combinación de insulina basal más un agonista del receptor GLP-1 o en pacientes con HbA1c > 10% una insulina premezclada (128). En comparación con otras terapias, la combinación con insulina tiene un riesgo elevado de hipoglucemia, sobre todo en pautas que incluyen insulina postprandial. El control frecuente de los niveles de glucosa en sangre en pacientes que reciben múltiples inyecciones diarias de insulina ayuda a guiar las decisiones del médico y del paciente con respecto a la dosificación y posología de la insulina inyectable (128).

## **3.2. INTERVENCIONES DEL ESTILO DE VIDA**

### **3.2.1 INFLUENCIA DE LA DIETA Y FACTORES DIETÉTICOS SOBRE LA DM2**

#### **3.2.1.1. INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LA DM2**

La DM2 y obesidad así como las ECV, los ACV y enfermedades vasculares, son la principal causa de morbilidad y mortalidad, así como la pérdida de años de vida por la carga de discapacidad que producen a nivel mundial (129). En 2011, la OMS estableció que una dieta de mala calidad es uno de los principales factores causantes de estas enfermedades (130-132). A consecuencia del gran impacto socio-sanitario y económico a nivel mundial que producen estas enfermedades cardiometabólicas, la investigación de los últimos años se ha focalizado en la identificación de los factores dietéticos como una de las prioridades científicas y de salud pública (131). Gracias al análisis del impacto de la dieta sobre el desarrollo de enfermedades crónicas, se ha demostrado como los hábitos dietéticos son uno de los pilares fundamentales para la prevención pero también en la progresión de estas enfermedades y el aumento el riesgo cardiometabólico como sucede con factores dietéticos como el sodio o bebidas endulzadas con azúcar (133).

En concreto para la DM2, los mecanismos fisiopatológicos no se conocen completamente, se sabe que las personas con sobrepeso u obesidad, dietas poco saludables, sedentarismo y antecedentes familiares de DM, tienen un riesgo elevado de desarrollo de DM2 (38). Es por ello que en los últimos años, los nuevos enfoques terapéuticos a través del estudio del comportamiento del estilo de vida mediante cambios de dietas poco saludables y la promoción de mejores patrones dietéticos, se ha asociado con una disminución de la incidencia de la DM2, posiblemente por los beneficios que producen estos patrones saludables (134). En este sentido, diferentes estudios han demostrado una reducción del 9 al 20% en el riesgo de DM2 e incluso se ha observado que este efecto se mantiene a largo plazo, a pesar del cese del asesoramiento individual sobre el estilo de vida (108, 135).

A la epidemia de obesidad y DM2 se han atribuido como una de las causas los cambios de hábitos nutricionales actuales, así como las nuevas tendencias alimentarias y socioeconómicas a nivel mundial. Factores como los cambios en la urbanización de las ciudades, cambios en los patrones activos de trabajo con ocupaciones más sedentarias informatizadas o mecanizadas, así como la mejora del transporte han influido en la progresión de esta epidemia. Además el crecimiento económico y los cambios producidos sobre el estilo de vida, han generado cambios importantes sobre los sistemas de producción, procesamiento y con ello, un aumento de la accesibilidad de alimentos no saludables (136).

Incluso el aumento y disponibilidad de comida rápida o ultraprocesada en las últimas décadas, ha contribuido al establecimiento de dietas poco saludables con elevado contenido calórico, grandes proporciones de comida y elevado consumo de HC refinados, bebidas azucaradas, grasas no saludables y grandes cantidades de sodio (137). Además, las bebidas azucaradas son la mayor fuente de azúcar agregada en la dieta, incluyendo refrescos carbonatados y no carbonatados, bebidas a base de frutas y bebidas deportivas, que contienen exceso de calorías con baja calidad nutricional.

Hasta el momento, una gran cantidad de evidencia respalda la relación directa entre la ingesta de bebidas azucaradas y el aumento de peso y el riesgo de desarrollo DM2, habiéndose establecido, incluso como un FRCV independiente (138). En segundo lugar, existe una sólida evidencia del aumento de la incidencia de DM2 así como del aumento de riesgo cardiometabólico, que producen las dietas modernas y poco saludables, con predominio de consumo de carnes rojas y carnes procesadas, ingesta elevada de sodio, grasas saturadas y bebidas azucaradas, junto a un consumo reducido de cereales integrales, lácteos, frutos secos y fibra dietética (129, 139). Por el contrario, se ha demostrado que un elevado consumo de cereales integrales, fibra dietética y grasas insaturadas, así como ciertos micronutrientes como vitamina D, calcio, zinc muestran efecto protector. Además el consumo de ciertos alimentos específicos como el café o el té, la leche y productos lácteos bajos en grasa, el consumo moderado de alcohol se asocian con positivamente con la prevención y disminución de la incidencia de DM2 (135, 140, 141). Por tanto, los factores modificables, especialmente aquellos que conforman el estilo de vida incluida la dieta, contribuyen de manera muy importante en la aparición y progresión de la DM2, y por ello, priorizar intervenciones para modificar y mejorar el estilo de vida esta demostrado que reducen el riesgo y desarrollo de DM2 (109, 139).

Según las recomendaciones de la ADA 2022 (109), la terapia nutricional para adultos con DM debe enfocarse en promover patrones de alimentación saludables basados en nutrientes clave, variados, seleccionados e integrados en la cantidad adecuada, que permitan mantener un peso saludable y alcanzar niveles óptimos de HbA1c, presión arterial y perfil lipídico. La ADA enfatiza en la importancia de proporcionar las herramientas necesarias para que los pacientes puedan establecer patrones de alimentación saludables por sí mismos, en lugar de hablar de alimentos únicos o micro y macronutrientes (109). Los patrones dietéticos estudiados que aportan mayores beneficios sobre DM, son principalmente la dieta DASH y la dieta mediterránea (DMed) (142), reduciendo ambas el riesgo de DM2. El motivo de esta reducción del riesgo puede deberse a los componentes comunes que comparten estos dos tipos de dietas, como es el uso de aceite de oliva, cereales integrales, frutas y vegetales, legumbres y alimentos ricos en proteína, como carne blancas y mariscos, un consumo moderado de

alcohol y reducción de carnes rojas y procesadas así como bebidas azucaradas (143). En concreto, la dieta DASH se prescribe para la reducir la presión arterial pero ha demostrado efectos beneficiosos en diferentes estudios y ensayos aleatorizados sobre el control glucémico, el c-HDL y c-LDL, la presión arterial y los biomarcadores inflamatorios (144).

### **3.2.1.2. RECOMENDACIONES DE MACRONUTRIENTES EN LA DM2.**

La evidencia indica que no existe una distribución ideal de la distribución calórica de los macronutrientes (HC, proteínas y grasa), tanto en la prevención como en el manejo de la DM. Por lo tanto, la composición de los macronutrientes de la dieta dependerá de la evaluación individualizada de la alimentación actual, preferencias, y objetivos metabólicos (perfil lipídico y glucémico) incluyendo la actividad física, las preferencias alimentarias y la disponibilidad de alimentos (145).

#### **3.2.1.2.1. Carbohidratos (HC)**

En cuanto a los HC, se debe tener en cuenta que son fuente esencial de aporte energético para el organismo y que su consumo tiene una gran influencia sobre la glucosa sanguínea posprandial, que se ha asociado con la prevención y el manejo de la DM2 (146). Es por ello que las principales recomendaciones al respecto hacen hincapié en el consumo de alimentos con HC de calidad, ricos en fibra, vitaminas y minerales, con reducido contenido en azúcares añadidos, matriz sólida y poco procesados. Además la cantidad de HC necesarios para una salud óptima es desconocido, aunque la recomendación dietética en adultos sin DM mayores de 19 años es de 130 g/día. Esta cantidad ha sido determinada en cierta medida por la cantidad de glucosa necesaria para una correcta función cerebral, aunque situaciones donde las ingestas de HC sean menores, a través de los mecanismos metabólicos como glucogenólisis, gluconeogénesis se podrían cubrir las necesidades. El consumo de fibra dietética es esencial en personas con DM, según la recomendación efectuada por la Dietary Guidelines for Americans 2015-2020, habiéndose establecido una ingesta de > 15 g de fibra por cada 1000 Kilocalorías, con al menos la mitad en forma de cereales con grano entero sin procesar. Algunas de las fuentes de fibra recomendadas son verduras sin almidones, aguacates, frutas, y bayas, así como legumbres como frijoles o judías, guisantes y lentejas. El consumo de elevadas cantidades de fibra de hasta 50 g/día, ha demostrado beneficios sobre la reducción de HbA1c, pero existe la desventaja de la aparición de efectos secundarios como diarrea, flatulencias e hinchazón. A pesar de ello, se anima a conseguir dicha recomendación por los beneficios adicionales que produce el consumo de estos alimentos ya que,



además, asocian un elevado contenido en fitoquímicos y micronutrientes, y a su vez, favorece la reducción en el peso, control glucémico, entre otros (145).

#### **3.2.1.2.2. Proteínas**

Respecto a la proporción de proteínas en personas con DM2, no existe una proporción específica ni diferente que para población general. Aunque es necesaria más evidencia al respecto, existen estudios de intervención y diferentes metaanálisis, donde se ha comparado diferentes proporciones de proteína, por ejemplo 15-30 % valor total de la dieta en forma de proteína, y se observó como una ingesta superior de este macronutriente mejoró el peso corporal, los niveles de glucosa e insulina en ayunas (147). Es por ello que la ADA hace hincapié, en sus recomendaciones, el incrementar el consumo de proteína por su efecto estimulador de la insulina, excepto en el caso de personas con enfermedad renal diabética (con albuminuria y/o reducción de la filtración glomerular que deberá mantenerse la cantidad de 0,8 g/kg peso por día (148).

#### **3.2.1.2.3. Grasas**

En el caso de las grasas, parece ser que una distribución aceptable de grasa total para cualquier adulto, incluidos pacientes con DM, estaría entre el 20-35 % del valor calórico total diario. Sin embargo, ciertos patrones de alimentación que remplazan ciertos alimentos con HC con aumento de la grasa han demostrado mayores mejoras en la glucemia y ciertos FRCV como el c-HDL y TG, en comparación con dietas bajas en grasas. Pero la evidencia apunta a que, más allá de la cantidad, es más importante el tipo y calidad de la grasa, en su influencia sobre las ECV (149). Además, es importante reducir la ingesta de grasas sintéticas tipo trans, mientras que grandes estudios epidemiológicos han encontrado que el consumo de grasas poliinsaturadas, especialmente los ácido graso omega-3, están asociados con un menor riesgo de DM2. La suplementación con estos ácidos grasos en prediabetes ha demostrado cierta eficacia sobre la mejora de los niveles séricos de TG, de glucemia, la capacidad de secreción de insulina y la función endotelial (145).

### **3.2.1.3. OTRAS RECOMENDACIONES DIETÉTICAS EN LA DM2**

#### **3.2.1.3.1. El consumo de alcohol en la DM2**

El consumo elevado y constante de alcohol puede resultar perjudicial el manejo terapéutico de un paciente con DM2 (150). Sin embargo, diferentes estudios epidemiológicos relacionan la ingesta moderada de alcohol hasta 1 bebida/día en mujeres (15g alcohol/día) y hasta 2 bebidas/día en hombres

(30g alcohol/día) con efectos beneficiosos a nivel cardiovascular e incluso un menor riesgo de padecer DM2 (151). Este hecho ha sido atribuido al consumo regular de bebidas fermentadas, como vino o cerveza, dentro de un estilo de vida saludable y sin contraindicaciones específicas (151).

La cerveza es una bebida resultante de la fermentación alcohólica que contiene malta de cereal y lúpulo. Está compuesta por más de un 90% de agua, HC y alcohol. Es producto que procede de la fermentación de cereales, y por tanto aporta vitaminas del complejo B, sobre todo folato y colina así como pequeñas cantidades de minerales, como el potasio, fósforo, magnesio y calcio (151, 152). Cabe destacar su importante aporte de diferentes polifenoles, como flavonoides y ácidos fenólicos, responsables del sabor, aroma, astringencia y turbidez característicos de la cerveza. Estos compuestos bioactivos muestran diferentes actividades biológicas demostradas, como efecto antioxidante, antiinflamatorio, estrogénico y antiviral, por lo que se han asociado con acciones beneficiosas a nivel cardiovascular (151). Es importante dejar claro que los beneficios descritos asociados a bebidas como la cerveza o el vino, dependen del patrón de consumo regular y moderado, así como de las variaciones que puedan suceder en función de la edad, sexo, genética y uso de fármacos/suplementos (153).

En la DM2 el consumo de alcohol está limitado debido al elevado aporte en HC, principalmente maltosa y alcohol (152). Los HC de la cerveza, provienen principalmente de la maltosa y confieren un alto IG, en torno a 119. Un alto IG de los alimentos induce una elevada y rápida absorción de los mismo y, como resultado, una respuesta metabólica postprandial con efectos fisiológicos perjudiciales. Una alternativa adecuada sería la cerveza sin alcohol. La cerveza sin alcohol es una bebida no alcohólica que contiene los mismos componentes bioactivos que una cerveza habitual, con la única excepción del alcohol. En cuanto a la composición de los compuestos bioactivos potencialmente beneficiosos se mantienen a pesar del proceso de la eliminación del alcohol, al igual que se mantiene el alto IG. Si comparamos el IG que tiene una cerveza estándar con alcohol frente a una cerveza sin alcohol es de 119 y 80, respectivamente, por lo que sigue siendo un valor elevado.

Recientemente, un estudio de intervención realizado en sujetos con DM2 y sobrepeso u obesidad (152), estudió el efecto del consumo de una cerveza sin alcohol, en la que se sustituyó su composición habitual de HC por isomaltulosa y una dextrina resistente, en las dos principales comidas del día, demostrando una mejora de la RI, en comparación con una cerveza sin alcohol con composición estándar. Este hecho sugirió que una cerveza sin alcohol con composición modificada de los HC podría formar parte de una dieta saludable al mejorar el control de la glucemia. Los mecanismos responsables de este efecto pudieron incluir la modificación de la respuesta glucídica de los HC ingeridos en la comida junto con el consumo la cerveza sin alcohol, cambios producidos en la microbiota o un posible impacto

de esta cerveza sobre mecanismos metabólicos que regulan la saciedad o la respuesta insulínica a la ingesta, como las incretinas (152).

#### **3.2.1.3.2. El consumo de sodio en la DM2.**

Las ECV son la principal causa de morbilidad y mortalidad, especialmente en las personas con DM2 y donde la presión arterial es un FRCV modificable. La ingesta dietética de sodio juega un papel fundamental en la regulación de la presión arterial. En población general, consumir elevadas cantidades de sodio en la dieta es algo frecuente a nivel mundial siendo casi el doble de la ingesta recomendada diaria con el consecuente riesgo. Es por ello, que las recomendaciones establecidas por los organismos de salud limiten la ingesta de sodio, especialmente en población de alto RCV, como en el caso de pacientes con DM2. En este sentido, la ADA recomienda una ingesta máximo de sodio 2300 mg por día para personas con DM2 (148).

#### **3.2.1.4. PATRONES DIETÉTICOS**

Los patrones dietéticos representan el conjunto de alimentos consumidos habitualmente y, como la combinación de estos, provoca un efecto sinérgico sobre la salud que puede prevenir o reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad (131). Como alternativa al uso de un único nutriente, se utiliza el análisis de patrones dietéticos ya que permite conocer los efectos acumulativos que produce el conjunto total de la dieta. Los patrones dietéticos que se han demostrado tener efectos protectores sobre los factores de riesgo cardiometabólico se caracterizan por un consumo frecuente de alimentos mínimamente procesados, como frutas y verduras, semillas o nueces, legumbres, cereales o granos integrales, yogur y aceites vegetales (principalmente el aceite de oliva), y a su vez, un consumo limitado o restringido de cereales refinados, almidones o azúcares añadidos al alimento, menor consumo carnes rojas y carnes procesadas, por su elevado contenido en sodio y grasa añadidas. En resumen, los patrones saludables o protectores aportan cantidades elevadas de fibra dietética y micronutrientes como vitaminas y minerales y mayor proporción de grasas insaturadas. La combinación de estos componentes favorece una menor carga glucémica y menor ingesta de sal como de grasas saturadas y *trans* (131, 154).

Los patrones dietéticos mejor estudiados son la dieta mediterránea tradicional y la dieta para reducir la hipertensión, denominada DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*). La evidencia ha demostrado que la dieta DASH y DMed mejoran ciertos factores de riesgo cardiometabólicos, reducen el peso corporal a largo plazo y reducen el riesgo de complicaciones asociadas a estas patologías (131). Los mecanismos observados que mejoran con los patrones dietéticos DASH y DMed son los niveles de

presión arterial, la homeostasis de la glucosa-insulina, los niveles de lípidos y lipoproteínas plasmáticos, así como la inflamación y el microbioma intestinal, entre otros. En concreto, la dieta DASH promueve el consumo de frutas y verduras, los productos lácteos bajos en grasa y los cereales integrales y es utilizada como intervención dietética para reducir presión arterial y el riesgo de ECV (155). La DMed se caracteriza por elevado consumo de alimentos de origen vegetal, que producen elevado aporte de fibra dietética, así como ingesta moderada de consumo de carne, huevo y pescado, y el consumo de grasa con perfil mayoritario de grasas monoinsaturadas, y minoría de grasas saturadas. Los beneficios cardiometabólicos que aporta a la salud, así como la reducción de RCV entre otros, están más que demostrados por numerosos estudios epidemiológicos e intervenciones nutricionales. Además, se han estudiado otros patrones dietéticos como el vegetariano o vegano, el bajo en grasa o bajo en HC. Los estudios sobre la alimentación vegana o vegetariana parecen mostrar resultados mixtos sobre la glucemia y FRCV, pero con frecuencia se ha observado una mejora significativa en la pérdida de peso, circunferencia de cintura, c-LDL y colesterol no HDL, pero sin efecto significativo sobre insulina en ayunas, c-HDL, TG, y presión arterial (156). Algo similar sucede con los patrones bajos en grasa, cuyo beneficio principal está relacionado con la pérdida de peso. Sin embargo, el patrón dietético más estudiado en pacientes con DM2 es el patrón bajo en HC, más concretamente el muy bajo en HC, se ha demostrado que reduce la HbA1c, así como necesidad de fármacos antihiper glucémicas (145). Existe evidencia clara de cómo una buena adherencia a la DMed ayuda a proteger contra ECV, inflamatorias y metabólicas, incluso enfermedades degenerativas crónicas, demostrando su efecto protector. Por el contrario, los pacientes diabéticos, incluso obesos a su vez con un mal control glucémico tienen un grado de adherencia muy bajo a la DMed, lo que conlleva unos inconvenientes relevantes como es un mayor IMC, peor control glucémico así como parámetros bioquímicos anómalos, por ejemplo como mayores niveles de HbA1c, CT, c-LDL y TG lo que provoca un aumento riesgo de ECV (157). En consecuencia, además de fomentar la DMed como un patrón saludable en pacientes con DM2, es importante conseguir una buena adherencia a la misma.

### **3.2.1.5. INFLUENCIA DE LA DIETA MEDITERRÁNEA SOBRE LA DM2**

El patrón DMed engloba un conjunto de hábitos dietéticos que producen un efecto sinérgico y beneficioso para la salud, caracterizados por un alto consumo de aceite de oliva virgen extra como fuente principal de consumo de grasa, consumo significativo y habitual de verduras, legumbres, cereales, frutas y frutos secos, además del consumo moderado de aves, pescado y huevos y productos lácteos como queso y yogur, así como un consumo reducido de productos lácteos enteros y carnes rojas

y un consumo moderado de vino o cerveza como fuente principal del consumo de alcohol (38). Dentro de las recomendaciones de la ADA, la DMed se plantea como una alternativa eficaz a un patrón de alimentación con bajo contenido de grasas y alto contenido de HC para los pacientes con DM2, debido a los beneficios demostrados sobre el control glucémico y la reducción de los FRCV asociados a esta enfermedad (142).

Los beneficios que aporta a la salud la DMed están demostrados a través de numerosos estudios epidemiológicos e intervenciones e incluyen mejoras sobre el control glucémico y los FRCV (45, por medio de una mejora del IMC, la circunferencia de la cintura, los niveles de lípidos en sangre, la presión arterial y marcadores inflamatorios en sujetos con DM2 (135, 158). Los mecanismos que producen estos efectos beneficiosos parecen estar relacionados con los efectos indirectos asociados al control o reducción del peso, y a los efectos directos generados por el consumo de alimentos específicos característicos de este patrón dietético saludable, rico en nutrientes con beneficios para la salud, como son los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (AGM-AGP), antioxidantes, y un elevado consumo de fibra dietética o compuestos fenólicos, entre otros (159, 160). Está establecido que un peso corporal excesivo en particular asociado a un depósito de grasa abdominal, da lugar a la progresión de la RI, siendo uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de DM2. En esta línea, se ha observado en varios estudios epidemiológicos, la asociación entre la adherencia a una DMed y los índices antropométricos (38, 142).

Otro de los aspectos positivos es la combinación de alimentos y nutrientes específicos que aporta, como el alto consumo de frutas, verduras, legumbres, frutos secos, cereales integrales y aceite de oliva, que conduce a una elevada ingesta de fibra dietética y antioxidantes, así como el tipo de grasas que se consumen que aportan principalmente AGM y AGP favoreciendo a su vez, la baja ingesta de ácidos grasos saturados (AGS) y trans (159). Esta combinación y sinergia de los componentes que componen la DMed producen dos efectos claros, un efecto antiinflamatorio, la cual se ha asociado con una disminución de los biomarcadores de inflamación y altos niveles de adiponectina en sangre tanto en sujetos sanos como con DM2 (161); y un segundo efecto, producido por la alta ingesta de antioxidantes procedentes del importante consumo de alimentos vegetales, protegiendo del estrés oxidativo (142, 162). Por ejemplo el aceite de oliva virgen extra protege del estrés oxidativo al disminuir la activación de mediadores proinflamatorios y aumenta la biodisponibilidad del óxido nítrico con acción vasodilatadora en el endotelio (163). Además, al ser rico en polifenoles y AGP, tienen efecto en las respuestas antiinflamatorias del tejido adiposo, cuyo efecto positivo mejora la sensibilidad a la insulina, disminuye la glucemia posprandial con impacto beneficioso sobre el control glucémico (108,

163, 164).

Además, la alta variedad del consumo de frutas, verduras, cereales y legumbres que componen la DMed, hacen que el consumo de fibra dietética sea elevado. La fibra dietética se define como cualquier HC no digerible y lignina no degradada en el intestino grueso (165). Desde hace años se estudia la fibra dietética como uno de los tratamientos nutricionales de la DM2, debido a los beneficios metabólicos que produce su consumo, como reducción de la absorción de glucosa, disminución de absorción así como modificaciones en la microbiota, etc. Se cree que el efecto sinérgico de los compuestos fitoquímicos y las propiedades digestivas que aporta tanto la fibra dietética y los cereales integrales, esté detrás de los efectos beneficiosos en el tratamiento y la prevención de la obesidad y la DM, la reducción de las ECV y la disminución de la incidencia de ciertos tipos de cáncer (166). Recientemente, un metaanálisis concluyó que las dietas ricas en fibra, son un componente importante del control de la DM, ya que provoca mejoras en el control glucémico, en los lípidos en sangre, peso corporal e inflamación, así como en una reducción de la mortalidad prematura global como cardiovascular. Estos beneficios no se limitaban a ningún tipo de fibra, ni al tipo de DM, pero han mostrado como las mayores beneficios se producen sobre el control glucémico cuando se pasa de un bajo consumo a un consumo moderado-alto, especialmente aumentar el consumo de 15 a 35 gramos de fibra al día (167). Además, otro de los beneficios de la ingesta de altas cantidades de fibra dietética es el aumento de la saciedad postprandial o reducir la sensación de hambre, consiguiendo mayores reducciones de peso. Por último, el riesgo de desarrollo de ECV y complicaciones asociadas aumenta en sujetos con DM2. Varios estudios han evaluado los efectos beneficiosos de la DMed sobre el desarrollo de eventos CV y reducción del riesgo en sujetos con DM2, mostrando mejorías significativas sobre los FRCV tradicionales, como presión arterial sistólica, niveles de TG, la relación de CT, c-LDL y c-HDL, en sujetos que recibieron intervención de DMed en comparación con sujetos con una dieta control (135). Cabe destacar el estudio PREDIMED, un ensayo multicéntrico desarrollado en España, que incluyó participantes entre 55-80 años con alto RCV, pero sin ECV previa, teniendo aproximadamente la mitad de los participantes DM2. Los participantes fueron aleatorizados a una de tres dietas de intervención: una DMed suplementada con aceite de oliva virgen extra, una DMed suplementada con frutos secos o una dieta de control donde solo se daban consejos para reducir la ingesta de grasas en la dieta (168). Los resultados del estudio PREDIMED, mostraron que las dos DMed suplementadas con aceite de oliva y frutos secos, redujeron en un 29% los eventos CV y esta reducción fue similar en los sujetos con DM2 (135). Además, la incidencia del síndrome metabólico, DM, hipertensión y cáncer de mama se redujo significativamente

en las personas aleatorizadas al seguimiento de la DMed. Parece ser que una DMed con un aporte inferior del 50 % de HC del valor calórico diario de la dieta, donde el contenido de HC refinados sea bajo, alto contenido de fibra con un consumo moderado de grasas, principalmente con mayor aporte de AGM, y un contenido moderado a alto de verduras y proteínas, sería un patrón dietético completo (169). Todo ello junto a la adhesión de prácticas saludables, y comunicación global de la promoción de los estilos de vida saludables pueden retrasar el proceso de enfermedades crónicas, incluida la DM2 (135).

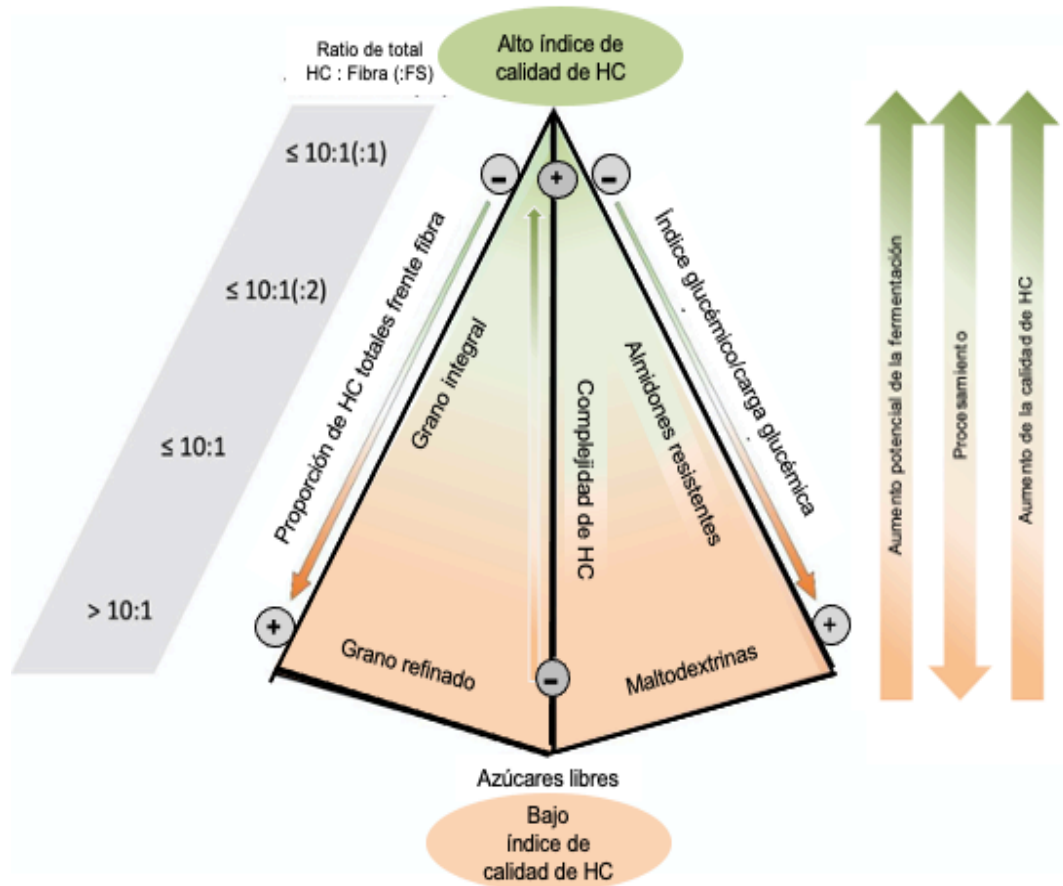
### 3.2.2. INFLUENCIA DE LOS CARBOHIDRATOS SOBRE EL METABOLISMO GLUCÍDICO Y SU ROL CON LAS ENFERMEDADES CARDIOMETABÓLICAS

Los HC son una parte esencial de nuestra dieta, junto con el resto de macronutrientes como grasas y proteínas, y contribuyen aproximadamente a la mitad del total de la ingesta calórica diaria (170), siendo su calidad el factor principal que determina sus consecuencias metabólicas. La calidad está determinada por diversos factores como su digestibilidad, la tasa de absorción, IG del HC, el nivel de procesado, la presencia de grano entero o la matriz alimentaria completa, entre otros (171) (**Figura 13**).

A partir de la década de los 50, se empezó a tomar conciencia de la causalidad del azúcar, especialmente la sacarosa, con el aumento riesgo de caries dentales. Pero no fue hasta la década de los años 60, cuando los azúcares simples fueron considerados una de las principales causas de obesidad, DM2 y ECV (172). Diferentes estudios han demostrado que alimentos con HC de mala calidad, en concreto aquellos ricos en almidones y azúcares refinados, ultraprocesados y alimentos con bajo contenido en fibra, promueven de manera clara el aumento de peso a largo plazo, contribuyendo a la epidemia de obesidad y DM2, mientras que aquellos alimentos con HC de alta calidad como son frutas, verduras ricas en fibra y sin almidones, legumbres y cereales integrales, reducen el aumento de peso a largo plazo y reducen el riesgo de estos trastornos metabólicos y sus implicaciones sobre la salud cardiometabólica (173-175). Los HC que se suelen consumir en la actualidad son muy diferentes a los consumidos antes del inicio del siglo XX, ya que son HC altamente refinados. El proceso de refinado ha modificado la composición y la calidad de los mismos. El refinado aumenta la densidad calórica en un 10% y elimina nutrientes importantes como vitaminas y minerales, reduce el contenido en fibra dietética en un 80%, pero también reduce la proporción de proteínas aproximadamente en un 30% (176). Este tipo de alimentos ricos en HC refinados parece ser la causa que altera y modifica los mecanismos fisiológicos como la saciedad, respuestas de glucosa-insulina, síntesis de grasa hepática, función de los adipocitos, el microbioma e incluso el gasto metabólico. Por tanto, según la evidencia actual, no es tan importante la cantidad o la distribución de macronutrientes (HC, grasas y proteínas) en la dieta como la calidad de los alimentos consumidos, con especial relevancia a la calidad de los HC (174, 175). Una dieta con alto contenido en HC refinados y de mala calidad se caracteriza por tener elevada carga glucémica (CG) e IG, con una rápida digestibilidad y absorción de los HC, induciendo respuestas metabólicas bruscas y exageradas (166), y está asociada con un mayor riesgo de trastornos metabólicos (177-179). En el caso de la DM2, los factores que entran en juego en su desarrollo son varios, pero destacan los factores dietéticos como uno de los principales elementos de desarrollo de esta patología, principalmente la ingesta de HC de mala calidad (179)



Figura 13. Componentes de la calidad de los carbohidratos de la dieta



Adaptada de Seal (180). Los alimentos ricos en HC con mayor proporción en almidones de digestión lenta, almidón resistente, oligosacáridos con potencial prebiótico y fibra dietética se consideran HC de mayor calidad. Por el contrario, los alimentos ricos en HC con alto contenido de azúcares libres, alto IG y elevada CG tienen una calidad inferior. A los alimentos se les puede otorgar un índice general de calidad de HC, donde la proporción óptima de HC totales versus fibra dietética debe ser  $\leq 10:1$ . Los alimentos pueden mejorarse reduciendo el contenido de azúcares libres en relación con el contenido de fibra. Las tecnologías de procesamiento pueden tener impactos tanto positivos como negativos en la calidad de los HC.

Aunque no existe un consenso de cuál es la proporción específica de HC en la dieta, las recomendaciones dietéticas para reducción del riesgo de obesidad y DM2 según ADA (109), se orientan sobre todo hacia la pérdida de peso a través de déficits energéticos (177-179) y consumir alimentos con IG bajo (171, 181), ya que mejoran el control de glucémico global al reducir los niveles de glucosa en sangre en ayunas, Hb1Ac y péptido C urinario, pero también se regula el peso corporal y promueve el control del apetito (181-185). En esta línea, la evidencia ha demostrado como las dietas con alto IG se asocian con un aumento del riesgo desarrollo de DM2, ECV y de la mortalidad (186, 187). El riesgo de DM2 en los individuos con dietas con alta CG y menor consumo de fibra es 2,5 veces mayor que aquellos sujetos con la dieta con mayor cantidad de fibra y una CG más baja (188). También, un reciente metaanálisis (172) demostró la posible relación causal entre la dosis-respuesta de ingestas elevadas de fibra con la reducción de incidencia de enfermedades no transmisibles como la DM, así como de la mortalidad por todas causas (172, 188). Además, en EEUU se ha demostrado la asociación entre el consumo de HC refinados, como el jarabe de maíz, con la obesidad y DM2 (176).

### **3.2.2.1. TIPOS DE CARBOHIDRATOS**

Los HC de la dieta, tras ser digeridos, proporcionan fundamentalmente moléculas de glucosa, además de pequeñas cantidades de fructosa y galactosa como sustrato energético. Fisiológicamente, todos los azúcares absorbidos de la dieta, se transforman en el hígado en intermediarios del metabolismo de la glucosa, único HC circulante. Cuando la glucosa circulante no satisface las necesidades energéticas, el organismo puede sintetizar glucosa a través de otros compuestos como otros azúcares o aminoácidos. Para clasificar o definir los tipos de HC existentes, existen varias formas.

Desde una visión más simple, los HC se pueden separar en dos grupos básicos en función de su digestibilidad en el tracto gastrointestinal. El primer grupo definido como HC no estructurales, polisacáridos no fibrosos o HC simples, entre ellos se encuentran los azúcares simples como glucosa, lactosa, sacarosa, fructosa, etc, y se hidrolizan mediante reacciones enzimáticas y son absorbidos en el intestino delgado. El segundo grupo, denominados HC complejos, formados por cadenas largas de glucosas pero en este grupo también se encuentran los HC estructurales como la celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y betaglucanos, que son resistentes a la digestión en el intestino delgado y producen fermentación bacteriana ubicada en el intestino grueso (166).

La digestibilidad o efecto nutricional de un HC depende del tipo de enlace que contiene la molécula. Los HC con enlaces  $\alpha$  presentes en HC formados por cadenas de glucosas se rompen fácilmente en el proceso de la digestión en monosacáridos aportando energía, mientras que los HC con enlaces  $\beta$

presentes en las fibras dietéticas o HC estructurales, son resistentes y más difíciles de romper por las enzimas digestivas, son no glucémicos, pero su aporte de energía se produce a través de la fermentación producida en el colón por la microbiota intestinal (179, 189).

Desde una visión más formal, los HC se pueden clasificar según el grado de polimerización (número de moléculas que componen la molécula) en: monosacáridos (compuestos formados por una sola molécula), disacáridos (dos moléculas), oligosacáridos y polisacáridos (desde 3 hasta incluso 1000, 10.000) como almidón, glucógeno y fibra dietética (celulosas, hemicelulosas, gomas y mucílagos) (175). Los polialcoholes también son HC pero la gran diferencia con los anteriores es que son sintetizados al industrialmente mediante hidrogenación de los azúcares (190).

Bajo la denominación de azúcares simples, se incluyen los monosacáridos (monómeros de glucosa, fructosa y galactosa) y los disacáridos (dímeros de maltosa, sacarosa y lactosa), pero también algunos oligosacáridos más sencillos en la polimerización como la maltotriosa son considerados azúcares simples (179, 189).

Monosacáridos: la glucosa y la galactosa son hexosas con un grupo aldehído en el carbono 1, mientras que fructosa es una cetosa con grupo ceto en la posición 2. Entre ellos, la fructosa es el aporta cualidades de dulzor mayores (191).

Disacáridos: cabe destacar La sacarosa o “azúcar de mesa” por su uso común, está formado por enlaces  $\alpha$  1-2 entre una glucosa y una fructosa. La maltosa está formada por dos moléculas de glucosa unidas mediante un enlace  $\alpha$  1-4, se denomina “azúcar de malta”, y es importante destacar que es obtenida de modo industrial por hidrólisis del almidón. La sacarosa o azúcar común, formada por la unión de una glucosa y una fructosa; y la lactosa, es el disacárido de la leche se forma por la unión entre una glucosa y una galactosa. Tras la digestión, una vez hidrolizados los disacáridos o polímeros más largos como almidón, en monosacáridos son absorbidos en intestino delgado, excepto la lactosa pues parte de ella es hidrolizada en colón. Generalmente, es en el intestino delgado es donde se produce la hidrólisis final de los disacáridos mediante las diferentes enzimas digestivas, para posteriormente ser absorbidos los monosacáridos. Destacar que tanto en el caso de los disacáridos como el del almidón, su digestión comienza en la boca a través de la amilasa oral, y a lo largo del aparato digestivo se produce el resto de digestión (191).

Oligosacáridos: son compuestos formados entre 3 y 9 monosacáridos, incluso hasta 20, y todos ellos tienen la característica de ser solubles en agua. En este grupo existen numerosos HC, entre los cuales los más conocidos son la matriotriosa (presente en la cerveza) y rafinosa (presentes en leguminosas y algunos cereales), ambas compuestas por tres monosacáridos; la verbascosa formada

por cinco monosacáridos (presente en legumbres y otros vegetales). En este grupo se encuentran las maltodextrinas, que se obtienen por hidrólisis parcial del almidón. La maltodextrina suele estar presente en fórmulas lácteas o preparados alimenticios en forma de fructooligosacáridos y galactooligosacáridos. Ambos HC se usan como prebióticos y está ampliamente demostrado los beneficios para la salud que producen al no ser digeridos completamente y ser preferiblemente metabolizados por las bifidobacterias (192). Destacar que se también se encuentran en este grupo de oligosacáridos, en forma de jarabes de glucosa y fructosa, los cuales son utilizados frecuentemente por la industria alimentaria y derivan de almidón de maíz o de patata (191).

Polisacáridos: son un grupo muy amplio y variado de HC, pero destacar entre estos los polímeros de glucosas, se encuentra el almidón y el glucógeno, ambos son utilizables por el organismo, pero también se incluyen los compuestos clasificados como “fibra dietética”, los cuales no son utilizables directamente por el organismo, aunque si indirectamente a través de la flora intestinal. Este grupo de compuestos clasificados como fibra dietética, comprenden un gran número de componentes: celulosa y hemicelulosa, gomas, mucílagos, almidón resistente, lignina, oligosacáridos, entre otros componentes (191).

Destacar el almidón por su presencia en una gran cantidad de alimentos naturales como en alimentos preparados. Está muy presente en alimentos vegetales como legumbres, patata y cereales, entre otros a diferencia del glucógeno que existe preferentemente en el mundo animal, almacenándose a nivel hepático y muscular. Está formado por moléculas de glucosa y está constituido por dos tipos de polímeros, la amilosa con carácter lineal y la amilopeptina que origina ramificaciones de hasta 1000 moléculas de glucosa. Además, el almidón es muy hidrosoluble, por lo que se almacena con gran cantidad de agua, ocupando mucho sitio en las células y tiene una importante función de reserva proporcionan glucosas con rapidez ante la demanda energética de la célula. Lo mismo le sucede al glucógeno, pero contiene más amilopeptina con mayor número de ramificaciones (191).

La celulosa es un polisacárido formado de moléculas de glucosa, hasta 10.000 con enlace  $\beta$  1-4. Esta estructura es muy estable, por la organización de sus cadenas lineales, formando parte de las paredes celulares de todos los vegetales y junto a sus propiedades químicas hace que sean muy difíciles de ser atacados sus enlaces por parte de las enzimas digestivas. Abunda especialmente en el salvado de los granos, pero también en verduras, frutas, leguminosas, frutos secos. Las hemicelulosas, tienen características físicas similares a la celulosa, pero son moléculas diferentes en composición ya que son polímeros de pentosas sobre xilosa y contienen ribosa y con menor número de moléculas. Las gomas, mucílagos, agar, pectinas y otros derivados de azúcares, son compuestos con una gran capacidad

gelificante, están presentes en frutas sobre todo pectinas y en las leguminosas como gomas y mucilagos. Estos compuestos debido a su solubilidad en agua, son muy utilizados como emulgentes, estabilizantes, espesantes o agentes gelificantes en productos comerciales. Como almidón resistente se incluye el almidón que no sufre ataque enzimático en intestino delgado, siendo fermentado por la microbiota en intestino grueso (193).

Polialcoholes o también denominados alcoholes de azúcares: se obtienen de modo industrial mediante hidrogenación de los azúcares. Entre ellos destacan, sorbitol presente en las frutas y que se obtiene fruto de la hidrogenación de la glucosa. Se usa en productos dietéticos y para diabéticos ya que no necesita insulina para su metabolización. Otros polialcoholes son el manitol (manosa), xilitol (xilosa), inositol. Estos polialcoholes (sobre todo sorbitol, manitol y xilitol) se absorben por difusión pasiva más lentamente que la glucosa, y en grandes cantidades pueden pasar al intestino grueso y ser laxantes (190).

Tradicionalmente se pensó que la longitud del polímero determinaba la tasa de digestión y de absorción, y como resultado el consiguiente aumento de glucosa postprandial en sangre. Sin embargo, las investigaciones actuales no han mostrado ninguna relación con esta hipótesis de la longitud de la cadena del polímero y la glucemia y/o insulinemia postprandial, habiéndose demostrado que la calidad de los HC es la causa más importante en el aumento del riesgo cardiometabólico y la asociación entre los HC refinados y el desarrollo de obesidad y DM2 (175, 194).

### **3.2.2.2. OTROS CARBOHIDRATOS DE INTERÉS: ISOMALTULOSA Y MALTODEXTRINA RESISTENTE.**

Los avances de la nutrición para promover la saciedad, además de aumentar el conocimiento de nuevos mecanismos fisiológicos y teniendo en cuenta el efecto deletéreo de un alto IG, y de la respuesta posprandial asociada, se plantea la inclusión de HC con un mejor efecto fisiológico, que los que están naturalmente presentes en algunos alimentos. Esto incluye HC que tengan menor IG, induzcan una mayor saciedad o tengan un efecto beneficioso sobre la microbiota, entre otros. Dos de los HC usados como suplementación y sustitución de azúcares con alto IG, se encuentra la isomaltulosa y las dextrinas resistentes (195), sobre todo en bebidas ricas en HC.

La isomaltulosa es un disacárido natural no cariogénico que se encuentra en cantidades mínimas en la miel y está compuesto de glucosa y fructosa (6-O -  $\alpha$  - D - glucopiranosil - D - fructosa). La isomaltulosa es un isómero estructural de sacarosa, aunque se diferencia en ésta en el enlace glicosídico debido a la reordenación de su estructura. Este tipo de enlace conlleva una disponibilidad

completa para el organismo de este HC, pero con una absorción lenta y una liberación sostenida en comparación con la sacarosa (196). Tanto la isomaltulosa como la sacarosa se descomponen en glucosa y fructosa y aportan el mismo valor calórico de 4 kcal/g. La isomaltulosa se utiliza en alimentos y bebidas como ingrediente alimentario y para reemplazar otros azúcares, pues tiene un IG de 32. Los productos típicos en los que se utiliza isomaltulosa como ingrediente incluyen bebidas deportivas, bebidas energéticas, bebidas instantáneas, bebidas de malta, nutrición enteral, piensos, cereales para el desayuno, barras de cereales, productos lácteos, productos horneados, glaseados y glaseados de pastelería y artículos de confitería (p.ej., chocolates, gelatinas, etc) (196). En estudios experimentales con animales, reveló como la isomaltulosa produjo una reducción de la insulina y glucosa posprandial y la liberación de GIP comparada con sacarosa la cual produjo el efecto contrario. (197).

Otro de los HC utilizados como sustituto de azúcares de alto IG y por sus beneficios clínicos que produce sobre la microbiota intestinal es la dextrina resistente. La dextrina resistente es una fibra dietética soluble, además de prebiótico, que ha sido muy utilizado en productos alimenticios y bebidas debido a su baja viscosidad y gran solubilidad en agua (198-201). La dextrina resistente es un oligosacárido con enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 y procede del trigo o maíz (198). Además, resiste parcialmente hidrólisis enzimática en el tracto digestivo (198), donde aproximadamente el 15% se digiere en el intestino delgado, el 75% se fermenta en el colón, y sobre un 10% se excreta por las heces (201). Varios ensayos clínicos han demostrado que la dextrina resistente mejora la RI, el control glucémico, los niveles de CT y la presión arterial y modula la inflamación (201, 202).

### **3.2.2.3. EFECTO DE LA FIBRA DIETÉTICA SOBRE LA RESPUESTA POSPRANDIAL**

Según los estudios realizados hasta la fecha han demostrado cómo una ingesta elevada de fibra dietética está inversamente relacionada con la presencia de obesidad, la DM2, el cáncer y las ECV (166). En este sentido, el aumento de la ingesta entre 15 a 35 gramos por día puede reducir la mortalidad entre un 10 a un 48 %. También este aumento de ingesta de fibra dietética puede mejorar el control glucémico y el peso, los valores lipídicos y PCR, cuyos factores contribuyen sobre el riesgo de mortalidad cardiovascular (167). Una de las características del consumo de fibra dietética y cereales integrales es el aporte de componentes bioactivos como almidones resistentes, vitaminas y minerales, fitoquímicos y antioxidantes (compuestos fenólicos, carotenoides, lígnanos, betaglucanos e inulina) (203). Se piensa que el efecto sinérgico de estos compuestos fitoquímicos así como las propiedades digestivas generadas son el mecanismo causante de los beneficiosos que tiene la fibra dietética en el tratamiento

y la prevención de la obesidad y la DM, reducción de la ECV y disminución de la incidencia de ciertos tipos de cáncer así como en la reducción de la mortalidad por todas causas (166).

Desde un punto de vista fisiológico, la fibra dietética reduce la concentración de glucosa plasmática y provocan respuestas controladas de insulina, posiblemente debido al retraso o disminución de la absorción intestinal (165, 166). En el caso de la obesidad diferentes estudios han demostrado la capacidad que tiene la fibra dietética para reducir o evitar el aumento del peso corporal. Estos efectos se deben a varios mecanismos: en primer lugar, la fibra se fermenta en el intestino grueso, favorece la secreción de hormonas intestinales que juegan un papel fundamental en la inducción de la saciedad y reducen la ingesta energética (204), como son el glucagón, GLP-1 y péptido Y (PY). En segundo lugar, la fibra dietética puede disminuir la energía metabolizable aportada por la dieta, que se estima como la energía bruta menos la energía perdida en las heces, orina y gases combustibles. En este sentido, según aumenta la ingesta de fibra dietética, la ingesta de HC simples y/o absorción rápida, tienden a disminuir y así como la digestibilidad de las grasas, que también se ve reducida (205). Este mecanismo favorece a que parte de los HC y grasas sean eliminadas a través de las heces y su absorción disminuya, cuyo resultado es una menor energía metabolizada (166). Sobre el efecto que tiene la fibra dietética sobre el IG y la DM, los estudios indican como un aumento del consumo de fibra dietética, puede prevenir la DM2 si se reduce el IG y la CG, tal y como demostró Meyer y col. (206) y Schulze et al. (207).

Existen discrepancias sobre el efecto que produce cada tipo de fibra, soluble e insoluble, pero la mayor parte de las investigaciones demuestran una fuerte relación inversa entre la fibra soluble y el riesgo de DM2. La fibra dietética que mostró un mayor beneficio al respecto fue la procedente de cereales integrales, en comparación con la contenida en frutas y verduras (166). Entre los mecanismos que generan estos efectos, la fibra insoluble produce un aumento de la velocidad del tránsito de los alimentos a través del tracto gastrointestinal y disminuye la absorción de nutrientes (208). Otro de los mecanismos es que parece acelerar la secreción inmediata de GIP. GIP es una hormona incretina que estimula la liberación de insulina posprandial (209) y regula la glucemia posprandial. En tercer lugar, la fibra insoluble puede reducir el apetito, aumentando la saciedad con el resultado de una menor ingesta de alimentos lo que favorece la disminución la ingesta calórica y el IMC (166). Por el contrario, la fibra soluble (pectinas, gomas vegetales, fructanos tipo inulina y algunas hemicelulosas, así como derivados de frutas y legumbres), por la formación geles viscosos produce un enlentecimiento en la digestión de HC y menor absorción de colesterol, por lo que se reduce glucemia posprandial y los niveles de lípidos sanguíneos. Además, este tipo de fibra es un sustrato de la microbiota intestinal (166, 210). En este

sentido, la fibra dietética (soluble e insoluble) induce la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) a través de la fermentación en intestino grueso, y se sabe que los AGCC reducen la respuesta a la glucosa posprandial. Los AGL son capaces de inhibir el metabolismo de la glucosa mediante la inhibición de los transportadores GLUT 4. En consecuencia, los AGCC contribuyen a disminuir los AGL en suero y pueden reducir los niveles de glucosa en sangre a través de la competencia en tejidos sensibles a la insulina (167).

#### **3.2.2.4. ÍNDICE GLUCÉMICO Y CARGA GLUCÉMICA**

El IG, desarrollado por Wolster (79), es una medida sencilla y utilizada para caracterizar la respuesta glucémica en la sangre que provocan los alimentos que contienen HC (80, 81). La evidencia sugiere una relación directa entre la glucemia posprandial y la ECV o incluso mortalidad total en personas con DM2 (211), pero también sin DM2. Además, es más que evidente la asociación positiva entre un elevado IG dietético y un mayor riesgo de desarrollo de DM2. En este sentido, distintos ensayos aleatorizados, ratifican el beneficio de dietas con alto contenido de HC de alta calidad como cereales integrales (especialmente avena y cebada), legumbres o frutas, con bajo IG, baja CG y/o alto contenido de fibra disminuyen los FR cardiometabólico y se asocian con la pérdida de peso y la disminución de la incidencia de DM2, ECV y mortalidad cardiovascular. Por lo que indican que la calidad de los HC que se consumen es más importante que la cantidad HC (175). En consecuencia, toda la evidencia afirma y confirma que reducir el IG y la CG en la dieta puede mejorar el control metabólico tanto en el manejo como en la prevención de la DM2 (212).

El IG se obtiene calculando el área incremental bajo la curva (AUC) de glucosa plasmática posprandial de un alimento de prueba, expresada porcentaje de una cantidad igual a 50 g de un HC de referencia, que suele ser la glucosa (196, 211). El valor de IG de la glucosa es de 100, es por ello que se considera estándar para la determinación del IG. La clasificación de los alimentos en función del IG en la escala de glucosa, se establece en base a un valor numérico de 0 a 100, pero existen ciertos HC como la maltosa que tienen IG superiores a 100 (IG maltosa 119). Si el método de IG es correcto se distinguen entre HC con un IG bajo ( $IG \leq 55$ ) se digieren, absorben y metabolizan más lentamente y conducen a un aumento más lento de la glucosa en sangre, que aquellos con un IG más alto ( $IG \geq 70$ ) cuya absorción y metabolización es mucho más rápida (171). Los alimentos con contenido en HC, generan una amplia gama de efectos sobre la respuesta glucémica, donde algunos provocan un rápido aumento seguido de un rápido descenso en las concentraciones de glucosa en sangre, mientras que otros muestran un aumento prolongado y una disminución prolongada lenta de la glucosa en sangre (213). Además, la

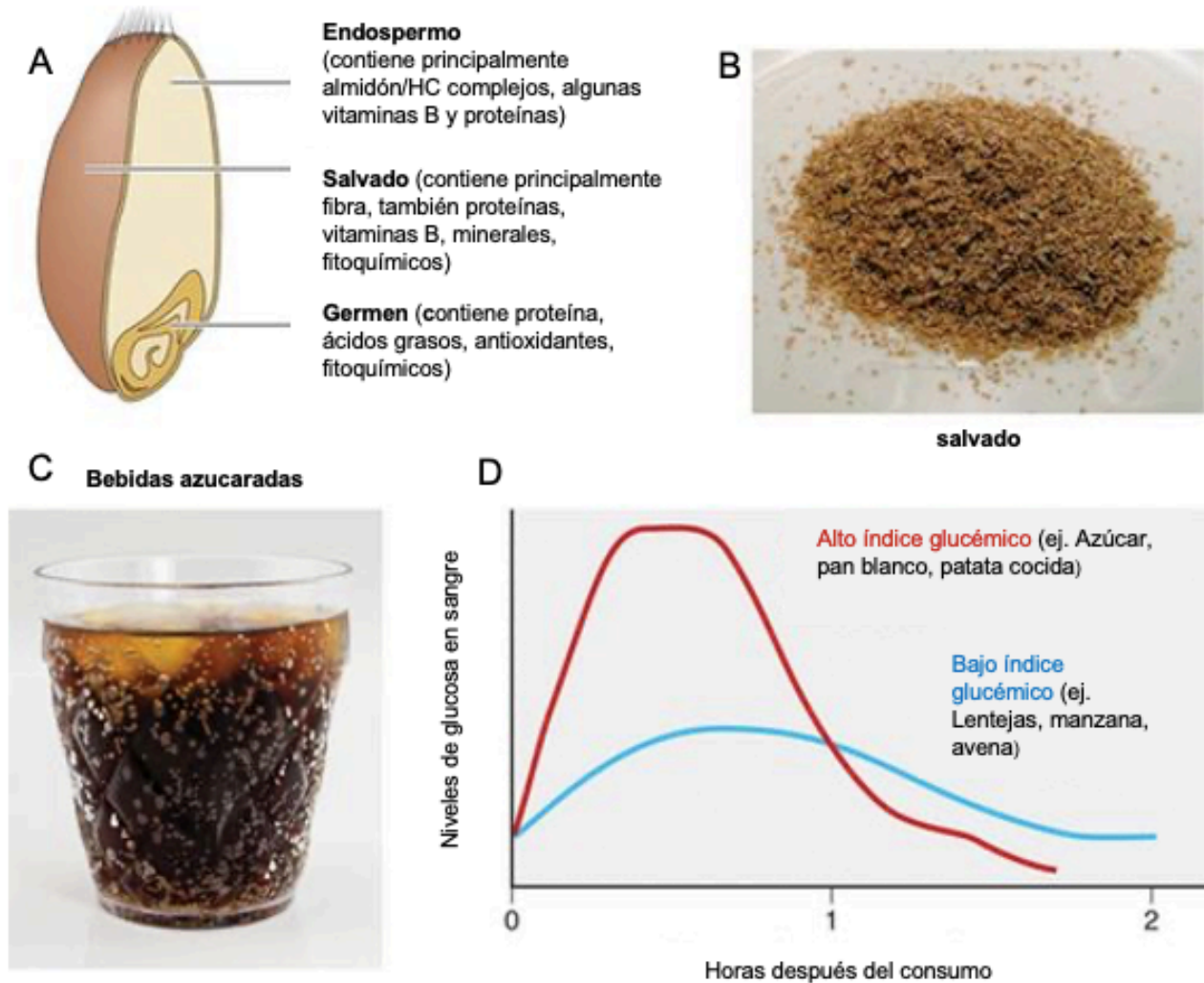


medida del IG no es infalible, ya que un HC como la fructosa, que tiene un IG muy bajo, pero tiene efectos fisiológicos muy negativos. Diferentes ensayos controlados de intervención dietética y metaanálisis han asociado como un aumento en la ingesta de fructosa se asocia con mayores tasas de obesidad y DM2, EC y ACV. Por otra parte, parece ser que proporciona un exceso de energía y ello promueve el aumento de peso, dislipidemia, niveles elevados de ácido úrico y EHGNA (211).

Los HC son el único macronutriente que aumentan directamente la glucosa en sangre tras su absorción, donde la calidad del HC consumido determina, de forma clave, la respuesta glucémica posprandial. La respuesta glucémica es una respuesta fisiológica normal que depende de la velocidad de entrada de glucosa en la circulación sanguínea, la cantidad de glucosa absorbida, la tasa de desaparición de la glucosa en la circulación debido a su metabolización por parte de los tejidos, y regulación hepática de la liberación de glucosa (214). En este sentido, granos refinados, patatas, pan blanco y las bebidas azucaradas, entre otros, se han asociado con un mayor riesgo (215), mientras que granos enteros, legumbres y granos mínimamente procesados y frutas enteras, donde la matriz esta intacta, se asocian con reducción respuestas glucémicas (167, 216). Estas diferencias se explican en cierto modo en función de la calidad de HC, es decir, cómo el tipo de HC que se consume, afecta a la hiperglucemia postprandial e hiperinsulinemia (217). Por lo tanto, muchos factores condicionan el IG de un alimento, desde la cocción, presencia de fibra o con matriz intacta (por ejemplo, no es lo mismo consumir la glucosa en una matriz líquida que sólida, donde las respuestas glucémicas son mucho más bruscas y parecen ser mucho menos saciantes) o la combinación con otros nutrientes como proteínas y grasas (131, 211). Por lo tanto, cuando consumimos alimentos refinados estamos consumiendo HC ricos en almidón sin estructura y componentes que amortigüen el IG del alimento, facilitando la hidrólisis de las cadenas de este almidón en glucosas libres que son rápidamente absorbidas y provocando respuestas glucémicas incontroladas y exageradas (188, 210), **(Figura 14)**.

El concepto de CG se utiliza como mecanismo para predecir la respuesta glucémica de una comida, la cual tiene en cuenta el IG y la cantidad de HC disponibles en una porción del alimento ingerido (214). La CG se define como el IG multiplicado por la cantidad de HC existente en una ración. La CG refleja mejor la respuesta glucémica posprandial de un alimento, pues aunque un determinado alimento como por ejemplo la sandía que tiene un alto IG, aunque la realidad es que la cantidad de HC que contiene una ración es muy baja, produciendo una respuesta posprandial muy atenuada. Este marcador ha demostrado ser el mejor predictor de respuesta glucémica de la cantidad de HC en una comida (218, 219).

**Figura 14.** Características definitorias de la calidad de los HC independientemente a los efectos cardiometabólicos sobre la salud.



Adaptada de Mozaffarian D. (131). A) El contenido en grano integral basado en el molido, semiprocesado o grano intacto (imagen superior izquierdo), incluido el salvado y el germen; B) contenido de fibra (imagen superior derecha) basado en gran medida por el contenido de salvado; C) estructura de los alimentos (imagen inferior izquierdo), en concreto, si el alimento es sólido o líquido (como las bebidas azucaradas); D) respuesta glucémica (imagen inferior derecha), determinada por la cantidad y accesibilidad de almidón y azúcar.

### **3.3. INFLUENCIA DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE LA DM2**

La actividad física es un elemento esencial en el manejo de la DM junto con las modificaciones del estilo de vida y el tratamiento farmacológico. A cualquier edad la realización de ejercicio físico aporta beneficios, ya que ayuda al control del peso, mejora la composición corporal, aumenta el bienestar físico y psicológico, y mejora el control metabólico global (212). En particular, a las personas con DM aporta beneficios adicionales, como es la mejora en la tolerancia a la glucosa, aumenta sensibilidad a la insulina, reduce el riesgo de aterosclerosis, reduce la presión arterial y mejora el estado cardiovascular (220).

Antes de plantear o prescribir programas de ejercicio en personas con DM, es importante evaluar su estado de salud, así como las características individuales para evitar posibles complicaciones. A pesar de la evidencia demostrada en relación a los beneficios de la actividad física, un ejercicio de intensidad vigorosa puede presentar riesgos en pacientes con DM, como hipoglucemias, que pueden ser graves, o problemas cardiovasculares. Por tanto, es importante establecer la monitorización o control de la glucemia para adecuar la ingesta de alimentos y la terapia farmacológica a la frecuencia e intensidad del ejercicio físico (220).

#### **3.3.1 BENEFICIOS DE LA ACTIVIDAD FÍSICA EN LA SALUD DE LOS SUJETOS CON DM2**

Los efectos positivos que tiene la actividad física se deben, principalmente, a la reducción del peso corporal y el IMC por mayor gasto energético, la mejora de la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, mejora el control glucémico, mejora del sistema cardiorrespiratorio, reduce el riesgo de ECV y reducción de la incidencia de nuevos casos de DM2 (221). A pesar de conocer los beneficios que aporta un estilo de vida activo, principalmente en personas con DM, muchas personas que presentan esta patología son completamente sedentarias o no pueden aumentar su nivel de actividad física. Siendo un entorno sedentario o poco activo un factor que favorece al desarrollo del sobrepeso y obesidad en general, y la grasa depositada a nivel visceral en particular, y por ende el desarrollo de RI y DM2 (222). Además, un estilo de vida sedentario intensifica este riesgo de desarrollo de DM a través de cambios en las vías de señalización de la insulina y cambios en la morfología del músculo esquelético que conducen a un empeoramiento de la RI (223).

Diferentes estudios han analizado los efectos de la actividad física sobre la RI. Entre los resultados encontrados, en el estudio de un programa de ejercicios con intensidad moderada durante

7 días mejoró la tolerancia a la glucosa sin que se produjeran cambios en el peso corporal, además disminuyó los picos de insulina pre y postprandial en personas con DM y con TG. Otro de los efectos observados, es como el ejercicio, especialmente el aeróbico, se asocia con mejoras en la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina debido a que se produce un aumento de la capilarización en el músculo esquelético, lo que favorece la absorción y utilización de glucosa por el músculo esquelético e incluso favorece la disminución del peso corporal (222). Un metaanálisis reciente evaluó datos de varios ensayos clínicos sobre los efectos del ejercicio estructurado y programado en personas con DM2, mostrando que el ejercicio reduce los niveles de HbA1c independiente al efecto del peso corporal. Además, existe una relación directa entre la realización de actividad física de modo regular durante largos periodo de tiempo y la mejora el perfil glucémico, capacidad cardiovascular y el IMC (224).

### **3.3.2 RECOMENDACIONES DE ACTIVIDAD FÍSICA EN SUJETOS CON DM2**

Diferentes sociedades científicas, recomiendan que la actividad física debe aumentar progresivamente en intensidad, frecuencia y/o duración hasta poder realizar al menos 150 min/semana de ejercicio de intensidad moderada (212), por ello es fundamental individualizar la prescripción de los ejercicios a realizar por los sujetos con DM2, según el estado de salud, los objetivos individuales, así como su estado físico o la respuesta a la actividad física. Los tipos de entrenamientos recomendados en sujetos con DM2 se incluyen ejercicios aeróbicos, ejercicios de fuerza o resistencia, ejercicios de intervalos de alta intensidad (HIIT) y ejercicios de flexibilidad (225).

#### **3.3.2.1. Entrenamiento aeróbico**

El ejercicio aeróbico se caracteriza por el movimiento continuo, rítmico y repetido donde se involucra a grandes grupos musculares, como por ejemplo el ciclismo, el baile, el senderismo, el trote o running, la natación o incluso caminar (221). El efecto que produce el ejercicio aeróbico, es la activación de la glucólisis la cual produce ATP y lactato. En personas con diabetes las actividades aeróbicas mejoran la sensibilidad a la insulina, la función cardiorrespiratoria así como la función inmunitaria, pero además se asocia con reducción del riesgo de ECV y mortalidad por todas causas (226). En concreto, los efectos beneficiosos en la DM2, es la reducción de las cifras de presión arterial, mejora de la RI y un mejor control glucémico por reducción de las cifras de Hb1Ac. Además, mejora el volumen de oxígeno máximo del gasto cardiaco y esto se asocia con reducción del RCV y mortalidad general en pacientes con DM2 (222, 227).

Las recomendaciones generales más actuales de la ADA sobre el entrenamiento aeróbico en personas con DM2 deben durar al menos 30 min por día y realizarse 3 a 7 días a la semana. Una pauta general sería completar 150 min/semana con una intensidad de moderada a vigorosa en 2 o 3 sesiones a la semana, de modo continuo o en forma de HIIT (225, 227). El entrenamiento de HIIT, se caracteriza por la realización de ejercicio de series cortas e intensas con periodos de recuperación intercalados entre las series. Este tipo de entrenamiento tiene efectos cardioprotectores y metabólicos cuando se realiza durante 75 min/semana. Sin embargo, tanto un entrenamiento aeróbico común como la modalidad de HIIT se recomienda realizar en pacientes clínicamente estables y que estén bajo supervisión principalmente por la sensibilidad del sistema cardiorrespiratorio y alteraciones metabólicas ocasionadas a la realización del esfuerzo físico (221, 228).

### **3.3.2.2. Entrenamiento de fuerza o resistencia**

El entrenamiento de resistencia o fuerza ha ganado reconocimiento, en las dos últimas décadas, como un ejercicio adecuado para personas con DM2. Este tipo de entrenamiento implica movimientos donde se utilizan pesas libres, máquinas de pesas, ejercicios de peso corporal o bandas elásticas de resistencia (221).

Los beneficios que aporta este tipo de entrenamiento es un aumento la masa muscular, y con ello la fuerza pero también se obtienen mejoras en la función física, mental y cardiovascular, la sensibilidad a la insulina y el metabolismo lipídico (229). Las recomendaciones para las personas con DM2, establecen la realización de ejercicios de fuerza o resistencia 2-3 días/semana con una intensidad que permita la realización de 10-12 repeticiones y con descansos intercalados y variando las diferentes modalidades de este tipo de entrenamiento.

### **3.3.2.3. Entrenamiento combinado de ejercicios aeróbicos y de resistencia**

Según la ADA, las recomendaciones actuales parecen dirigirse hacia esta modalidad de ejercicio combinado, ya que parece ser más eficaz para controlar la glucosa y los lípidos en la DM2 (212, 228). El estudio desarrollado por Cuff y cols. evidenció como la realización de un entrenamiento combinado de ejercicios aeróbicos y de fuerza produjo un aumento significativo de la captación de glucosa mediada por insulina en comparación con la realización solo ejercicio aeróbico, lo que refleja una mayor sensibilidad a la insulina. Por su parte, Balducci y cols. demostraron que el entrenamiento aeróbico y de resistencia combinado mejoró notablemente la HbA1c, en comparación con el grupo de control, y mejoró globalmente los FRCV (221).

**3.3.2.4. Entrenamiento de flexibilidad y equilibrio**

Los ejercicios de flexibilidad mejoran el movimiento de las articulaciones debido al estiramiento producido, y los ejercicios de equilibrio mejoran la marcha y el estado de general equilibrio. Por ello, se recomienda realizar ejercicios de flexibilidad y equilibrio 2 o más veces a la semana y, especialmente, en personas mayores que tengan neuropatía periférica, donde la movilidad articular como muscular esta reducida (222). Los beneficios de los ejercicios de flexibilidad y equilibrio, se ha visto que no afectan al control glucémico ni a la mejora de la respuesta de la insulina, lo que no deben sustituir a ejercicios aeróbico o de resistencia.

#### **4.1. REGULACION HORMONAL DE LA GLUCEMIA POSPRANDIAL Y DEL APETITO**

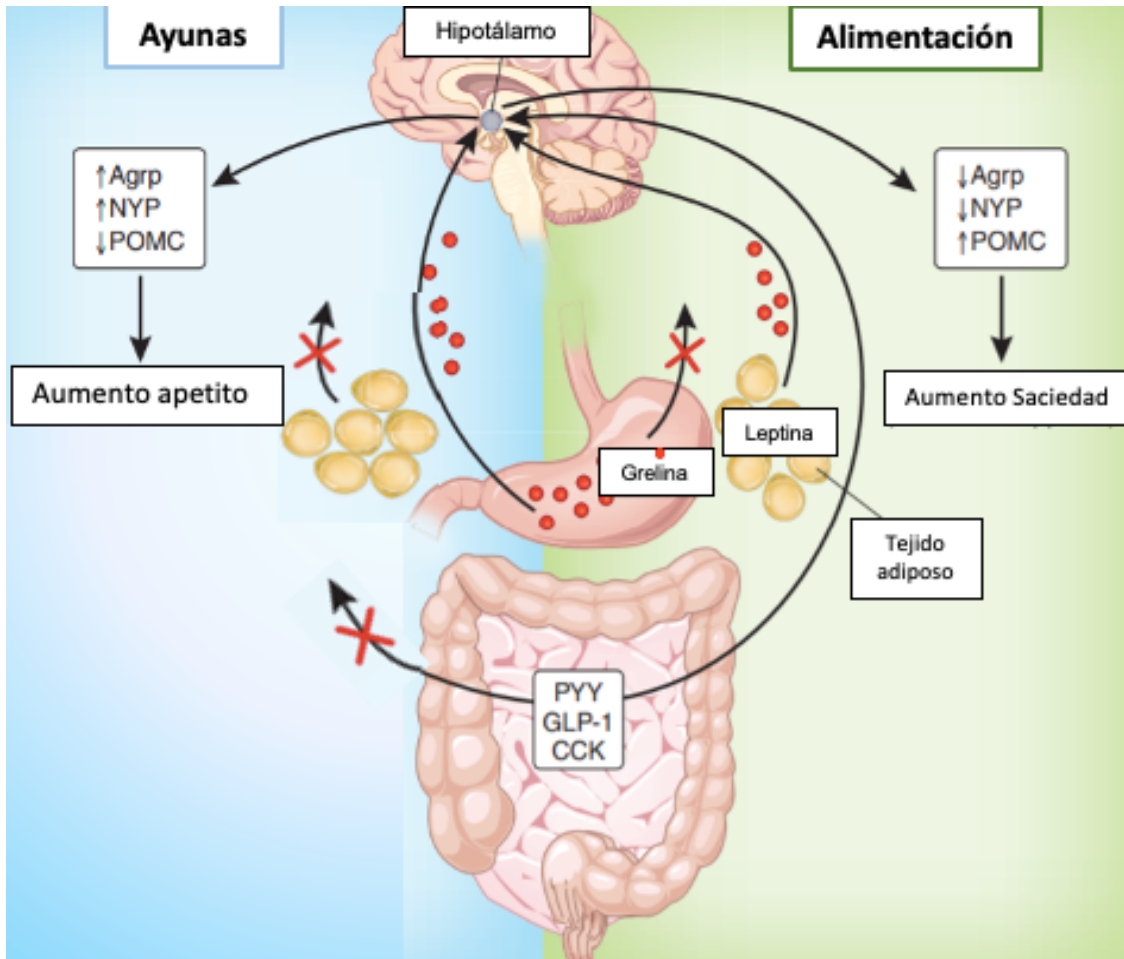
El estado posprandial metabólico y hormonal es un estado fisiológico muy complejo, donde están implicados multitud de factores que regulan los niveles de glucosa e insulina plasmáticos, entre otros mecanismos (230). Entre los muchos factores que contribuyen en la regulación de la glucemia posprandial y del apetito, se incluye la composición nutricional y cantidad de alimentos consumidos, la velocidad del vaciado gástrico, y el IG, entre otros. Estos factores condicionan la respuesta fisiológica de las comidas y la liberación de hormonas gastrointestinales, ambas con un papel clave en la regulación de la glucemia posprandial y otras respuestas metabólicas, pero también sobre la regulación del apetito. Múltiples investigaciones se han centrado, en los últimos años, en el estudio del metabolismo hormonal que regula este complejo sistema (230).

Tras la ingesta de alimentos se produce la activación de varios mecanismos neuroendocrinos, por medio de un complejo sistema de retroalimentación bidireccional entre el tracto gastrointestinal y el cerebro, denominado “eje intestino-cerebro”. El intestino informa del estado de nutrición existente al sistema nervioso central (SNC), mediado por el nervio vago, las células enteroendocrinas y el sistema nervioso entérico (231). Tras una comida, los nutrientes pasan al estómago e intestino, y varias hormonas gastrointestinales son liberadas, como grelina, PY o GLP-1, entre otros. Estos péptidos y otras señales, actúan contribuyendo al proceso digestivo, principalmente sobre el vaciado gástrico o motilidad, incluso algunos actúan como mediadores de señales a corto plazo sobre el mecanismo del apetito. La modulación de la disminución del apetito, se lleva a cabo por una regulación bilateral entre péptidos orexigénicos o anorexigénicos (232), secretados en parte por la señal que producen los nutrientes en el tracto digestivo. Por lo tanto, el tracto gastrointestinal se considera parte esencial en la homeostasis posprandial de la glucosa y en el mecanismo de la saciedad tanto a corto como a largo plazo, (**Figura 15**) (233).

Como hemos comentado antes, uno de los factores que contribuye en la regulación metabólica, es el propio efecto saciante que tienen ciertos alimentos. La composición de los macronutrientes de la dieta desempeña un papel importante sobre la saciedad y secreción de hormonas (234). El contenido de proteínas, grasas, fibra, así como el volumen ingerido de comida, y el IG determinado por la calidad de los HC, determinan estas propiedades saciantes de los alimentos e influyen directamente sobre las repuestas glucídicas posprandiales y secreción de hormonas gastrointestinales (172, 173). Está bien demostrado como un alimento con IG bajo tiene una capacidad menor para elevar la glucosa posprandial, mientras que los alimentos con IG alto elevan rápidamente la glucosa en sangre. Además, los alimentos con IG bajo producen mayor saciedad, mientras que los

alimentos con IG alto se asocian con mayor sensación de hambre, aumento de los niveles de insulina y mayor ingesta de energía (173, 211, 235).

**Figura 15.** Regulación del apetito de las hormonas gastrointestinales, “Eje intestino-cerebro”.



Adaptada de Larder (233). Durante y después de la ingesta de alimentos, la secreción de grelina disminuye en el estómago, mientras aumenta la producción de PY, GLP-1 y colecistoquinina (CCK) en a nivel gastrointestinal además del aumento de los niveles de leptina por parte del tejido adiposo. Estas hormonas informan al cerebro modulando la expresión génica de proteínas orexigénicas (proteína relacionada con Agouti (AgRP), neuropéptido Y (NPY) y anorexigénicas (pro-opiomelanocortina (POMC), e inducen una disminución del apetito y mayor sensación de saciedad reduciendo así la ingesta calórica. Durante el ayuno, esta inhibida la liberación de PY, GLP-1 y CCK a nivel gastrointestinal y niveles de leptina, sin embargo se produce estímulo de la secreción de grelina en el estómago y estos cambios aumentan la expresión del gen anorexigénico y reduce la expresión del gen anorexigénico dentro del hipotálamo, aumentando así la sensación de hambre.

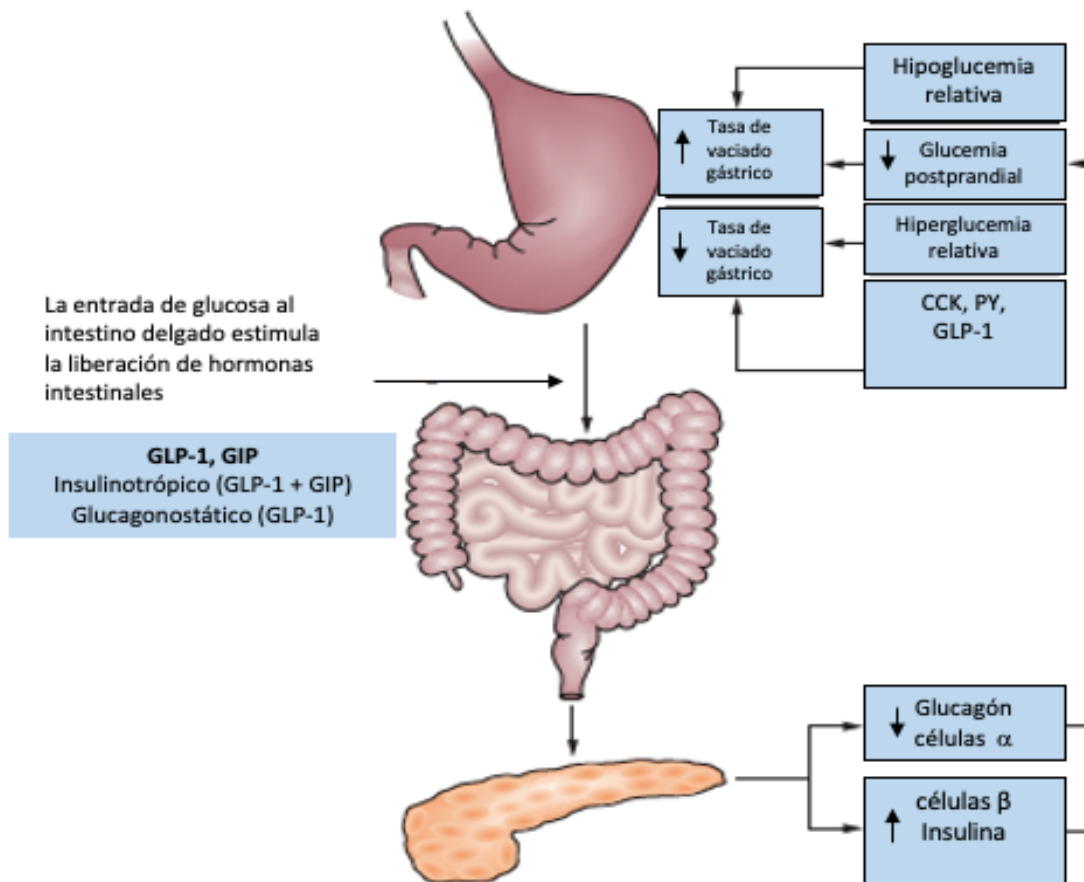


En este sentido, ingerir HC junto a proteínas es capaz de modular la respuesta posprandial, estimulando la secreción de sustancias reguladoras del apetito, como GLP-1, induciendo un mayor efecto saciante y una mayor y más rápida secreción de insulina, mejorando así la respuesta posprandial. De la misma forma, la grasa ingerida influye en la reducción de la velocidad del vaciamiento gástrico, y conduce a una mayor y sostenida elevación del PY plasmático y CCK, influyendo a su vez sobre la reducción del vaciado gástrico, y una mayor sensación de saciedad (236). Varios autores concluyen que la presencia de fibra dietética contribuye a la reducción de la velocidad de vaciamiento gástrico y las tasas de absorción de glucosa e, incluso, contribuye al estado de la microbiota intestinal. Esta, a su vez, favorece la liberación de incretinas o hormonas gastrointestinales que contribuyen a la regulación del apetito y saciedad (237).

Las tasas de absorción de glucosa están estrechamente relacionadas con el IG de los alimentos y a su vez, con el vaciado gástrico, donde el resultado de ambos factores (velocidad de vaciado gástrico y tasa de glucosa) contribuye a desencadenar un patrón diferente de la respuesta posprandial, que a su vez influye sobre la secreción de hormonas gastrointestinales, incluida la secreción y respuesta moduladora de las hormonas incretinas (238). La entrada de glucosa en el intestino delgado induce un bucle de retroalimentación entre CCK, PY y GLP-1, que se secretan en el intestino en respuesta a la exposición a nutrientes. GLP-1 y GIP inducen la liberación de insulina y además GLP-1 inhibe la secreción de glucagón, lo que atenúa las excursiones glucémicas posprandiales. Al mismo tiempo, la concentración de glucosa en sangre modula el vaciado gástrico, de modo que las elevaciones agudas de los niveles de glucosa en sangre ralentizan el vaciamiento gástrico (los efectos son evidentes incluso dentro del rango fisiológico) y el vaciamiento se acelera durante la hipoglucemia, (**Figura 16**) (239). Estudios recientes (234, 236) han determinado el impacto de los HC sobre la secreción de insulina postprandial puede variar de forma sustancial en función del tipo de alimento en el que estén contenidos y junto con que alimentos sean consumidos en esa comida (234, 236). A pesar de toda la evidencia existente, los mecanismos subyacentes de los efectos desfavorables de los alimentos con alto IG sobre la salud no se conocen en su totalidad. Tradicionalmente, el efecto desfavorable de los alimentos con alto IG ha sido atribuido a la hiperglucemia posprandial e hiperinsulinemia relacionada, incluso al estrés oxidativo e inflamatorio (230, 238). En este sentido, las respuestas secretoras de insulina que se inician por la hiperglucemia posprandial, se amplifican de modo importante por las hormonas incretinas (230, 240). Tanto GLP-1 como GIP regulan el metabolismo de la glucosa, debido al efecto estimulador en la respuesta de la secreción de insulina dependiente de una carga de glucosa oral, (**Figura 16**).

Este “efecto incretina” se atribuye al hecho que cuando la glucosa oral llega al intestino, esta glucosa estimula la liberación de estas hormonas incretinas y provoca el aumento de la secreción de insulina entre dos y tres veces mayor que en comparación si se administrase una cantidad similar de glucosa intravenosa (230, 241). Además del efecto hiperinsulinémico, las incretinas son responsables de la regulación del peso corporal, mantenimiento equilibrio energético, incluso debido a la expresión de sus receptores en múltiples tejidos, tienen efectos periféricos y centrales contribuyendo a la fisiología humana (241).

**Figura 16.** Relación entre el vaciado gástrico y la glucemia



Adaptado de Phillips (239). La entrada de glucosa en el intestino delgado induce la secreción de CCK, PY y GLP-1 en respuesta a la exposición a los nutrientes. GLP-1 y GIP inducen la liberación de insulina y GLP-1 inhibe la secreción de glucagón, lo que atenúa las excursiones glucémicas posprandiales. Al mismo tiempo, la concentración de glucosa en sangre modula el vaciado gástrico, de modo que las elevaciones agudas de los niveles de glucosa en sangre enlentecen el vaciamiento gástrico (incluso dentro del rango fisiológico), y se acelera durante la hipoglucemia..

## 4.2. HORMONAS INCRETINAS

Existen dos hormonas incretinas conocidas con efectos importantes sobre la regulación posprandial de la glucosa y la saciedad: GIP y GLP-1 (241). Las hormonas incretinas son hormonas gastrointestinales que se secretan y se liberan en el intestino, en respuesta a la ingesta de alimentos. La glucosa es uno de los nutrientes que estimulan la secreción de GIP y GLP-1. Sin embargo, otros nutrientes, entre ellos los HC, como la sacarosa y almidón, o TG e incluso algunos aminoácidos, también aumentan los niveles de incretinas de manera más lenta que los HC. Aunque hay que tener en cuenta que las proteínas son, en general, un estímulo débil en comparación con los otros nutrientes comentados (241).

En ayunas, los sujetos sanos muestran concentraciones bajas de ambas incretinas, que comienzan a aumentar tras la ingesta de alimentos, alcanzando sus niveles máximos una hora después de la ingesta, para volver posteriormente a niveles basales. Una vez que se libera GIP y GLP-1, éstos se unen a receptores acoplados a proteína G específicos de las células  $\beta$ , ejerciendo efectos amplificadores sobre la estimulación de la secreción de insulina dependiente de glucosa. Los receptores GLP-1 y GIP se expresan en múltiples tejidos y tipos celulares además de en las células  $\beta$ , con importantes funciones. Sin embargo, la vida media de GLP-1 y GIP en circulación es corta debido a la enzima proteolítica ubicua DPP-4 que rápidamente las inactiva (230, 238).

### 4.2.1 PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGÓN TIPO 1 (GLP-1)

GLP-1 es un pequeño péptido de 29 aminoácidos, sintetizado por las células enteroendocrinas L ubicadas principalmente en intestino inferior, aunque también se expresa en el sistema nervioso central sobre todo en troncoencéfalo (230, 242). GLP-1 es secretado principalmente tras la ingesta de HC, y en menor medida por las proteínas y las grasas presentes en cada comida. Diferentes estudios indican que GLP-1 comienza a ser secretado antes de llegar los nutrientes al intestino donde estimulan a las células secretoras de GLP-1, por un mecanismo dependiente del nervio vago y cuya magnitud de secreción está directamente relacionada con el vaciamiento gástrico (239, 243). GLP-1 intestinal actúa como una incretina al reducir los aumentos de la glucemia posprandial debido a su gran poder de estimulación de secreción de insulina, debido a que inhibe la secreción de glucagón (238) e incluso un determinante de este efecto es que ralentiza el vaciamiento gástrico (236). GLP-1 no solo mejora la secreción y síntesis de insulina dependiente de glucosa, sino que a nivel celular estimula la proliferación celular e inhibe la apoptosis células  $\beta$ , mejorando así la integridad de los islotes y la masa celular pancreática (238). Además GLP-1 es dependiente de leptina para inducir la saciedad (244).

La desregulación de la secreción o la señalización de GLP-1 pueden contribuir a una ingesta calórica excesiva, siendo un factor que contribuye en la patogenia de la obesidad. La eficacia de GLP-1 sobre el control glucémico, se ha observado que se reduce en individuos con RI o DM2. La importancia de todas estas acciones se ha visto amplificada por el uso en el tratamiento de la DM de fármacos agonista de GLP-1, como la exenatida, que reduce los niveles de glucosa, así como la ingesta de alimentos, por su efecto sobre la saciedad y promueve la pérdida de peso (244).

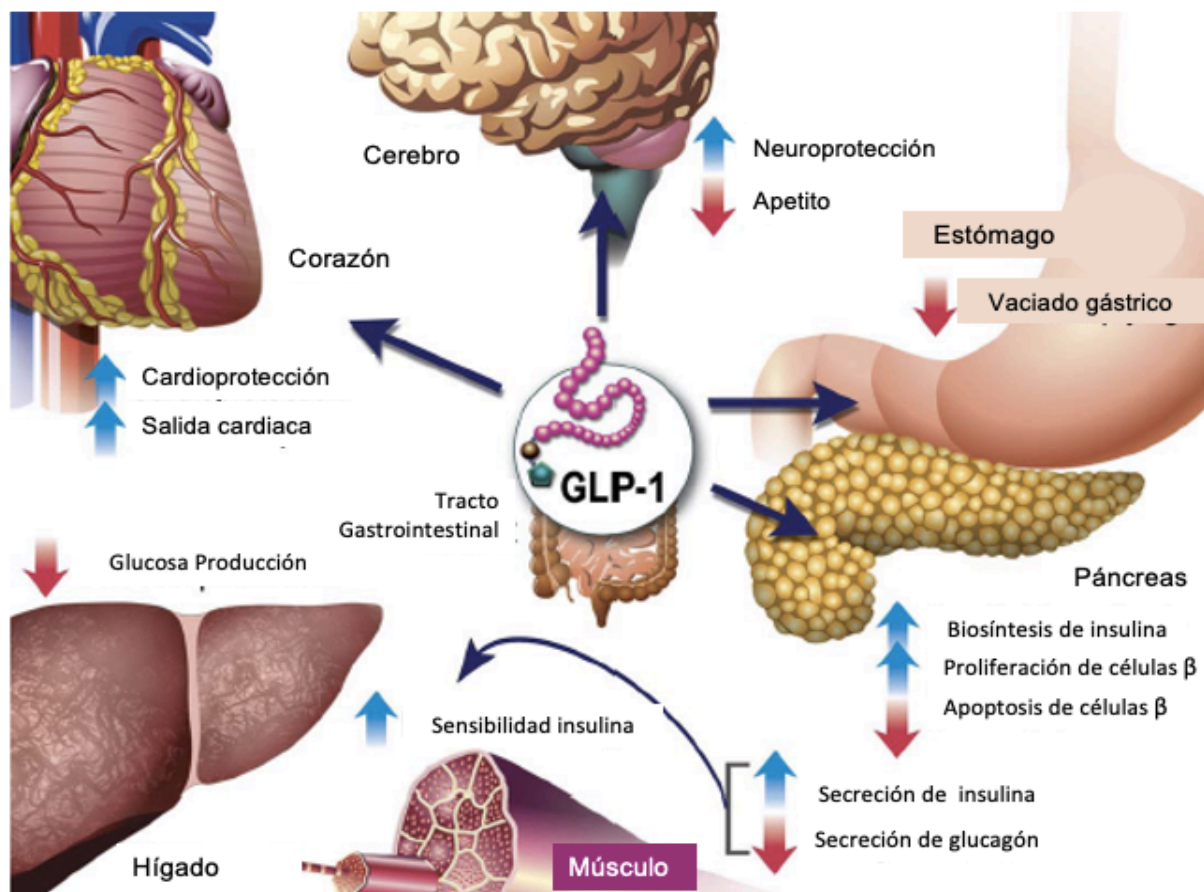
#### **4.2.1.1. Acciones extra pancreáticas de GLP-1.**

Debido a la expresión del receptor de GLP-1 en múltiples tejidos, (**Figura 17**), hace que GLP-1 actúa en diferentes tejidos. pero entre estas acciones GLP-1 juega un papel clave sobre el control fisiológico de la regulación del equilibrio energético y del peso corporal, reduciendo el apetito y mejorando la saciedad (238). Este efecto sobre la ingesta de alimentos favorece al balance energético negativo, tal y como se ha observado tanto en sujetos sanos como en personas con DM2 (245).

Entre las diferentes acciones de GLP-1, se produce sobre el metabolismo de lípidos donde la ingestión de grasas es un fuerte estimulador fisiológico de la liberación de GLP-1. Por otro lado, la infusión de GLP-1 parece mejorar la lipemia posprandial, posiblemente relacionado con el enlentecimiento del vaciado gástrico y la inhibición de la lipólisis mediada por la insulina, pero también parece que existe implicación por la reducción en la síntesis de apolipoproteína B-48. La apolipoproteína B-48 es un componente de los quilomicrones, que transportan la grasa ingerida con la dieta. Se ha observado cómo la administración de GLP-1 inhibe la producción de apolipoproteína B-48, y produce una reducción de la liberación de TG plasmáticos posprandiales (241). A nivel del tejido adiposo, a pesar que existe controversia en la presencia del receptor de GLP-1, tanto GLP-1 como exendina-4 estimulan la captación de glucosa por los adipocitos mediada por la acción de la insulina. Además GLP-1 estimula intensamente la lipólisis en los adipocitos del tejido adiposo abdominal, especialmente en personas con obesidad grave pero no en la grasa subcutánea abdominal de sujetos sanos (246). A nivel del sistema cardiovascular también parece tener efectos protectores, debido a que se ha demostrado que GLP-1 produce la vasodilatación dependiente del endotelio especialmente en el estado posprandial, aumenta la disponibilidad de óxido nítrico a nivel del endotelio vascular e inhibe la producción de endotelina-1 (241). Uno de los efectos relevantes del uso de agonistas del receptor de GLP-1 o GLP-1 sobre la función cardíaca, parece ser que atenúa la isquemia del ventrículo izquierdo en pacientes con EC después de una prueba de esfuerzo, y mejora la función ventricular en insuficiencia

cardíaca, que se tratan de complicaciones cardiovasculares frecuentes en pacientes con DM2 (247). Tres estudios (LEADER, SUSTAIN, REBOBINAR) han demostrado en personas con DM2 que el tratamiento a largo plazo con análogos de GLP-1 reduce la presión sanguínea, induce la pérdida de peso y mejora la función endotelial (241).

**Figura 17.** Acciones de GLP-1 en tejidos periféricos



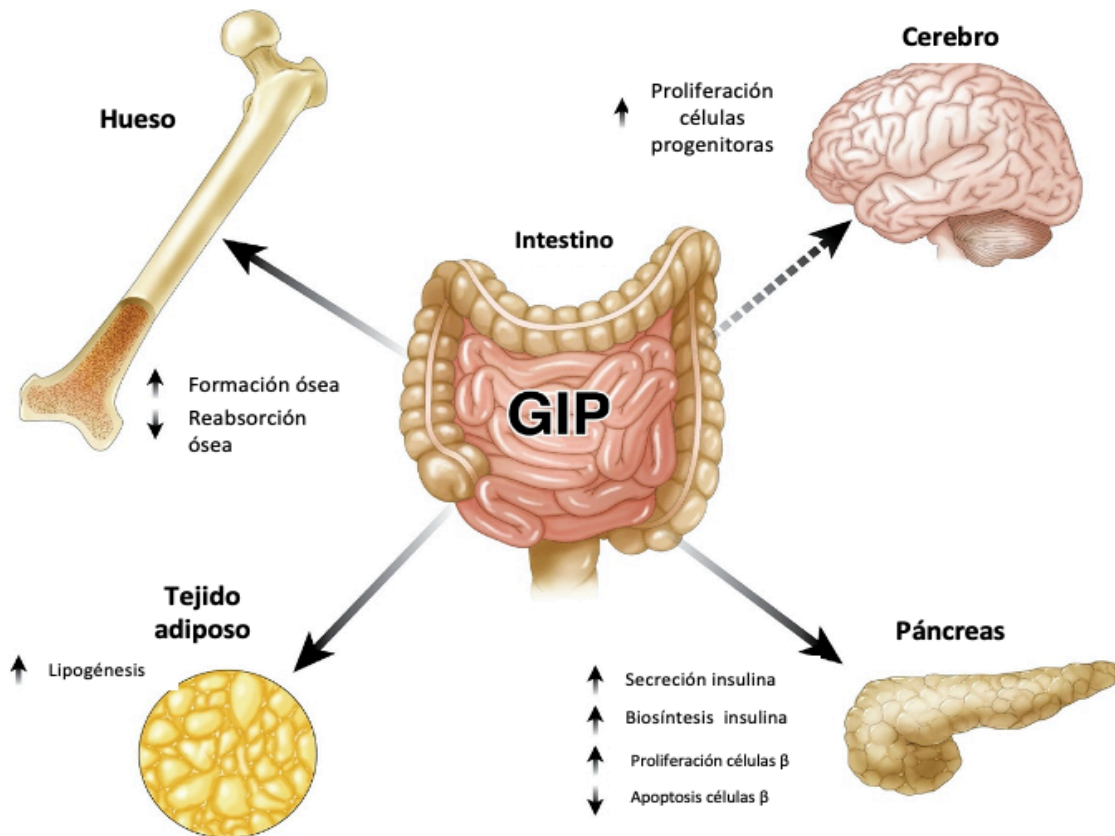
*Adaptada de Drucker (248). GLP-1 juega un papel clave sobre el control fisiológico de la regulación del equilibrio energético y del peso corporal, reduciendo el apetito y mejorando la saciedad)*

#### 4.2.2. POLIPÉPTIDO INHIBIDOR GÁSTRICO (GIP)

GIP es un péptido de 42 aminoácidos es sintetizada en las células enteroendocrinas K, localizadas preferentemente en el duodeno y yeyuno proximal, aunque se distribuyen a lo largo de todo el intestino delgado en menor cantidad (238). GIP es secretada en respuesta a la ingestión de alimentos como HC, especialmente glucosa, y grasas. El receptor de GIP se expresa en numerosos tejidos, de ahí sus múltiples acciones pleiotrópicas (249), (**Figura 18**).

GIP contribuye al efecto incretina al igual que GLP-1, y sus efectos a nivel pancreático son similares a las acciones derivadas de GLP-1, con la diferencia de que no afecta a la secreción de glucagón (249). En pacientes con DM2 el efecto incretina se encuentra disminuido. La expresión del receptor de GIP en numerosos tejidos indica la multitud de acciones de GIP donde a nivel del sistema nervioso central favorece la proliferación de células neuronales progenitoras y tiene la capacidad de producir modificaciones de los comportamientos relacionados con el mecanismo de recompensa, ubicado en la vía mesolímbica (249).

**Figura 18.** Acciones de GLP-1 en tejidos periféricos



Adaptada de Baggio (249).

A nivel del tejido adiposo blanco, aumenta el almacenamiento de grasa por efecto directo, al unirse a sus receptores localizados en el adipocito, pero también de modo indirecto, por su efecto sobre la estimulación a la insulina, que provoca incorporación de ácidos grasos a TG por la estimulación de insulina y favorece la síntesis de ácidos grasos y su re-esterificación. Debido al efecto nulo sobre la secreción de glucagón se reduce la lipólisis (238). Otro de los efectos es que interviene en la remodelación ósea, aumentando su recambio y favoreciendo el depósito del calcio ingerido en el hueso. Solo a dosis supra fisiológicas inhibe la secreción gástrica y, en el hígado, atenúa la producción de glucosa estimulada por glucagón (238, 249).

#### **4.2.3. RESPUESTA DE GIP Y GLP-1 TRAS LA INGESTA**

Los datos existentes en relación a la respuesta de GLP-1 y GIP tras la ingesta, es contradictoria. Varios estudios han analizado el efecto de la ingesta, el tipo y la calidad de los HC que componen ciertos alimentos, como el pan, sobre la secreción de estas hormonas incretinas. Entre estos estudios, un estudio español de González-Antón y cols. (250) indicó que los panes enriquecidos en fibra y a base de cereales integrales disminuyen la secreción de GIP pero no GLP-1 cuando se comparan con pan blanco. Otro estudio (251), demostró que la ingesta de pan de trigo con diferente tamaño de partícula provocaba una respuesta de GLP-1 diferente ya que, tras el consumo de pan elaborado con harina y 85% de granos de trigo, se genera una menor respuesta de GLP-1, que tras el consumo de pan elaborado con trigo harina combinada con salvado de trigo. Sin embargo, otros autores no han descrito efectos diferenciales del consumo de trigo blanco o de pan con cereales integrales, a nivel posprandial de GLP-1 y GIP. Esta amplia variabilidad en la respuesta depende probablemente del hecho de que los HC ejercen un efecto diferente si se ingiere solos o en el interior de una matriz alimentaria como el pan. Por lo tanto, parecen existir muchos factores, entre los que se encuentran las condiciones de fabricación, el tipo de cereales, estructura del almidón, tamaño de partícula del pan e inclusión de otros ingredientes, que afectan las respuestas glucémica y secreción de incretina. En general, la respuesta glucémica posprandial (niveles de glucosa e insulina) de un alimento se altera en presencia de otros alimentos dependiendo de la cantidad y fuente de HC, y si son ingeridos en una comida mixta grasas y proteínas ya sean solos o en combinación. En este sentido, varios autores (252, 253) han analizado este efecto, y concluyeron que tomar una comida mixta de proteínas y grasas combinadas o solas, antes de una ingesta de HC (cargas de glucosa oral de 75 g) mejoró la respuesta de glucosa e insulina, y redujo las tasas de absorción en tracto gastrointestinal, destacando que este efecto fue mayor en sujetos con intolerancia a la glucosa y DM2. Otro estudio (253) analizó los efectos del consumo de grasas (aceite

de oliva) 30 min antes de una comida rica en HC (puré patata) donde observaron que redujo notablemente las tasas de vaciado gástrico y atenuó los aumentos posprandiales de glucosa, insulina y GIP, mientras que la secreción de GLP-1 fue mayor después de la comida de HC en sujetos con DM2 (253). Como comentan los autores, la estimulación de GLP-1 podría haber contribuido a la reducción de la glucemia debido al enlentecimiento del vaciado gástrico y por el estímulo de la secreción de insulina, por su efecto secretagogo. Otro aspecto importante, es el orden en que se consumen los macronutrientes en una comida mixta. Shukla y cols. (254), concluyeron que cuando se consumen en dieta isocalórica en este orden proteínas y grasas y por último los HC, la respuesta posprandial mostrada como AUC disminuye la glucosa e insulina en un 73 % y un 50 % aproximadamente respectivamente, y otro estudio analizó el orden de consumo de verduras, proteínas seguido del consumo de HC, y observaron la mejora o atenuación de la respuesta glucémica pero además un aumento los niveles de GLP-1 cuando se consumía en este orden, en comparación si se tomaba primero el HC, la proteína y la verdura. En consecuencia, la fibra dietética parece contribuir en la mejora de la respuesta glucémica posprandial cuando se consume primero. Estos datos sugieren que el tipo y la secuencia de nutrientes son reguladores clave de la hiperglucemia posprandial por una variedad de mecanismos que involucran vaciamiento gástrico, absorción intestinal de glucosa, liberación de incretinas y secreción de insulina y acción (237). Además, otros factores pueden influir en la liberación de hormonas gastrointestinales, son los productos generados por la microbiota del intestino durante la fermentación de la fibra dietética o prebióticos, como sucede con los AGCC y que pueden estimular la secreción de GLP-1 (238).

#### **4.2.4. EFECTO DE LA ISOMALTULOSA Y SECRECIÓN DE HORMONAS INCRETINAS.**

En sujetos sanos, la isomaltulosa es hidrolizada completamente pero a velocidad más lenta que la sacarosa lo que determina tasas de absorción de glucosa y secreción de insulina más lentas en sangre en comparación con la sacarosa. Los monosacáridos resultantes de la hidrólisis de la isomaltulosa, glucosa y fructosa, se absorben completamente en intestino delgado, sin llegar a intestino grueso y de este modo, no afectando al microbioma intestinal y por tanto, no afectando a las respuestas glucídicas posprandiales dependientes de la microbiota (238). Dadas estas características de la isomaltulosa, es clave para investigar la cinética de la secreción de incretinas en respuesta al IG de los alimentos. En este sentido, varios estudios han demostrado como cargas de isomaltulosa producen respuesta glucémica menor en los niveles de glucosa e insulina, así como los niveles de glucagón y la secreción total GIP siendo significativamente inferiores con isomaltulosa que con sacarosa (255). Por el contrario,



los niveles de GLP-1 fueron significativamente más altos con isomaltulosa que con sacarosa, así como glucosa y niveles de insulina a los 120 min. Estos mismo resultados fueron demostrado en varios estudios con sujetos con DM2 (256, 257). Keller y cols.(258) informó que las bebidas azucaradas con isomaltulosa (con un 50% fructosa) producen una liberación significativamente mayor de GLP-1 en comparación con la ingesta de maltodextrina-sacarosa (con un 12,5% de fructosa), sin embargo, se ha demostrado que la respuesta de GLP-1 es menor después de la ingesta de fructosa pura en comparación con una misma carga de glucosa equicalórica. Este hecho parece depende de la degradación más lenta del enlace glucosídico-1,6 de la isomaltulosa y en consecuencia, llega una mayor proporción de glucosa retardada a la parte distal del íleon donde las células L secretan GLP-1 (258). Por lo tanto, los HC de bajo IG, como bebidas suplementadas con isomaltulosa; se caracterizan por una baja ingesta posprandial, niveles menores de GIP y aumento de las concentraciones de GLP-1 (238).

### **4.3. OTRAS HORMONAS REGULADORAS DEL ESTADO POSPRANDIAL Y DEL APETITO.**

En respuesta a los alimentos y a través de mecanismos de retroalimentación estrechamente coordinados por el SNC, el tracto gastrointestinal segrega varios péptidos que regulan su la función motora y capacidad de absorción, pero también la regulación de los estados de hambre y saciedad, y secreción de hormonas reguladoras del metabolismo como: insulina-glucajón, grelina, GLP-1, GIP, PY, PP y leptina, entre otras (237).

#### **4.3.1.INSULINA**

La insulina es una hormona peptídica anabólica que ejerce multitud de efectos en diferentes tejidos diana (42). La insulina se sintetiza inicialmente como pre-proinsulina, que madura al modificar su conformación en el RE, para convertirse en pro-insulina. Esta pro-insulina se trasloca desde el RE hacia el AG y entra en forma de vesículas inmaduras, convirtiéndose en péptido C e insulina (10, 44). La insulina madura se almacena en forma de gránulos hasta que se activa para ser liberada. La liberación de la insulina se produce cuando existen altas concentraciones de glucosa en sangre, aunque también hay que tener en cuenta, que otras moléculas como aminoácidos, ácidos grasos y otras hormonas pueden inducir la liberación de insulina (259). La insulina juega un papel principal en la regulación de la homeostasis de la glucosa, a través de sus efectos en tejidos sensibles a la insulina. Los niveles de glucosa en sangre están regulados simultáneamente por las tasas de producción de glucosa que se producen preferentemente a nivel renal, y por las tasas de su eliminación de tejidos periféricos, sobre todo por músculo esquelético. El tejido adiposo es un factor clave en este escenario, proporcionando AGNE como combustible alternativo para el músculo esquelético, el hígado, y riñones cuando se produce una reducción de los niveles de glucosa en sangre. Estos mecanismos se apoyan en la secreción de insulina para mantener el sistema metabólico bajo estricto control. Los cambios en la secreción y la acción de la insulina están coordinados por el SNC, regulando el mecanismo de apetito-saciedad, para garantizar el sustrato apropiado a los tejidos para cumplir con las necesidades metabólicas (237, 260).

En condiciones fisiológicas, la insulina se produce en el páncreas por las células  $\beta$  y se libera tras la ingesta de alimentos, pero solo unos pocos nutrientes provocan la secreción por si mismos de insulina, y son denominados iniciadores como la glucosa y leucina o fármacos como las sulfonilureas. Otros nutrientes denominados potenciadores o amplificadores, como son la mayoría de aminoácidos, ácidos grasos, hormonas y neurotransmisores, requieren de un iniciador para producir la secreción de insulina (47). Niveles superiores a 70 mg/dL de glucosa plasmática estimulan la síntesis y liberación pulsátil de insulina. Las comidas son uno de los principales estímulos que genera la liberación de

insulina y tarda entre dos y tres horas en volver a su nivel basal. Del mismo modo que la glucosa regula la insulina, la insulina es el regulador más importante para el equilibrio metabólico de la glucosa. Niveles bajos de insulina disminuyen la síntesis de glucógeno a nivel hepático y muscular, reduciendo la captación de glucosa por los tejidos sensibles, aumentando a la vez, la lipólisis y la gluconeogénesis. Por el contrario, niveles altos de insulina, provocan la captación rápida, el uso y el almacenamiento de la glucosa por la mayoría de los tejidos del organismo, especialmente, músculo, tejido adiposo e hígado, e inducen la síntesis de glucógeno, de proteínas, la lipogénesis, la regulación de expresión de ciertos receptores en células sensibles a la insulina e inhibe la gluconeogénesis hepática (237).

La secreción de insulina es bifásica, formada por una fase inicial, fundamental para la regulación de la glucosa, y una segunda fase clave para mantener la inhibición de glucagón y aumentar el almacenamiento y utilización de glucosa. La fase inicial de la secreción de insulina logra la regulación de la glucosa posprandial gracias a la vía paracrina, que inducen una rápida inhibición de la secreción de glucagón de las células pancreáticas al inicio de la comida. El aumento de la relación insulina/glucagón, inhibe los efectos estimulantes del glucagón en la producción de glucosa por el hígado. En la segunda fase, transcurridos 30 minutos tras el comienzo de la comida, la insulina induce una rápida supresión de la lipólisis, al inactivar la lipasa sensible a hormonas en el tejido adiposo, disminuyendo así los niveles de AGNE y glicerol en sangre. Este hecho es de gran importancia, ya que la disminución de los niveles de AGNE, median la supresión de producción de glucosa endógena en el hígado/riñón y el aumento de las tasas de glucosa utilización en el músculo. Además, la insulina es esencial para la activación de lipoproteína lipasa en el tejido adiposo y la eliminación de TG del torrente sanguíneo después de la comida (237).

#### **4.3.2. GLUCAGÓN**

El glucagón es una hormona peptídica de 29 aminoácidos secretada por las células  $\alpha$  pancreáticas en una situación de hipoglucemia. La secreción de glucagón estaba regulada inversamente por las concentraciones de glucosa en plasma, lo que respalda su papel como una de las principales hormonas reguladoras de la glucosa. En estado posprandial, los niveles de glucagón circulante son bajos, mientras que, en un estado de ayuno prolongado o hipoglucemia, sus niveles aumentan hasta 3 veces (261).

El glucagón está codificado por pro-glucagón, una proteína con 160 aminoácidos que deriva del gen pre-pro-glucagón (262). El glucagón actúa a través del receptor de glucagón, un receptor acoplado a la proteína G, que se expresa preferentemente en el hígado. El efecto principal de glucagón es aumentar las concentraciones de glucosa sanguíneas por parte de hígado mediante la estimulación

de la gluconeogénesis y la glucogenólisis. Además, el glucagón tiene efectos metabólicos no glucémicos que incluyen la modulación de la ingesta de alimentos y la saciedad, efectos sobre el metabolismo de los lípidos y sobre la secreción insulina y el gasto energético. Los niveles de glucagón plasmático aumentan después de la ingestión de una comida mixta contribuyendo a la regulación de la saciedad y, por tanto, ha sido considerado como un posible tratamiento de la obesidad. Sin embargo, el valor terapéutico del glucagón para tratar la obesidad se ve obstaculizado por su propia naturaleza hiperglucémica. Además, la hiperglucagonemia posprandial se ha asociado con la hiperglucemia y el desarrollo de DM2. Una serie de estudios preclínicos y clínicos han demostrado que la inhibición de la señalización del glucagón puede tener efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa en personas con DM2. Sin embargo, se han observado efectos adversos como aumento de la acumulación de grasa hepática y aumento del c-LDL reportados para estos antagonistas en humanos (263).

#### **4.3.3. GRELINA**

La grelina es una hormona orexigénica secretada principalmente por células endocrinas ubicadas en la mucosa del fondo del estómago, células épsilon pancreáticas, y también en otros tejidos como riñones, gónadas (264). La grelina juega un papel importante en la regulación del apetito a corto plazo y se caracteriza por aumentar su secreción en el estado preprandial, para producir un rápido aumento de la motilidad gastrointestinal, y por disminuir sus niveles en estado posprandial. La grelina alcanza sus niveles más bajos antes de que se cumpla una hora del inicio de la comida, y a medida que van aumentando los niveles sanguíneos de las hormonas intestinales. Su acción orexigénica se basa en el aumento del peristaltismo gastrointestinal y en reducir la secreción de insulina dependiente de la glucosa o estimular la secreción de glucagón u otras hormonas contrarreguladoras, sin embargo, a pesar del efecto sobre la estimulación del apetito, se ha observado como en la obesidad, DM2 y el síndrome metabólico se asocian con concentraciones plasmáticas de grelina inferiores (264). En humanos, parece que la cantidad de grelina se correlaciona inversamente con la adiposidad, ya que, en sujetos obesos la concentración plasmática de grelina es menor que la observada en individuos sanos y estos niveles se restauran tras la pérdida de peso (265).

El efecto de la grelina sobre la homeostasis de la glucosa se controla mediante dos procesos clave: a) a través de la secreción de insulina por las células  $\beta$ ; y b) por medio de la sensibilidad de insulina de los tejidos periféricos. En este sentido, se sugiere que la presencia del receptor grelina en las células  $\beta$ , tiene un papel regulador en la secreción de insulina, mediante un mecanismo de retroalimentación inversa entre la grelina y la insulina. De hecho, en una situación de hiperinsulinemia, la insulina es capaz

de suprimir las concentraciones de grelina circulantes, independientemente de los cambios en las concentraciones de glucosa plasmática. Esto ha sido confirmado en varios estudios, entre ellos Broglio y cols., quienes demostraron que la administración aguda de grelina en personas sanas producían aumentos rápidos de los niveles de glucosa en sangre, seguido de una disminución en los niveles de insulina, independiente de hormona de crecimiento (266). Además, la grelina tiene otros efectos biológicos: tiene capacidad de inducir la secreción de la hormona del crecimiento, modula la actividad cardíaca, regula el ciclo sueño-vigilia y el metabolismo de lípidos y glúcidos. También se han demostrado sus efectos estimuladores de la motilidad gástrica y la secreción ácida así como efectos anti-proliferativos y anti-apoptóticos en diversos tejidos (267).

#### **4.3.4. LEPTINA**

La leptina es una hormona anorexigénica sintetizada principalmente por el tejido adiposo, aunque también es producida por otros tejidos, incluido estómago, músculo esquelético, glándula pituitaria y glándula mamaria (268). Aunque la leptina inicialmente fue reconocida por su papel en la regulación del mecanismo del apetito como un factor clave, ahora se conoce que está implicada en una multitud de funciones biológicas, incluyendo la regulación de la homeostasis de la glucosa (269).

Desde el aspecto fisiológico, la leptina circulante inhibe la ingesta de alimentos, regula el metabolismo mientras aumenta el gasto energético. Por otro lado, la disminución de los niveles séricos de leptina estimulan la ingesta de alimentos al mismo tiempo que disminuye la utilización de energía. La función de la leptina esta regulada por su unión con su receptor en los distintos tejidos diana. La mayor parte de sus funciones, se deben a su acción sobre el SNC, en concreto en el hipotálamo en el núcleo arcuato (NArq), pero también se ha observado que se expresa en otros tejido, entre ellos órganos digestivos. A nivel del SNC la leptina como hormona anorexigénica, inhibe el apetito al contrarrestar la acción de NPY.

La expresión de la leptina en el sistema digestivo ha demostrado varias funciones entre ellas, la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos (268). También a nivel del estómago, la liberación de la leptina se produce por el estímulo del consumo de alimentos y hormonas gastrointestinales como CCK, o la gastrina, entre otras, aumentando la actividad sobre el nervio vago y contribuyendo al vaciado gástrico, y con ello a la saciedad. También modula funciones intestinales a través de la acción que existe sobre el SNC y las señales vágales, y se ha demostrado como aumenta la absorción de HC posprandial por una mayor expresión de los transportadores de HC y GLUT-2 y GLUT-5 así como SGLT-1 activando las vías metabólicas, que contribuyen a la captación de glucosa.

Además posteriormente a la ingestión de alimentos, la leptina reduce la liberación de lípidos plasmáticos al inhibir la apolipoproteína A-IV, apolipoproteína B-100 y apolipoproteína B-48. Además controla la homeostasis de la glucosa por la supresión de la gluconeogénesis y la lipogénesis *de novo* hepática y el aumento de la secreción de TG a nivel hepático (268, 269).

Los niveles de leptina, aportan información a los centros que regulan la homeostasis energética, de las reservas de energía corporales existentes (264), cuya concentración plasmática es proporcional a la cantidad de grasa corporal acumulada y su acción sobre las neuronas hipotalámicas para inhibir la ingesta de alimentos y aumentar el gasto de energía, lo que lleva a una reducción en el peso corporal. Por lo tanto, la pérdida de acción de la leptina tiene como resultado hiperfagia, reducción del gasto de energía y obesidad importante (269). La obesidad se ha asociado con un estado de RI, donde los niveles de leptina circulante son elevados comparados con sujetos delgados. Este estado de resistencia de leptina, se produce por la secreción de leptina proporcional al acúmulo de tejido adiposo junto con la pérdida de función de la leptina producida por incapacidad de los receptores en los diferentes tejidos diana en los que actúa de generar la señalización adecuada en los tejidos diana, principalmente en hipotálamo (270).

Además la deficiencia de leptina no solo conduce a la obesidad, sino también a DM2. Los niveles de leptina e insulina están directamente interconectados con el peso corporal y tejido adiposo (271), ya que la leptina tiene un gran poder sobre la homeostasis energética por acción SNC, pero también tiene efectos directos sobre la regulación de secreción de insulina por las células  $\beta$  (272). En el cerebro tanto la insulina y la leptina inhiben el apetito, y es posible que la leptina produzca la RI, al reducir la acción de la insulina o la señalización de la insulina en varios tipos de células (273). Además las acciones directas e indirectas de leptina en los tejidos diana periféricos es posible que también contribuyan en la homeostasis de la glucosa (y por tanto, contribuir a la DM2 (271).

#### **4.3.5. NEUROPEPTIDO Y, PEPTIDO Y Y POLIPEPTIDO PANCREATICO**

La familia de péptidos biológicamente activos la forman NPY, PY y PP. Estos tres péptidos se expresan en distintos niveles del "eje intestino-cerebro" (274). Esta familia de péptidos ejerce sus funciones a través de cinco receptores de membrana acoplados a proteínas G, denominados Y1, Y2, Y4, Y5 e Y6, que se clasifican según su distribución y su diferente afinidad por PY, PP y NPY (265). PY y PP se expresan casi exclusivamente a nivel de sistema digestivo, mientras que NPY se encuentra en todos los niveles del eje intestino-cerebro y regula la ingesta de alimentos actuando principalmente a través de los receptores Y1 e Y5 (265).

#### 4.3.5.1. PÉPTIDO Y (PY)

PY se sintetiza en las células L del intestino delgado distal, en colon y recto (236, 275), pero también está presente en estómago, páncreas y determinadas regiones del SNC (275). PY es una hormona polipeptídica que inicialmente se libera como una molécula  $PY_{(1-36)}$  constituida por 36 aminoácidos, que contiene un residuo de tirosina en cada uno de sus extremos. Sin embargo, el total de PY liberado, aproximadamente un 40%, pierde sus dos aminoácidos iniciales por acción de la enzima DPP-4 y se convierte en  $PY_{(3-36)}$ , siendo la forma activa y mayoritaria en circulación.  $PY_{(3-36)}$  tiene una afinidad más específica por los receptores Y2, distribuidos principalmente ubicado en el NARq del hipotalámico, el hipocampo, el intestino y el nervio vago (236, 265).

La secreción de PY depende de la ingesta calórica y de la composición de los alimentos, y es estimulado fundamentalmente por los lípidos, ya que estos producen una mayor y sostenida elevación de PY en comparación con la glucosa. Otros factores como las sales biliares, el ácido gástrico y la CCK, entre otros, parecen estimular su secreción, mientras que la distensión gástrica no le afecta (265). Durante el ayuno, los niveles plasmáticos de PY se mantienen bajos y aumentan a los 15-30 min tras el comienzo de cada comida, alcanzando sus niveles máximos a los 60-90 min, y permanecen elevados durante 6 h (236). Una vez es liberado a la sangre, el PY tiene múltiples efectos sobre sistema CV y renal (265). Además, contribuye a la regulación glucémica a través de varios mecanismos, pero parece que no afecta a la secreción de insulina (236). En primer lugar, la secreción intestinal de  $PY_{(3-36)}$  parece mejorar la sensibilidad a la insulina, producido por el aumento de la captación de glucosa en tejido muscular y adiposo, visto en estudios experimentales en ratones que fueron alimentados con alto contenido de grasa durante una hiperinsulinemia. En segundo lugar,  $PY_{(1-36)}$  molécula predecesora de  $PY_{(3-36)}$ , parece estimular el páncreas paracrino, mediante la proliferación de células de los islotes e inhibiendo la apoptosis de células  $\beta$ , mejorando así la integridad celular que regulaba el metabolismo de la glucosa (276). En tercer lugar, la disminución en el vaciamiento gástrico producido por  $PY_{(3-36)}$  parece conducir a reducciones en la glucemia. Curiosamente, comidas mixtas en HC y en grasa parece producir una menor secreción de PY en pacientes con DM2. Para confirmar este efecto, Viardot y cols. comparó sujetos con fuertes antecedentes familiares de DM2 emparejados en RI, edad e IMC con sujetos sin antecedentes familiares de DM2. La respuesta de PY a las comidas ricas en HC estuvo alterada en los sujetos con riesgo de DM2, lo que sugiere que la secreción defectuosa de PY puede estar relacionada causalmente con DM2 (236). Sin embargo, la administración de PY a seres humanos no parece modificar las concentraciones circulantes de insulina, leptina, GLP-1 o PP, aunque sí inhibe la secreción de grelina. También se ha observado que la

secreción de PY en respuesta a la ingestión de grasas depende en gran medida de la CCK (277). En la obesidad, los valores de PY están reducidos respecto a los sujetos delgados. El PY exógeno reduce el vaciado gástrico al igual de GLP-1 y CCK (265), y es posible que su efecto anoréxico dependa del balance energético general y la señalización de leptina (244).

#### **4.3.5.2. PÉPTIDO PANCREÁTICO (PP)**

PP es una proteína de 36 aminoácidos, producida principalmente en las células PP del páncreas endocrino, situadas en la periferia de los islotes de Langerhans del páncreas, aunque también se ha detectado la expresión de PP en el páncreas exocrino y en regiones distales del tracto gastrointestinal como el colon o el recto (265). Además, su secreción se ve favorecida por la CCK o grelina mientras que la somatostatina la inhibe (274). Los niveles plasmáticos de PP permanecen elevados hasta 6 h después de la ingestión de alimentos y su secreción está fuertemente estimulada por comidas ricas en proteínas y grasas, aunque también existe correlación entre la secreción de PP y las calorías ingeridas (278).

Dentro de los efectos biológicos que se le atribuyen se incluye la regulación de la función hepática en la producción de glucosa, el retraso del vaciamiento gástrico, la disminución de la motilidad intestinal y la reducción de la producción de ácidos biliares. El PP también parece tener efecto sobre el control del apetito con respuesta anorexigénica. De hecho, el PP periférico actúa como una señal de saciedad tanto en ratones como en humanos (278). La administración periférica crónica de PP en ratones obesos produce un menor incremento de peso y mejora la RI y la dislipemia (265).

#### **4.3.5.3. NEUROPÉPTIDO Y (NPY)**

El NPY es un péptido de 36 aminoácidos distribuido ampliamente en el cerebro, pero principalmente se sintetiza en el NArq. El NPY activa una gran cantidad de neuronas orexigénicas y anorexigénicas. Es por ello que es considerado uno de los neurotransmisores más importantes implicados en la producción de hambre y saciedad, junto con la proteína relacionada con Agouti (AgRP). Agouti es un potente péptido anorexigénico, clave en la modulación del balance leptina e insulina e integra una variedad señales neuronales nutricionales con regulación del balance energético.

Además, el NPY disminuye la expresión de enzimas lipogénicas en el tejido adiposo, aumenta la acumulación de grasa y disminuye el gasto energético. Por otro lado, el aumento de leptina y CCK, estimulan a las neuronas anorexigénicas del NArq y estimulan la producción de melanocortinas, péptidos derivados de la molécula de pro-opiomelanocortina (POMC), mecanismo asociado con los efectos de la leptina, por lo que se inhibe el apetito y aumenta la actividad del sistema nervioso



simpático, lo que reduce la secreción basal de insulina y en consecuencia controla el peso corporal (274). El NPY disminuye de forma proporcional a la concentración de leptina y con niveles elevados de insulina, y aumenta con niveles elevados de grelina, hormona del crecimiento y otros glucocorticoides.

#### **4.3.6. ACIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (AGNE)**

Los AGNE o AGL son un importante sustrato energético para el organismo. A nivel endógeno proceden de la hidrólisis de los TG almacenados en el tejido adiposo, siendo el tejido adiposo subcutáneo su principal fuente. Los TG intracelulares se hidrolizan mediante el proceso de lipólisis y liberan AGNE a la circulación, que son transportados unidos a una albúmina plasmática hasta el órgano donde requiere dicho sustrato energético. Además, una pequeña porción de AGL son re-esterificados para formar de nuevo TG en los adipocitos. La lipólisis del tejido adiposo está regulada por una serie de señales hormonales paracrinas, como catecolaminas, y autocrinas donde la insulina es el principal regulador de la producción de AGNE, por su acción antilipolítica que inhibe rápidamente la lipólisis en el adipocito. Sin embargo, la dieta es una de las principales variables fisiológicas que inciden en la señalización hormonal. De hecho, este puede ser el motivo principal por el cual las concentraciones de AGNE disminuyen en estado posprandial, especialmente con la ingesta de HC, debido al aumento de la concentración de insulina, que pretende regular los niveles de glucosa posprandial, pero a su vez, suprime la movilización de grasas por su acción antilipolítica (279, 280). Por el contrario, en estado de ayuno las concentraciones de AGNE están en sus niveles más elevados, asociado con niveles reducidos de insulina y dependiente de las necesidades energéticas (279). Además, la regulación hormonal se ve modificada por intervenciones a largo plazo en el equilibrio energético, como la restricción o intervención dietética y/o el entrenamiento físico, y se altera en algunos estados patológicos, como la obesidad o la DM2.

En la obesidad, se piensa que las concentraciones de AGNE están aumentadas, posiblemente debido a la existencia de mayor cantidad de masa de tejido adiposo y RI, lo que contribuye a su vez al aumento de la lipólisis del tejido adiposo (279). Sin embargo, estudios recientes han obtenido resultados divergentes, observado cómo la cantidad de masa de tejido adiposo no aumenta las concentraciones de AGNE. Por el contrario, un estado de RI parece una de las causas de aumento de las concentraciones de AGNE como ocurre en DM2, síndrome metabólico, incluso en una obesidad con RI. A su vez, varios estudios han demostrado, entre ellos el desarrollado por Eckel y cols., como la sobreabundancia de AGNE contribuye a la RI tanto hepática como periférica (52), por lo que la causa concreta no se conoce. Uno de los efectos más importante del aumento de la concentración de AGNE

se produce a nivel hepático, debido sobre todo a la incompleta supresión de la lipólisis por la RI, siendo este el uno de los inicios para el desarrollo de los trastornos lipídicos característicos de estas enfermedades, como por ejemplo, la HTG (281). Además, los AGNE están directa e indirectamente asociados con muchos procesos fisiológicos, como el control del glucógeno, metabolismo lipídico, la regulación de la saciedad, el mantenimiento del peso corporal y la regulación de inflamación, vasodilatación y replicación celular básica.

El metabolismo de las grasas e HC y las concentraciones plasmáticas de AGNE están íntimamente interrelacionados entre sí, por tanto, cualquier alteración asociada, así como su metabolismo, son una causa y una consecuencia de RI y DM2. A su vez, algunas de las complicaciones asociadas a la RI, como ECV aterosclerosis, EHGNA, incluso aumentos en las cifras de tensión arterial, son consecuencias de un metabolismo desregulado de los AGL (47).

La acumulación de lípidos hepáticos puede ser debido al resultado de LNH, la esterificación de AGL en plasma o el aumento de la ingesta de grasas a través de la dieta. La LNH, la ingesta dietética y la lipólisis de adipocitos son contribuyentes importantes de la EHGNA, patología asociada a su vez con estas enfermedades metabólicas (282). Además, la LNH es un proceso mediante el cual los lípidos se sintetizan de forma endógena a partir de fuentes dietéticas, generalmente HC o depósitos de energía almacenados. A nivel nutricional, la composición de HC y grasas de una dieta puede influir en la concentración de AGNE posprandiales. Especialmente después de una comida, los ácidos grasos ingeridos pueden constituir hasta el 50% de los AGL circulantes, ya que algunos de los AGL desesterificados se liberan en el plasma y provoca un desbordamiento, y con el resultado del aumento de las concentraciones de AGNE. En otras ocasiones, la lipólisis y la LNH juegan papeles principales en la definición de la composición de los AGL circulantes. Sin embargo, estudios recientes de grandes cohortes y revisiones sistemáticas de estudios de intervención no han encontrado asociación entre la ingesta total de grasas en la dieta, interpretada a partir del porcentaje de calorías totales, y la incidencia de DM2 (281). El consumo excesivo de una dieta alta en grasas y el aumento de la ingesta de bebidas azucaradas parecen ser uno de los principales FR para el desarrollo de EHGNA, pero también de SM, obesidad y DM2.

Hoy en día, y en especial en las dietas modernas y occidentales, el azúcar más consumido es el jarabe de maíz, con alto contenido de fructosa. El consumo de fructosa aumenta los niveles de las enzimas involucradas en LNH, incluso más fuertemente que una dieta alta en grasas debido a que el metabolismo de la fructosa es particularmente lipogénico. La fructosa se absorbe a través de la vena porta, por lo que llegará al hígado en concentraciones mucho más altas que al resto de tejidos.

Además, la fructosa favorece la lipogénesis en el contexto de la RI, ya que no requiere la acción de la insulina para su metabolismo y estimula directamente a la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP1c), el cual es importante regulador transcripcional de LNH. La fructosa también conduce al agotamiento de ATP y la supresión de la oxidación de ácidos grasos mitocondriales, aumentando así, la producción de ERO2. Además, la fructosa promueve el estrés en el RE y la formación de ácido úrico, las cuales son vías adicionales independientes de la insulina que también conducen al LNH. En resumen, el metabolismo de los HC, especialmente la fructosa aumenta el LNH, en comparación a una ingesta dietética elevada en grasa (281), y posiblemente sea uno de los mecanismos que expliquen el aumento de los niveles de AGNE, en personas con DM2, síndrome metabólico y obesidad.

# JUSTIFICACIÓN



La elevada incidencia de DM2 y otras enfermedades cardiometabólicas relacionadas con la dieta como la obesidad, las ECV o la dislipemia, constituyen las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, y conllevan una gran pérdida de años de vida por la discapacidad que producen (23). Estas enfermedades cardiometabólicas se han convertido en un gran problema de salud pública global por su gran impacto socio-sanitario y económico, lo que ha generado que las investigaciones se centren en la identificación de los factores de riesgo como una de las prioridades científicas y de salud pública (129).

En la etiología de estas enfermedades cardiometabólicas, especialmente sobre la DM2, influyen múltiples factores como el envejecimiento, antecedentes familiares y susceptibilidad genética, así como otros factores ambientales, pero el factor causal principal son los factores relacionados con el estilo de vida, muy especialmente los factores dietéticos inadecuados y el sedentarismo, y el exceso de grasa corporal sobre todo a nivel abdominal (28).

En los últimos años, la evidencia científica desarrollada ha probado que la intervención sobre el estilo de vida, mediante cambios de dietas poco saludables y la promoción de mejores patrones dietéticos, es capaz de conseguir una disminución de la incidencia de la DM2. Esto pone de manifiesto que la prevención es la mejor estrategia para abordar el impacto ocasionado por estas enfermedades crónicas y especialmente la DM2. Por ello, las principales instituciones sanitarias y de investigación coinciden en que se han de concentrar los esfuerzos en esta línea, explorando e identificando estrategias que aborden el sobrepeso y la obesidad, y mejoren los factores dietéticos de la población, con el fin último de una prevención y manejo precoz de las patologías cardiometabólicas (130-132). Además, es necesario conocer los mecanismos reguladores y respuestas metabólicas sobre las cuales intervienen los diferentes alimentos que componen nuestra alimentación, con el fin de establecer cuál es la composición más adecuada y fomentar aquellos alimentos que maximicen los beneficios fisiológicos, sin perder por ello, la variabilidad y palatabilidad de la alimentación, que permita conseguir una adherencia adecuada. Esto permitiría, además, establecer recomendaciones nutricionales específicas y sólidas a la población general o aquellos sujetos con alguna patología en particular, donde la dieta constituye el eje principal del manejo terapéutico, como en el caso de la DM2 (110).

En este contexto, se plantea el presente estudio en el que se exploró, el efecto del consumo de una cerveza sin alcohol con composición de HC modificada, que incluyó la fermentación casi completa de los mismos y la adición de isomaltulosa y una maltodextrina resistente, sobre la respuesta postprandial, en comparación con otras intervenciones. La hipótesis de esta investigación es que esta cerveza sin

alcohol modularía la respuesta glucémica a los HC ingeridos con la dieta, pudiendo ser este mecanismo el potencial mediador de la mejora de la resistencia periférica a la insulina y manejo glucémico que se observó con la ingesta de esta bebida en un estudio previo, realizado en sujetos con DM2 y sobrepeso u obesidad (152).

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## **HIPÓTESIS**

El consumo de cerveza sin alcohol con una composición de HC modificada, que incluye la fermentación casi completa de los mismos y la adición de isomaltulosa y una maltodextrina resistente (CIM), induce un menor IG y una menor CG que una cerveza sin alcohol con composición estándar (CE). Y el consumo de la cerveza sin alcohol con composición modificada, junto a una carga de 50 gramos de HC, induce una mejor respuesta metabólica posprandial incluyendo una mayor síntesis de incretinas y una mayor inhibición de la saciedad, en comparación con la ingesta de una cerveza sin alcohol con composición estándar o agua. Este mecanismo sería el potencial mediador de la mejora de la RI y manejo glucémico, recientemente descritos tras el consumo de la cerveza sin alcohol con composición modificada en sujetos con DM2 y sobrepeso u obesidad.

## **OBJETIVOS**

### ▪ **General**

El objetivo principal del estudio consistió en explorar el IG y la CG inducidos por la cerveza sin alcohol con composición modificada a la que se le ha realizado una fermentación casi completa de los HC y se le han añadido isomaltulosa y una maltodextrina resistente (CIM), así como su respuesta metabólica posprandial, en comparación con el efecto inducido por: a) una cerveza sin alcohol con composición estándar (CE); b) una cerveza sin alcohol con composición modificada con una fermentación casi completa de los HC y a la que se le ha añadido una maltodextrina resistente (CM)..

### ▪ **Específicos**

Para la consecución del objetivo anteriormente planteado se plantea el desarrollo de dos estudios con los siguientes objetivos específicos:

#### ○ Estudio 1

El objetivo del primer estudio fue explorar el efecto del consumo, en ayunas, de 25 g de HC procedentes de una cerveza sin alcohol con una composición modificada (con una fermentación casi completa de los HC a la que se le ha añadido isomaltulosa y una maltodextrina resistente (CIM) en comparación con la ingesta de: a) 25 g de HC procedentes de una cerveza sin alcohol con composición estándar (CE); b) 25 g de HC procedentes de una cerveza sin alcohol con composición modificada (donde se ha realizado

una fermentación casi completa de los HC y se le ha añadido una maltodextrina resistente (CM); c) 25 g de HC procedentes de glucosa sobre:

- I. El IG y CG.
- II. El metabolismo glucídico (glucosa e insulina).
- III. El metabolismo lipídico (TG y AGNE).
- IV. Hormonas incretinas (GLP-1 y GIP).

○ Estudio 2

El objetivo del segundo estudio fue explorar el efecto del consumo, en ayunas, de 50 g de HC procedentes de pan blanco junto con 14,3 g de HC procedentes de una cerveza sin alcohol con una composición modificada con una fermentación casi completa de los HC a la que se le ha añadido isomaltulosa y una maltodextrina resistente (CIM), en comparación con la ingesta de la misma cantidad de HC procedentes de pan blanco junto con: a) 14,3 g de HC procedentes de una cerveza sin alcohol con composición estándar (CE); b) 14,3 g de HC procedentes de una cerveza sin alcohol con composición modificada donde se ha realizado una fermentación casi completa de los HC y se le ha añadido una maltodextrina resistente (CM); c) 14,3 g de HC procedentes de pan blanco; d) agua mineral, sobre:

- I. El IG y CG.
- II. El metabolismo glucídico (glucosa e insulina).
- III. El metabolismo lipídico (TG, AGNE, c-HDL y c-LDL).
- IV. Hormonas incretinas (GLP-1 y GIP), otras hormonas gastrointestinales (PY, PP, glucagón y grelina) y adipoquinas (leptina).

# **MATERIAL Y MÉTODO**



## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **1. SUJETOS A ESTUDIO**

Se incluyeron varones y mujeres sanos y mayores de edad, que fueron visitados en la Unidad de Investigación Clínica del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón) ubicada físicamente en el Hospital Universitario Miguel Servet.

- Los criterios de inclusión establecidos fueron:

- Edad comprendida entre los 18 y 80 años.
- Índice de masa corporal comprendido entre 18 y 27,5 kg/m<sup>2</sup>.
- Dar consentimiento informado por escrito de participación voluntaria en el estudio, tras haber leído la hoja de información al participante, y haber resuelto las dudas que pudieran derivar de la misma.

- Los criterios de exclusión para la participación en el estudio para los sujetos que cumplieran los criterios de inclusión fueron:

- Presencia de patología cardiometabólica como dislipemia (definida por cifras de CT > 200 mg/dL y/o TG > 150 mg/dL, y/o toma de fármacos hipolipemiantes), prediabetes o DM1 o DM2 (definida por cifras de glucosa  $\geq$  100 mg/dL y/o Hb1Ac  $\geq$  5,7% y/o toma de fármacos hipoglucemiantes) o hipertensión arterial sin tratamiento farmacológico.
- Presencia de otras patologías crónicas que pudieran interferir en los resultados del estudio como enfermedad cardiovascular, enfermedad renal, enfermedad tiroidea o enfermedad hepática.
- Presencia de síndromes de malabsorción intestinal y/o presencia de enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.
- Uso de fármacos que pudieran interferir sobre el metabolismo lipídico y/o glucídico.
- Presencia de alguna alteración analítica que pudiera condicionar los resultados del estudio.
- Aumento o disminución de peso corporal de  $\geq$  5 kg en los últimos 6 meses.
- Intolerancia al gluten.
- Ingesta habitual de alimentos funcionales como fitoesteroles o levadura de arroz rojo, que tengan un efecto significativo sobre el metabolismo lipídico o glucídico, en las últimas 6 semanas.
- Ingesta de suplementos vitamínicos.

- Terapia hormonal sustitutiva.
- Ingesta elevada de alcohol (> 30 gramos de etanol) de forma habitual.
- Embarazo o intención de embarazo durante el estudio.
- Enfermedad grave de cualquier tipo con esperanza de vida inferior a 1 año o que, a juicio de los investigadores, limite una alimentación homogénea a lo largo del estudio.
- Cualquier otra circunstancia que, a juicio de los investigadores, impida el seguimiento adecuado de la intervención nutricional planteada (ej.: viajes frecuentes durante el estudio, imposibilidad de acudir a visitas por circunstancias personales o laborales, etc.).

## **2. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Todos los participantes debieron firmar un consentimiento antes de su entrada en el estudio. El consentimiento fue obtenido por uno de los investigadores del estudio. El consentimiento se acompañó de una hoja de información al participante donde se explicaban los objetivos, la metodología, los beneficios e inconvenientes de la intervención, la voluntariedad de la participación y del equipo investigador. El estudio fue valorado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA).

## **3. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Para la consecución de los objetivos planteados en el estudio, se establecieron dos fases, incluyendo dos estudios (estudio 1 y estudio 2). La realización de dos estudios, en el marco del objetivo general, respondió a la necesidad de dos metodologías diferentes para responder a los diferentes objetivos específicos. Por otra parte, este diseño permitió reclutar a diferentes sujetos que tuvieron que acudir a un total de 5 visitas en el estudio al que fueron reclutados, minimizando así los inconvenientes que pudiesen surgir de la participación para ellos/as en relación a su rutina diaria.

El estudio 1, tuvo como objeto explorar el efecto de las diferentes cervezas sin alcohol (CE, CIM y CM) sobre el IG, CG y parámetros del metabolismo lipídico, glucídico y hormonas intestinales (GLP-1 y GIP) tras su administración en ayunas, en comparación con una bebida a base de glucosa. El estudio 2, tuvo por objeto explorar el efecto de las diferentes cervezas sin alcohol (CE, CIM, CM) sobre el IG, CG y parámetros del metabolismo lipídico, glucídico y hormonas intestinales (GLP-1 y GIP) tras su administración junto a 50 g de HC disponibles (administrados en forma de pan blanco), en comparación con el aporte de esta misma cantidad de HC a base de pan blanco y el consumo de agua

○ **Estudio 1**

El **estudio 1** (esquemático en la **Figura 19**) es un estudio controlado, doble-ciego, aleatorizado y cruzado en el cual se incluyeron 10 sujetos sanos que fueron sometidos a las siguientes intervenciones en ayunas:

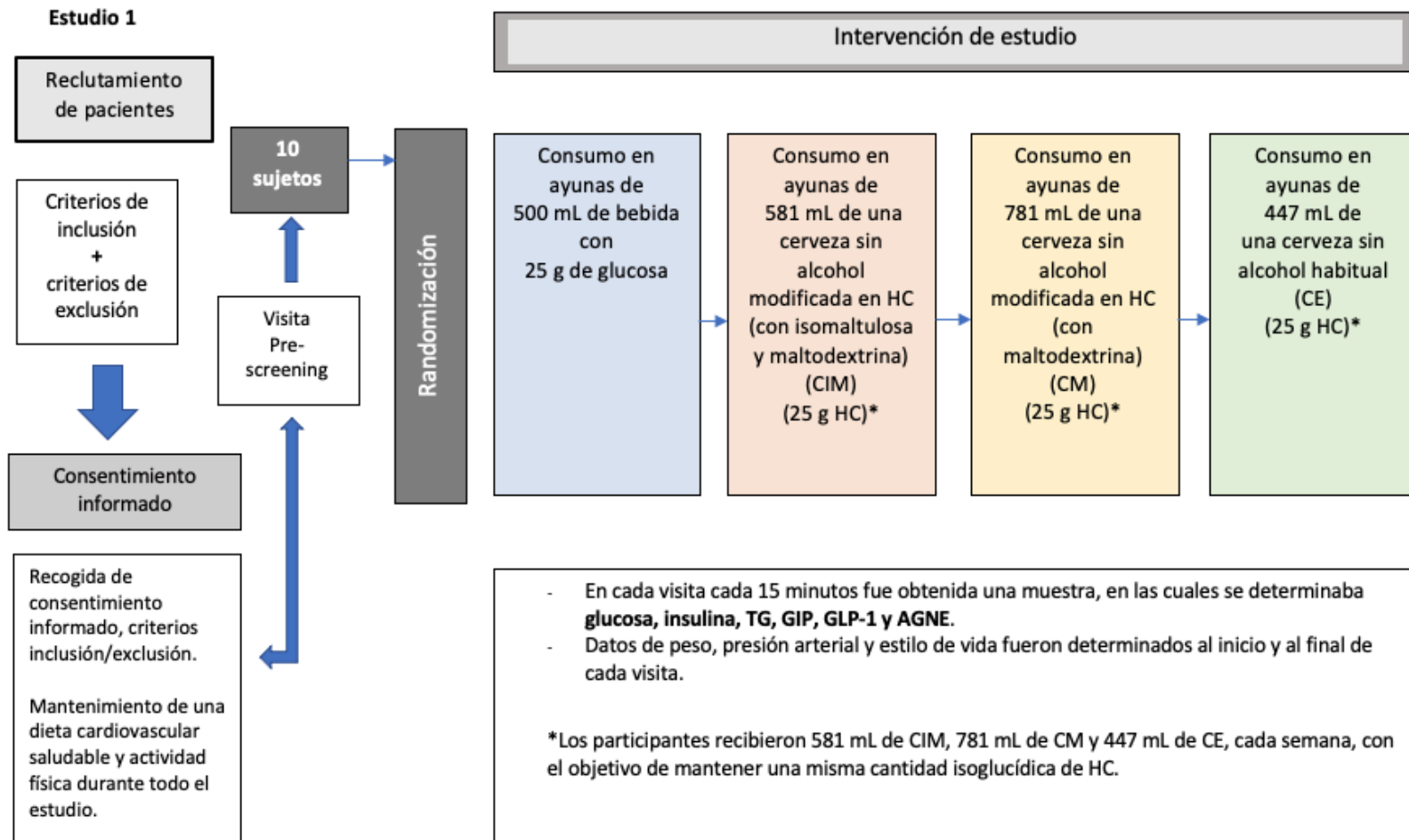
- **Semana 1:** La primera visita a estudio incluyó la toma, en ayunas, de una bebida que contenía 25 g de glucosa, y que se consideró la referencia, o grupo comparativo sobre la determinación del cálculo del IG y de la CG, así como del resto de parámetros, generados por las 3 intervenciones restantes. El AUC inducida por la toma de este alimento para cada uno de los parámetros a estudio, constituyó la referencia para comparar las AUC inducidas por el resto de intervenciones, para cada uno de los parámetros a estudio.
- **Semana 2:** La segunda visita a estudio incluyó la toma, en ayunas, de cerveza sin alcohol con composición de HC modificada, en la que se había realizado una fermentación casi completa de los HC y a la que se había añadido isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g /100 mL)(CIM). Se aportó la cantidad de cerveza suficiente para administrar 25 g de HC, lo que supuso 581 mL de esta bebida, teniendo en cuenta la composición nutricional de esta cerveza sin alcohol (**Tabla 1**).
- **Semana 3:** La tercera visita a estudio incluyó la toma, en ayunas, de cerveza sin alcohol con composición de HC modificada, en la que se ha realizado una fermentación casi completa de los mismos y a la que se había añadido una maltodextrina resistente (2,0 g/100 mL) (CM). Se aportó la cantidad de cerveza suficiente para administrar 25 g de HC, lo que supuso 781 mL de esta bebida, teniendo en cuenta la composición nutricional de esta cerveza sin alcohol (**Tabla 1**).
- **Semana 4:** La cuarta visita a estudio incluyó la toma, en ayunas, de cerveza sin alcohol con composición estándar (CE). Se aportó la suficiente cantidad de cerveza para administrar 25 g de HC, lo que supuso 447 mL de esta bebida, teniendo en cuenta la composición nutricional de esta cerveza sin alcohol (**Tabla 1**).

El orden de las intervenciones correspondientes a la semana 2, 3 y 4 fue variable para cada sujeto, con el objetivo de evitar el sesgo que pudiera inducir el orden de las mismas sobre los resultados obtenidos. Los participantes fueron aleatorizados a una u otra secuencia de intervención mediante



un sistema informático. Los sujetos a estudio y los investigadores que procesaron los datos y realizaron el análisis estadístico de los mismos eran desconocedores del tipo de cerveza sin alcohol que los participantes estuvieron tomando en cada intervención. Dos investigadores del estudio llevaron a cabo el análisis de la composición nutricional de cada una de las cervezas (**Tabla 1**) y desarrollaron envases homogéneos en los que se envasaron las diferentes cervezas a estudio y les otorgaron una codificación. Un tercer investigador, conocedor de esta composición y codificación, se encargó de la preparación de las bebidas a estudio y de la administración de las mismas a los participantes. Esta codificación fue utilizada durante todo el estudio para el proceso de aleatorización e intervención, desvelándose a qué bebida corresponde cada factor una vez los resultados del estudio habían sido analizados. Los tres investigadores conocedores de la composición de las cervezas sin alcohol y su codificación permanecieron al margen del proceso analítico de los resultados que, por lo tanto, permaneció ciego en las diferentes intervenciones realizadas.

Figura 19. Descripción del diseño de estudio 1



○ **Estudio 2**

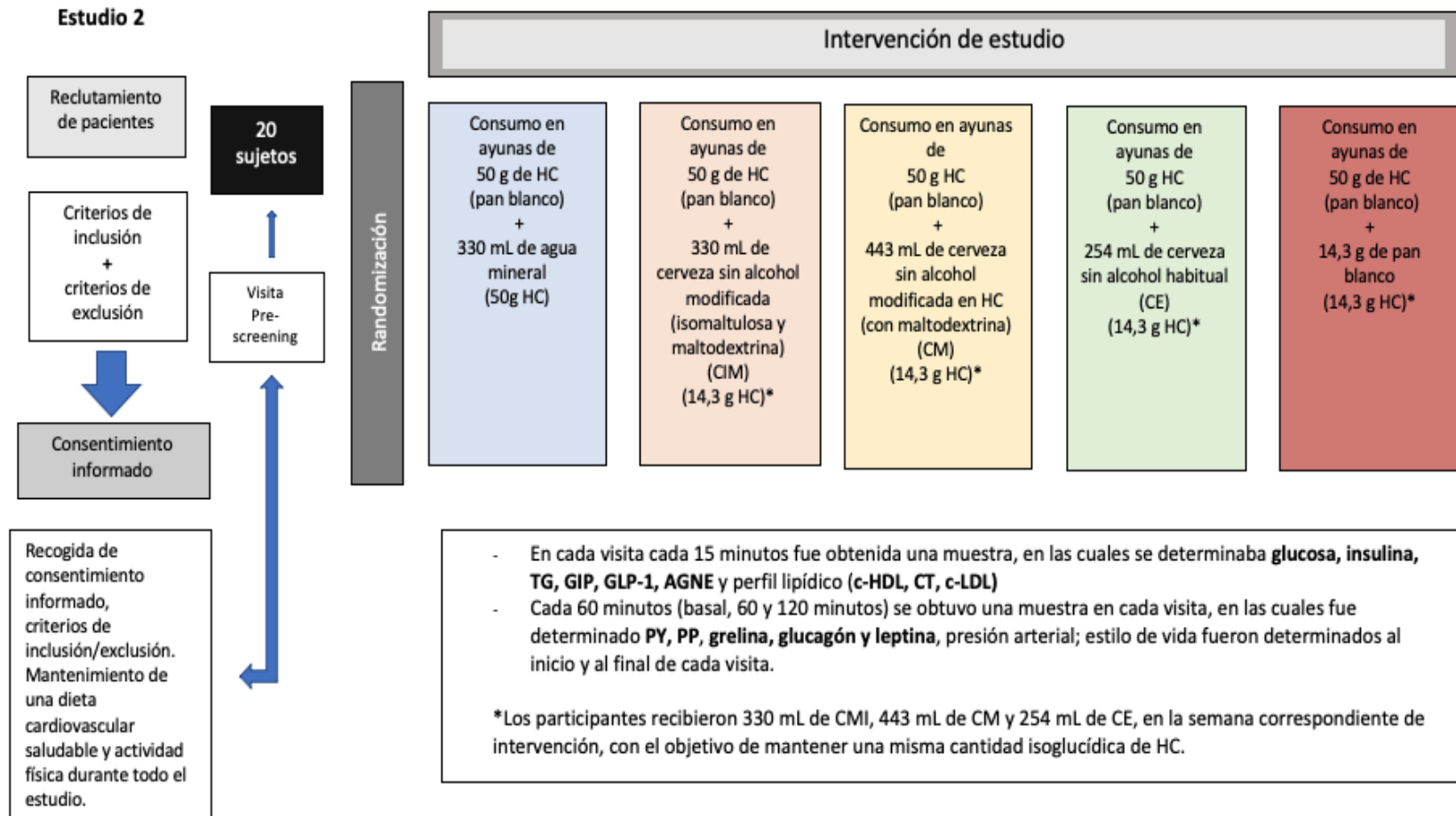
El **estudio 2** (esquemático en la **Figura 20**) es un diseño controlado, doble-ciego, aleatorizado y cruzado incluyendo a 20 sujetos sanos que fueron sometidos a las siguientes intervenciones en ayunas:

- **Semana 1:** La primera visita a estudio incluyó la toma, en ayunas, de 50 g de HC, administrados en forma de pan blanco, y 330 mL de agua mineral. Esta intervención constituyó el grupo comparativo y de referencia para el resto de intervenciones.
- **Semana 2:** La segunda visita a estudio incluyó la toma, en ayunas, de 50 g de HC, administrados en forma de pan blanco, y 330 mL de CIM). El aporte de HC del consumo de esta cerveza sin alcohol supone un total de 14,3 g.
- **Semana 3:** La tercera visita a estudio incluyó la toma, en ayunas, de 50 g de HC, administrados en forma de pan blanco, y (CM). Se aportó la suficiente cantidad de cerveza para administrar la misma cantidad de HC que en la anterior intervención. Teniendo en cuenta que la cantidad de HC de la cerveza aportada en la semana 2 fue de 14,3 g (contenidos en 330 mL), y que la cantidad de HC disponibles en esta cerveza sin alcohol es de 3,2 g cada 100 mL (**Tabla 1**), se aportaron 443 mL.
- **Semana 4:** La cuarta visita a estudio incluyó la toma, en ayunas, de 50 g de HC, administrados en forma de pan blanco, y cerveza sin alcohol con composición estándar (CE). Se aportó la suficiente cantidad de cerveza para administrar la misma cantidad de HC que en las anteriores intervenciones. Teniendo en cuenta que la cantidad de HC de la cerveza aportada en las semanas 1 y 2 fue de 14,3 g, y que la cantidad de HC disponibles en esta cerveza sin alcohol es de 5,59 g cada 100 mL (**Tabla 1**), se aportaron 254 mL.
- **Semana 5:** La quinta visita a estudio incluyó la toma, en ayunas, de 64,3 g de HC, administrados en forma de pan blanco únicamente. Con esta intervención se pretendió conocer la respuesta glucídica del participante a la misma dosis de HC administrada en las intervenciones anteriores, sirviendo como grupo comparativo para las tres intervenciones anteriores.

El orden de las cinco intervenciones fue variable para cada sujeto con el objetivo de evitar el sesgo que pudiera generar el orden de las mismas sobre los resultados obtenidos. Los participantes fueron aleatorizados a una u otra secuencia de intervención mediante un sistema informático. Los

sujetos a estudio fueron desconocedores del tipo de cerveza sin alcohol que estaban tomando en cada intervención. Por motivos evidentes, las intervenciones no pudieron resultar ciegas a los investigadores que realizaron las visitas clínicas, ya que las intervenciones programadas para la semana 1 y 5 son logísticamente diferentes y las programadas para las semanas 2, 3 y 4 implican un volumen de bebida diferente. Los participantes del estudio sí permanecieron ciegos al tipo de cerveza sin alcohol que estaban tomando cada día. Como se ha comentado previamente, dos investigadores del estudio, llevaron a cabo el análisis de la composición nutricional de cada una de las cervezas (**Tabla 1**) y la preparación de las bebidas a estudio, homogeneizando el envase y otorgándoles una codificación. El análisis estadístico fue realizado por uno de los investigadores que aunque había participado en las visitas clínicas a estudio, no se encargó de la preparación de las bebidas ni le fue desvelado la codificación de las mismas en ningún momento, permaneciendo ciego durante todo el estudio, para evitar cualquier sesgo en el análisis de los resultados.

Figura 20. Descripción del diseño de estudio 2.



**Tabla 1.** Análisis de la composición de las tres cervezas sin alcohol utilizadas en las diferentes intervenciones del estudio 1 y 2.

	<b>Cerveza sin alcohol con eliminación casi completa de maltosa y enriquecida con isomaltulosa y maltodextrina (CIM)</b>	<b>Cerveza sin alcohol con eliminación casi completa de maltosa y enriquecida con maltodextrina (CM)</b>	<b>Cerveza sin alcohol con composición estándar (CE)</b>
Extracto, % p/p	5,27	5,20	5,95
Total carbohidratos, % p/p	4,12	3,20	5,59
Azúcares, % p/p	2,77	0,31	2,07
Glucosa, % p/p	0,07	0,13	0,48
Fructosa, % p/p	0,03	0,05	0,19
Sucralosa, % p/p	<0,01	<0,01	0,05
Lactosa, % p/p	<0,01	<0,01	1,00
Maltosa, % p/p	0,07	0,13	1,35
Isomaltulosa, % p/p	2,60	<0,01	<0,01
Glicerina, g/L	0,60	1,10	0,20
Residuo inorgánico, p/p	0,05	0,09	0,11
Sodio, mg/kg	34	57,00	41
Ácido Cítrico, mg/kg	73	113,00	100
Densidad, g/mL	1,02	1,02	1,02

*CIM: Cerveza sin alcohol con eliminación casi completa de maltosa y enriquecida con isomaltulosa y maltodextrina; CM: Cerveza sin alcohol con eliminación casi completa de maltosa y enriquecida con maltodextrina; CE: Cerveza sin alcohol con composición estándar; (p/p): partes de soluto/partes de disolución.*

### **3.1. Visitas a estudio.**

- Ambos estudios contaron con el siguiente plan de visitas:
  - Visita de pre-selección: Se determinó el cumplimiento de criterios de inclusión y exclusión, se obtuvo el consentimiento informado y se instó al participante a mantener un estilo de vida (dieta y ejercicio físico) estable durante todo el estudio. Para la determinación del cumplimiento de criterios de inclusión del estudio, se revisó la última analítica disponible del paciente y se realizó una historia clínica exhaustiva. En caso de que el participante no dispusiera de datos bioquímicos de los últimos 6 meses, se realizó una analítica para determinar los parámetros analíticos pertinentes para la valoración de elegibilidad del participante.
  - Visita de determinación de elegibilidad y, si aplicaba, randomización: En caso de que el participante cumpliera los criterios de elegibilidad del estudio, se procedió a la randomización del mismo a una u otra secuencia de intervención. Esta visita no requería la presencia física del participante, comunicándole vía telefónica la inclusión o no en el estudio. Se programaba la primera visita, correspondiente a la primera intervención que correspondiese, en 1 o 2 semanas.
  - Visitas de intervención: Cada una de las intervenciones previstas a estudio se realizaron en una semana diferente y de forma consecutiva. Se intentó, en la medida de lo posible, que cada participante realizase cada una de las intervenciones en un mismo día de la semana, para evitar un potencial sesgo al respecto.

## **4. VARIABLES DETERMINADAS A LO LARGO DEL ESTUDIO**

### **4.1. Variables clínicas:**

- Visita de pre-selección: Se determinó la edad, el sexo, toma de fármacos y otros componentes como alimentos funcionales y/o suplementos vitamínicos, antecedentes personales de enfermedad, hábito tabáquico y otras variables determinantes para valorar la elegibilidad para la participación en el estudio.

- Visitas de intervención: Se determinó la toma de fármacos y otros componentes como alimentos funcionales y/o suplementos vitamínicos y la presencia de cualquier patología que pudiera condicionar los resultados del estudio

#### **4.2. Variables antropométricas:**

Las variables antropométricas se determinaron en la visita de pre-selección y en cada una de las visitas de intervención en ambos estudios. Incluían los siguientes parámetros:

- Peso corporal (kg): mediante báscula digital (modelo SECA 813), se realizó siempre con la persona descalza y en ropa interior.
- Talla (cm): mediante tallímetro de precisión (SECA 2017). Se determinó con la persona de pie, descalza y con la cabeza colocada en el plano de Frankfurt, con los pies juntos, rodillas estiradas, talones, nalgas y espalda en contacto con la pieza vertical del aparato medidor.
- Índice de masa corporal: Determinado a partir del peso corporal y la talla con la fórmula de peso (kg) dividido por la talla (m) al cuadrado.
- Tensión arterial: mediante el modelo Omron HEM-907-E. La tensión arterial se determinó en ayunas y tras la realización de todas las extracciones sanguíneas, con el objetivo de detectar una posible hipotensión asociada a las mismas.

#### **4.3. Variables bioquímicas:**

- Visita de pre-selección: En caso de que el participante no tuviese datos analíticos disponibles en los últimos 6 meses, se realizó una analítica en ayunas para determinar aquellos parámetros analíticos incluidos en los criterios de elegibilidad. Esta analítica incluyó parámetros como la glucosa, la hemoglobina glicosilada o el perfil lipídico, entre otros, que fueron determinados en el Servicio de Bioquímica del Hospital Miguel Servet, de acuerdo con los procedimientos habituales allí utilizados y validados.
- Visitas de intervención: En cada visita de intervención, tanto en el estudio 1 como en el 2, se determinaron las variables bioquímicas en ayunas (ayuno  $\geq$  10 horas) y cada 15 minutos. Al participante se le colocó una vía intravenosa periférica, para facilitar la extracción de una muestra sanguínea cada 15 minutos. Estas muestras fueron



congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar la posterior determinación de los metabolitos a estudio. Tal y como se muestra en la **Figuras 19 y 20**, los parámetros variaron entre el ambos estudios, determinándose lo siguiente:

- **Estudio 1:** se determinaron glucosa, insulina, TG, AGNE, GLP-1 y GIP. Estas determinaciones se valoraron en la muestra basal y en todas las muestras extraídas cada 15 minutos.
- **Estudio 2:** se determinaron glucosa, insulina, glucagón, TG, AGNE, c-HDL, c-LDL, GLP-1, GIP, PY, PP, grelina y leptina. La concentración de glucosa, insulina, TG, AGNE, GLP-1 y GIP se determinó en la muestra basal y en todas las muestras extraídas cada 15 minutos. Los restantes metabolitos se determinarán en la muestra basal, a los 60 y 120 minutos.

#### **4.4. Valoración dietética y de ejercicio físico.**

Con el objetivo de determinar que el estilo de vida se había mantenido estable durante todo el estudio, y controlar así los posibles sesgos que pudieran interferir sobre los resultados del estudio, se realizó una valoración dietética y del ejercicio físico. Éstas se determinaron mediante la siguiente metodología:

- Recuerdo de 24 horas: El registro o recordatorio de 24 horas, se le explicaba al paciente que debía apuntar durante 3 días consecutivos (2 días laborales y 1 festivo), antes de la visita, todo lo que comía y bebía reflejando las cantidades de ambos durante todo el día. Esta información fue analizada mediante el software EasyDiet® para valoración nutricional, a través del sistema de tablas de intercambio de alimentos (283). Para ello, se solicitó al participante que trajese los 3 cuestionarios dietéticos completados el día de la visita. Posteriormente, se introdujo toda la información descrita por cada uno de los participantes, como tipo de alimento (sólido y líquido) junto con la cantidad consumida de cada uno de ellos y en cada una de las comidas realizadas en ese día, obteniendo así una valoración nutricional global diaria para cada una de las encuestas nutricionales. De este modo, estableció características dietéticas de cada uno de los participantes a lo largo del estudio. Esta valoración se realizó en la visita de pre-selección y en cada una de las visitas a estudio, reflejando así las características dietéticas del participante en los días previos a la visita. La valoración consistió en

analizar cada alimento y bebida de manera individual y en las cantidades o medidas registradas presente en cada recordatorio, de cada uno de los 3 días necesarios para cada visita. Posteriormente, se estableció la media de la ingesta energética y de macronutrientes, de los tres recordatorios por cada visita y por cada paciente, para analizar si su dieta había seguido un patrón similar y estable durante el desarrollo del estudio.

- Determinación de actividad física: El investigador realizó un cuestionario al participante, en el que se valoró la cantidad de actividad física que realizaba, a través de preguntas acerca del tipo de ejercicio realizado, su duración y frecuencia. La valoración se realizó mediante el cuestionario validado de actividad física de Minnesota (284).

### **5. Análisis de la composición del pan blanco**

Los HC disponibles en el pan blanco que fue utilizado en la combinación con distintos tipos de bebidas en el estudio 2, se analizaron con kits de HC y fibra dietética (K-ACHDF 06/18, Megazyme). Los HC disponibles se determinaron en muestras por triplicado de pan molido seco. Las muestras se incubaron a 80 °C con  $\alpha$ -amilasa termoestable, y se incubaron a 60 °C con proteasa y amiloglicosidasa. Posteriormente, se extrajo una alícuota, se centrifugó y se incubó con una mezcla de sacarasa/maltasa más  $\beta$ -galactosidasa. Se determinaron D-glucosa y D-fructosa espectrofotométricamente usando hexoquinasa más glucosa-6-fostato deshidrogenasa, seguido de fosfoglucosa isomerasa. Los resultados se dan como HC disponibles, obteniendo la cantidad de g HC disponibles por cada 100 g de pan blanco.

### **6. Valoración de efectos adversos**

Aunque no se preveía la aparición de efectos adversos, por las características de la intervención, se registraron todos aquellos efectos adversos que pudiesen aparecer durante o después de cada una de las intervenciones.

## **5. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS**

### **5.1. Determinación de variables bioquímicas**

En cada visita de intervención, en cada uno de los estudios, se determinaron variables bioquímicas en ayunas (ayuno  $\geq 10$  horas) y cada 15 minutos. La determinación de parámetros bioquímicos incluyó: glucosa, TG, insulina, CT, c-HDL y c-LDL Únicamente al inicio del estudio junto a los parámetros anteriores, se determinaron las enzimas hepáticas, gamma-glutamyl transferasa (GGT), transaminasa glutámico pirúvico (GPT) y la transaminasa glutámico-oxalacética (GOT), Hb1Ac, y hormona estimulante de la tiroides (TSH), para valorar el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión de los participantes.

La determinación de todos estos parámetros bioquímicos de la primera visita, donde se comprobó el cumplimiento de criterios (inclusión y exclusión) de los participantes se llevó a cabo en el servicio de bioquímica del Hospital Universitario Miguel Servet. La determinación de los parámetros bioquímicos recogidos en cada visita y cada 15 minutos, glucosa, TG, insulina, CT, c-HDL y c-LDL, se determinaron en el servicio de bioquímica del Hospital General San Jorge de Huesca. Los TG, CT y las enzimas hepáticas (GGT, GPT y GOT) se midieron con métodos enzimáticos estándar. Los niveles de c-LDL se calcularon con el método de la fórmula de Friedewald. Se calculó la concentración de colesterol no HDL como CT menos c-HDL. La concentración de glucosa se determinó mediante el método de glucosa oxidasa, y los niveles de insulina fueron medido por radioinmunoensayo. La HbA1c se determinó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. La TSH se determinó mediante luminiscencia inmunoensayo TSH3-Dxi (Beckman).

### **5.2. Determinación de metabolitos: glucagón, GLP-1, GIP, PP, PY, grelina y leptina.**

Para la determinación de glucagón, GLP-1, GIP, PP, PY, grelina y leptina se utilizó MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP. MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP se basa en la tecnología Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup>, una de las tecnologías multiplex de más rápido crecimiento y más respetadas que ofrece aplicaciones en todas las ciencias de la vida y es capaz de realizar una variedad de bioensayos, incluidos inmunoensayos en la superficie de perlas magnéticas codificadas por fluorescencia conocidas como microesferas MagPlex<sup>®</sup>.

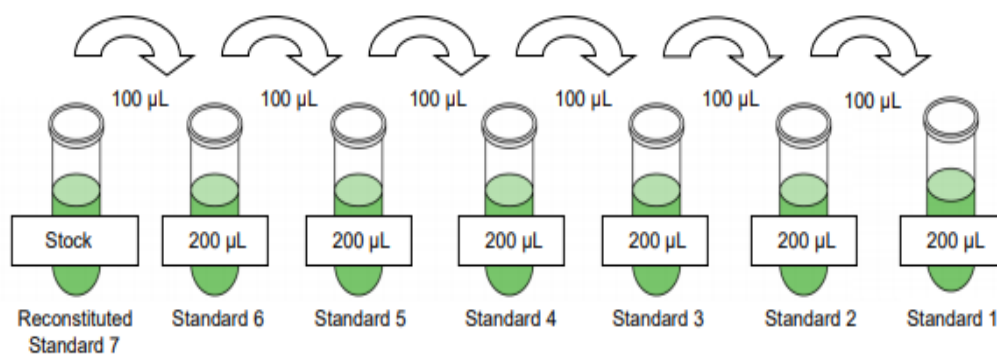
La tecnología Luminex<sup>®</sup> se basa en el uso de técnicas patentadas para codificar con distintos códigos de colores microesferas mediante dos tintes fluorescentes. Cada bolita magnética se conjuga con un anticuerpo específico para cada metabolito de interés, lo que permite la cuantificación simultánea de varios metabolitos, mejorando así la productividad. MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP de EMD Millipore es un kit que

permite la cuantificación simultánea de varios metabolitos humanos en suero, plasma, lisados de tejido/células y muestras de sobrenadante de cultivo.

- El procedimiento llevado a cabo incluyó los siguientes pasos:

Las muestras de suero extraídas en cada intervención se almacenaban a  $-20^{\circ}\text{C}$  días antes de la determinación de los metabolitos, y a  $4^{\circ}\text{C}$  horas antes de la prueba. En primer lugar, se debe realizar la curva de calibrado mediante diluciones seriadas, tal y como indica la **Figura 21**. El *standard 7* se reconstituía con  $250\ \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se añadieron  $200\ \mu\text{L}$  de *buffer assay* a cada tubo del 1 al 6 y a partir del *standard 7*, se realizaron diluciones seriadas añadiendo  $100\ \mu\text{L}$  de la muestra anterior, tal y como se muestra en la **Figura 21**.

**Figura 21.** Protocolo de preparación de la curva de calibrado.



Seguidamente, se preparaban los controles de calidad y la matriz de suero, reconstituyendo sus productos liofilizados con  $250\ \mu\text{L}$  y un  $1\ \text{mL}$  de agua respectivamente. Se añadían  $200\ \mu\text{L}$  de *assay buffer* a cada pocillo de la placa y se agitaba durante 10 minutos. A continuación, se preparaba el anticuerpo, sonicando los viales de anticuerpos durante 30 segundos, volteando durante un minuto y añadiendo  $150\ \mu\text{L}$  de cada vial de microesferas de anticuerpo a la botella de mezcla *mix bottle*. Por último, el contenido del *mix bottle* se llevaba a un volumen final de  $3\ \text{mL}$  con el *Bead diluent* y se agitaba.

Una vez preparados todos los reactivos, se decantaba en primer lugar, el tampón de ensayo *assay buffer* de los pocillos de la placa y se añadía  $25\ \mu\text{L}$  del *background*, del *standard* y de los controles, todo ello por duplicado en la posición que correspondía. En los pocillos restantes se añadía  $25\ \mu\text{L}$  del suero

a analizar. A continuación, en todos los pocillos que contuvieran *background*, *standard* y controles se añadía 25  $\mu\text{L}$  de la solución matriz, mientras que en todos los pocillos que contuvieran suero, se añadía 25  $\mu\text{L}$  de *assay buffer*.

Finalmente, a los 96 pocillos se añadía también 25  $\mu\text{L}$  de la preparación de anticuerpos que se había realizado en la botella de mezcla *mix bottle*. Por último, se sellaban las placas y se incubaba, los 75  $\mu\text{L}$  contenidos en cada pocillo, con agitación suave durante toda la noche entre 16-18 horas, protegidos de la luz y en cámara fría a 4 ° C.

Al día siguiente, se sacaba el kit a temperar y se colocaba la placa con las muestras sobre una placa magnética al menos 1 minuto, para a continuación decantar la placa y lavarla con un tampón de lavado *wash buffer 1X* previamente preparado. El lavado se realizaba por triplicado añadiendo 200  $\mu\text{L}$  por pocillo del tampón de lavado *wash buffer 1X*, agitando durante 30 segundos y decantando tras cada lavado, tras haber colocado previamente un minuto la placa de muestras sobre la placa magnética. Este paso es crítico, ya que es la fijación de la placa magnética la que permite que las bolas magnéticas queden en el interior de cada pocillo y no sean decantadas por la fregadera.

A continuación, se añadían 50  $\mu\text{L}$  del anticuerpo secundario y se incubaba durante una hora con agitación suave y protegida de la luz. Después se añadían 50  $\mu\text{L}$  de estreptomicina y se volvía a incubar durante 30 min con agitación suave y protegida de la luz.

Terminadas ambas incubaciones, se procedió a realizar tres lavados con 200  $\mu\text{L}$  *wash buffer 1X* y decantando con placa magnética, tal y como se ha indicado anteriormente.

Finalmente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de *Sheath Fluid* a cada pocillo y se procedió a su lectura en el Analizador multiplex LABSCAN 100 (Luminex)<sup>®</sup>, perteneciente al Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

### **5.3. Determinación de ácidos grasos no esterificados (AGNE)**

Para la determinación de los AGNE se utilizó el kit Max Discovery™ de ensayo de AGNE. El kit utiliza un ensayo espectrofotométrico para detectar AGNE directamente de muestras de suero de manera simple y precisa. La detección se basa en la reacción de AGNE en suero con determinados reactivos incorporados en el kit.

Primeramente, reaccionan los AGNE en suero con ATP y coenzima A en presencia de acil-CoA sintetasa para generar acil-CoA, AMP y PPi. A continuación, la acil-CoA oxidasa presente en el kit, oxida a la acil-CoA para producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peroxidasa permite que dos reactivos del kit reaccionen generando un color púrpura, los cuales son la 4-aminoantipirina y el 3-metil-N-etil-N- ( $\beta$ -

hidroxyethyl) anilina (MEHA). La presencia de este color se puede medir mediante absorbancia a 550 nm y su intensidad es directamente proporcional a la concentración de AGNE.

- El procedimiento consistió:

En primer lugar, se dejó que los reactivos y el estándar alcanzaran la temperatura ambiente antes de ser utilizados. Seguidamente, se reconstituyeron los dos reactivos presentes en el kit con disolvente, agregando 24 mL de disolvente al reactivo AGNE A y 8 mL al reactivo AGNE B. A continuación, se preparó la curva estándar, etiquetando 6 tubos de microcentrífuga y diluyendo el estándar AGNE con el diluyente estándar tal y como se describe en la **(Tabla 2)**

**Tabla 2.** Preparación curva estándar para AGNE.

Tubos	Volumen estándar AGNE (4 mmol/L)	Volumen estándar del disolvente	Concentración de AGNE (mmol/L)
1	0 $\mu$ L	80 $\mu$ L	0
2	10 $\mu$ L	70 $\mu$ L	0,5
3	20 $\mu$ L	60 $\mu$ L	1
4	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L	2
5	60 $\mu$ L	20 $\mu$ L	3
6	80 $\mu$ L	0 $\mu$ L	4

Se añadieron 4  $\mu$ L de cada muestra o estándar por duplicado en los pocillos de la placa. Después se añadió 225  $\mu$ L de reactivo AGNE A en todos los pocillos, se mezcló brevemente y se dejó incubar la placa durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 75  $\mu$ L de reactivo AGNE B en los pocillos y se dejó incubar la placa durante 10 min a temperatura media. Por último, se midió la absorbancia de cada pocillo a 550 nm y extrapolando las absorbancias obtenidas a la curva estándar se obtuvo la concentración de AGNE para cada una de las muestras.

## 6. CALCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

### ○ Estudio 1

El tamaño muestral se estableció tomando como variable principal el cambio en el IG determinado por el AUC inducida por CIM que contenía 2,5 g de isomaltulosa por cada 100 mL y 0,8 g de una maltodextrina resistente por cada 100 mL (incluyendo una cantidad de 25 g de HC), en comparación con la administración de 25 g de glucosa, que constituyó el HC de referencia. Se estableció que la

variabilidad del IG fue de 22 unidades en población sana. En base a la literatura científica, esperamos una diferencia de 35 unidades en el IG inducido por la cerveza sin alcohol con composición modificada, en comparación con CE. Se estableció un nivel de confianza o seguridad ( $1-\alpha$ ) de 95% ( $Z\alpha$  bilateral = 1,960) y un poder estadístico ( $1-\beta$ ) del 90% ( $Z\beta$  bilateral = 1,282), obteniendo así un tamaño muestral de 8 sujetos, siendo 10 sujetos al estimarse una tasa de pérdidas del 25%.

○ Estudio 2

No se disponen datos en la bibliografía científica sobre el efecto del consumo de isomaltulosa y de una maltodextrina resistente cuando se administran junto a 50 gramos de HC, que resulta ser el valor de referencia para determinar la respuesta posprandial de un alimento, determinando así su impacto sobre el metabolismo glucídico. Por ello, se determinó un tamaño muestral a partir de los incrementos obtenidos en el estudio 1 tras el consumo de cada tipo de cerveza, siguiendo los siguientes criterios:

- La diferencia de incremento de la CE versus CM es de 19,4 mg/dL (51,1-31,7). Se estableció un nivel de confianza o seguridad ( $1-\alpha$ ) de 95% ( $Z\alpha$  bilateral = 1,960) y un poder estadístico ( $1-\beta$ ) del 90% ( $Z\beta$  bilateral = 1,282), y una desviación típica de 18,4 obteniendo así un tamaño muestral de 15 sujetos.
- La diferencia de incremento de la CE versus la CIM es de 18,7 mg/dL (51,1-32,4). Se estableció un nivel de confianza o seguridad ( $1-\alpha$ ) de 95% ( $Z\alpha$  bilateral = 1,960) y un poder estadístico ( $1-\beta$ ) del 90% ( $Z\beta$  bilateral = 1,282), y una desviación típica de 15,0 obteniendo así un tamaño muestral de 11 sujetos. Según el tamaño muestral calculado fue de 15 y 11 sujetos, siendo 20 sujetos al estimarse una tasa de pérdidas del 25%.

## **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con R versión 3.5.0 y la significación se estableció en  $p < 0,05$ . Las variables cuantitativas con distribución normal se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE) y las variables cuantitativas no paramétricas se expresaron como mediana y rango intercuartílico (percentil 25 – percentil 75). Las variables categóricas (nominales) se mostraron como N (número total de personas) y los correspondientes porcentajes del total de la muestra. Para comprobar si las variables continuas seguían una distribución normal o no, se realizó el test Shapiro. Las diferencias

entre las variables independientes se calcularon mediante la prueba *t*-Student para variables paramétricas o la prueba U de Mann-Whitney para variables no paramétricas, mientras que las variables categóricas se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado. Para la comparación de muestras pareadas se utilizó la prueba *t* para variables paramétricas o la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para variables no paramétricas como es apropiado. Para el análisis de las variaciones de glucosa, insulina, GIP y GLP-1 a lo largo de 120 minutos, después de la ingestión de cada bebida y pan blanco, en su caso, se analizaron en ambos estudios utilizando la prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis, según correspondía. Se evaluaron las diferencias sobre el efecto posprandial de cada intervención comparando el AUC versus tiempo de cada metabolito (glucosa, insulina, GLP-1 y GIP, insulina y glucagón, grelina y leptina), después el consumo de cada bebida y pan blanco. Las AUC y su comparación se calcularon con el paquete PK, utilizando el método *t*.



# RESULTADOS



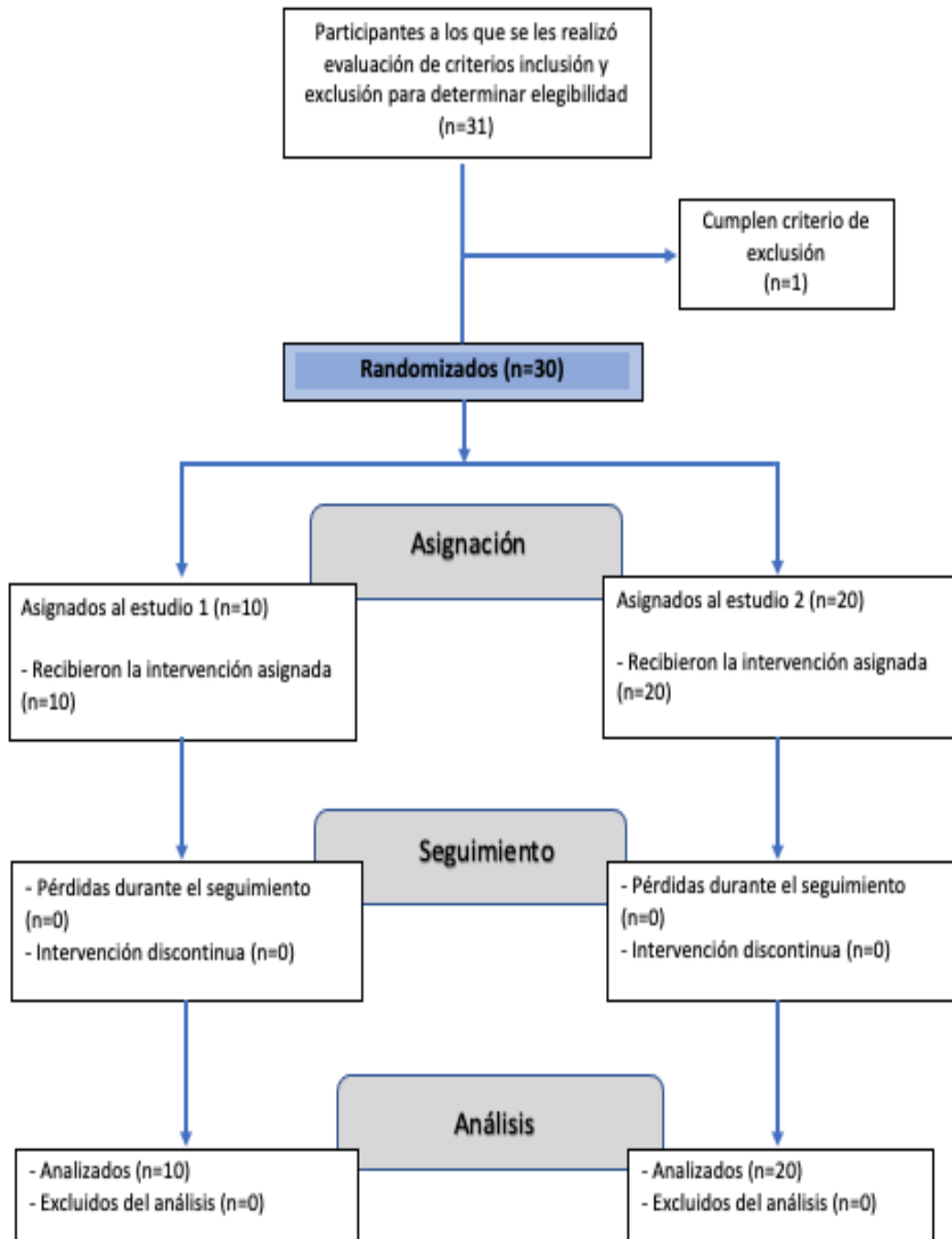
## RESULTADOS

### 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS BASALES DE LOS SUJETOS INCLUIDOS EN AMBOS ESTUDIOS (ESTUDIO 1 Y 2).

Fueron examinados un total de 31 participantes para determinar la elegibilidad del estudio, de los cuales 30 personas fueron finalmente incluidas en uno de los dos estudios, por cumplimiento de todos los criterios inclusión y exclusión establecidos (**Figura 22**). Únicamente un participante no cumplió criterios de inclusión, por tener un valor de Hb1Ac  $\geq 5,7\%$ , y cumpliendo criterio de prediabetes.

En la **Tabla 3**, se describen las características clínicas y bioquímicas basales de todos los sujetos incluidos en ambos estudios (estudio 1 y 2). Del total de los 30 participantes incluidos en ambos estudios, la mayoría son adultos jóvenes con una edad media de 31,5 años (30,3 - 34,5) para el primer estudio, y de 30,5 años (24,8 - 33,0) en el estudio 2, además de ser predominantemente hombres, con un 70% en ambos estudios. Los participantes del estudio 1 tenían menor IMC, con una mediana de 23,4 kg/m<sup>2</sup> (22,4 - 25,7) frente a un IMC de 24,4 kg/m<sup>2</sup> (20,6 - 26,0) en el estudio 2. Todos los participantes estaban sanos y presentaban niveles de glucosa, TG y perfil lipídico (CT, c-HDL y c-LDL), TSH y enzimas hepáticas dentro de los rangos de normalidad analíticos y sin ninguna enfermedad previa importante tales como ECV, hipertensión o DM2, siendo estas enfermedades criterios de exclusión para la participación y selección en ambos estudios, tal y como se ha comentado previamente (**Tabla 3**).

Figura 22. Diagrama del desarrollo para ambos estudios (estudio 1 y 2).



**Tabla 3.** Características clínicas y bioquímicas basales de todos sujetos incluidos en estudio 1 y 2<sup>1</sup>.

	Sujetos incluidos en el estudio 1 (N=10)	Sujetos incluidos en el estudio 2 (N=20)
Edad, años	31,5 (30,3 -34,5)	30,5 (24,8 – 33,0)
Hombres, n (%)	7 (70%)	14 (70%)
Peso corporal, kg	86,0 (80,8 – 87,8)	76,7 (61,4 – 84,7)
IMC, kg/m <sup>2</sup>	23,4 (22,4 – 25,7)	24,4 (20,6 – 26,0)
Diabetes, n (%)	0 (0%)	0 (0%)
Hipertensión, n (%)	0 (0%)	0 (0%)
Enfermedad cardiovascular, n (%)	0 (0%)	0 (0%)
Consumo alcohol (g/día)	2,35 (0,47 – 5,81)	6,25 (1,22- 15,2)
Glucosa, mg/dL	86,0 (80,8 – 87,8)	86,0 (82,3 – 95,0)
TSH, $\mu$ UI/L	2,11 $\pm$ 0,99	2,36 $\pm$ 1,28
Triglicéridos, mg/dL	56,0 (51,0 - 63,3)	76,0 (47,5 – 89,0)
Colesterol total, mg/dL	192 (183 – 198)	188 (168 – 199)
Colesterol LDL, mg/dL	113 (103 – 122)	112 (98,0 – 128)
Colesterol HDL, mg/dL	61,0 (53,5- 69,3)	56,0 (50,5 – 60,8)
GGT, UI/L	13,0 (13,0 – 16,3)	18,5 (15,5 – 23,0)
GOT, UI/L	22,0 (21,0 - 25,5)	25,0 (21,0 – 28,3)
GPT, UI/L	18,0 (14,0 – 22,3)	17,5 (14,0 – 29,3)

<sup>1</sup>Las variables cuantitativas se expresan como media  $\pm$  DE, excepto variables que no siguen la distribución normal que se expresan como mediana (percentil 25 - percentil 75). Las variables cualitativas se expresan como porcentaje. Abreviaturas que aplican en la siguiente tabla: IMC significa: índice de masa corporal; GGT: gamma-glutaril transferasa; GOT: transaminasa glutámico oxalacética; GPT: transaminasa glutámico-pirúvica; TSH: hormona tiroidea2.

## **2. EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANTOPOMÉTRICAS Y DIETÉTICAS DE LOS SUJETOS A LO LARGO DE AMBOS ESTUDIOS (ESTUDIO 1 Y 2)**

Las **Tablas 4 y 5** muestran la evolución de las características clínicas y antropométricas de los participantes a lo largo de ambos estudios (estudio 1 y 2).

### **1.1. ESTUDIO 1**

Los resultados muestran como el peso corporal, la presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, y la actividad física realizada a lo largo del estudio 1, se mantuvieron estables sin encontrarse diferencias significativas en cada una de las intervenciones realizadas correspondientes al consumo de las distintas bebidas. Sin embargo, hubo diferencias significativas en el tiempo de consumo de cada bebida, donde tiempo de duración del consumo de la CM fue superior al resto, con mediana de 18 minutos ( $p=0,012$ ). Estas diferencias significativas, especialmente se produjeron entre CM frente CE ( $p=0,027$ ) y CM frente a la bebida glucosada ( $p=0,015$ ). Este hallazgo se esperaba que sucediese ya que el volumen a beber por parte de los participantes de CM era mayor (781 mL) en comparación con CE (447 mL) y CIM (581 mL) (**Tabla 4**).

En la **Tabla 5**, se muestran las características dietéticas de los 3 días previos a cada intervención en el estudio 1, y observamos como el patrón dietético se mantuvo estable a lo largo del estudio sin diferencias significativas entre las 4 bebidas planificadas del estudio 1.

Tabla 4. Evolución de las características clínicas y antropométricas de los sujetos durante el estudio 1.<sup>1</sup>

	Glucosa (25 g de HC)	CE (25 g de HC)	CM (25 g de HC)	CIM (25 g de HC)	p <sup>2</sup>
Peso corporal, kg	74,0 (62,3- 77,7)	74,3 (59,8 – 77,0)	75,2 (64,4 – 78,0)	76,3 (72,8 – 77,4)	0,934
PAS, mmHg	119 (104 – 121)	106 (104 – 112)	114 (101 – 123)	117 (104 – 123)	0,897
PAD, mmHg	77,0 (68,5 – 85,0)	72,0 (68,0- 77,0)	75,0 (63,0 – 79,0)	74,0 (67,0- 78,0)	0,694
Tiempo de consumo de cada bebida (min)	6,00 (5,00 – 8,00)*	7,00 (6,00 – 12,0)#	18,0 (15,3 – 22,0)	13,0 (9,00 – 15,0)	<b>0,012</b>
<i>Actividad física</i>					
Actividad física vigorosa, METs/min	0,00 (0,00 – 600)	1140 (180- 1920)	1280 (720 – 1890)	120 (0,00 – 1680)	0,722
Actividad física moderada, METs/min	0,00 (0,00 – 135)	0,00 (0,00- 800)	0,00 (0,00- 360)	0,00 (0,00 – 240)	0,811
Caminar, METs/min	1386 (1213 – 2772)	1732 (1386 – 2599)	1386 (1040- 2079)	1213 (322 – 1534)	0,565
Actividad física global, METs/min	2969 (1568 – 4073)	3533 (2346 – 5119)	3335 (1546 – 4599)	2431 (1170 – 4566)	0,806

<sup>1</sup>Las variables cuantitativas expresan como mediana (percentil 25 - percentil 75). Abreviaturas que aplican en la siguiente tabla: HC: hidratos de carbono; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza sin alcohol con composición estándar.

<sup>2</sup>El p valor se calculó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. \* Indica p <0,05 comparando CM frente a bebida glucosada y # indica p <0,05 comparando CM frente a CE o CM frente a bebida glucosada, según corresponda, calculado mediante la prueba U Mann Whitney en el paquete PK

**Tabla 5.** Evolución de las características dietéticas de los sujetos durante el estudio 1.<sup>1</sup>

	Glucosa (25 g de HC)	CE (25 g de HC)	CM (25 g de HC)	CIM (25 g de HC)	p <sup>2</sup>
Energía, kcal	2184 ± 758	2301 ± 956	2462 ± 870	2195 ± 447	0,924
HC, % <sup>3</sup>	181 ± 76,5	207 ± 103	218 ± 109	189 ± 61,2	0,864
Azúcares, g	73,9 ± 30,4	74,7 ± 32,2	73,1 ± 33,3	84,4 ± 15,5	0,891
Polisacáridos, g	105 ± 51,4	128 ± 74,1	143 ± 79,3	101 ± 51,5	0,625
Fibra, g	19,0 ± 9,37	21,5 ± 13,9	24,5 ± 16,4	20,3 ± 6,35	0,854
Grasa, % <sup>3</sup>	109 ± 42,6	107 ± 32,5	120 ± 31,9	110 ± 31,9	0,928
AGS, % <sup>3</sup>	35,9 ± 15,8	33,3 ± 9,32	32,3 ± 9,94	32,0 ± 7,20	0,903
AGM, % <sup>3</sup>	47,1 ± 20,1	44,8 ± 16,9	52,1 ± 13,0	45,9 ± 16,1	0,895
AGP, % <sup>3</sup>	15,9 ± 8,33	18,4 ± 9,98	23,5 ± 13,5	21,2 ± 9,57	0,527
Colesterol, mg	507 ± 252	374 ± 151	445 ± 185	349 ± 136	0,363
Proteínas, % <sup>3</sup>	110 ± 45,7	102 ± 42,9	122 ± 43,3	107 ± 31,8	0,862
Sodio, mg	3208 ± 1182	3325 ± 1358	4383 ± 2120	3118 ± 1082	0,422

<sup>1</sup>Las variables cuantitativas se expresan como media ± desviaciones estándar. Abreviaturas que aplican en la siguiente tabla: HC: hidratos de carbono; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza sin alcohol con composición estándar. AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados.

<sup>2</sup>El p valor se calculó mediante la prueba ANOVA.

<sup>3</sup>Expresado como porcentaje del total de calorías consumidas.



## **2.2 ESTUDIO 2**

La **Tabla 6**, muestra la variación de las características clínicas y antropométricas de los sujetos a lo largo de las intervenciones del estudio 2, indicando como el peso corporal, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, la actividad física, así como el tiempo de consumo de las bebidas en cada una de las intervenciones a lo largo del estudio permanece estables, sin encontrarse diferencias significativas ( $p=0,279$ ;  $p=0,108$ ;  $p=0,866$ ;  $p=0,508$  y  $p=0,379$ , respectivamente).

En la **Tabla 7**, se muestran las características dietéticas de los sujetos de los 3 días previos al consumo de cada tipo de bebida a lo largo del estudio 2. Del mismo modo que sucedió en el estudio 1, el patrón dietético se mantuvo estable a lo largo del estudio sin diferencias significativas entre las 5 intervenciones llevadas a cabo durante el estudio 2.

**Tabla 6.** Evolución de las características clínicas y antropométricas de los sujetos durante el estudio 2<sup>1</sup>

	CE + 50 g HC en forma pan blanco (64,3 g de HC)	CIM + 50 g HC en forma pan blanco (64,3 g de HC)	CM + 50 g HC en forma pan blanco (64,3 g de HC)	Agua + 50 g HC en forma pan blanco (50 g de HC)	Agua + 64,3 g HC en forma pan blanco (64,3 g de HC)	p <sup>2</sup>
Peso corporal, kg	78,7 ± 17,1	77,3 ± 17,0	78,0 ± 17,0	77,7 ± 16,7	73,7 ± 20,9	0,279
PAS, mmHg	114 ± 10,8	105 ± 27,9	112 ± 12,9	119 ± 11,5	116 ± 11,2	0,108
PAD, mmHg	73,6 ± 8,01	69,9 ± 18,7	71,4 ± 7,83	75,9 ± 6,57	73,0 ± 7,46	0,866
Tiempo de consumo de cada bebida (min)	11,8 ± 3,78	11,0 ± 4,01	12,3 ± 5,32	9,95 ± 4,37	11,6 ± 3,84	0,379
<i>Actividad física</i>						
Actividad física vigorosa, METs/min	1138 ± 1480	1488 ± 1574	1032 ± 2010	1726 ± 1839	852 ± 1313	0,358
Actividad física moderada, METs/min	554 ± 867	548 ± 1247	586 ± 1146	653 ± 1606	556 ± 875	0,974
Caminar, METs/min	2453 ± 2475	2512 ± 2265	1701 ± 1777	1837 ± 1688	1970 ± 1943	0,605
Actividad física global, METs/min	4145 ± 2699	4548 ± 3493	3319 ± 2413	4216 ± 2550	3378,1 ± 2515	0,508

<sup>1</sup>Las variables cuantitativas se expresan como media ± DE. Abreviaturas que aplican en la siguiente tabla: HC: hidratos de carbono; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza sin alcohol con composición estándar. AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados.

<sup>2</sup>El p valor se calculó mediante la prueba ANOVA.

Tabla 7. Evolución de las características dietéticas de los sujetos durante el estudio 2.<sup>1</sup>

	Pan Blanco (50 g de HC)	Pan Blanco + CE (64,3 g de HC)	Pan Blanco + CM (64,3 g de HC)	Pan Blanco + CIM (64,3 g de HC)	Pan Blanco + Pan Blanco (64,3 g de HC)	p <sup>2</sup>
Energía, kcal	2057 ± 655	2035 ± 758	2025 ± 626	1963 ± 689	2029 ± 601	0,994
HC, % <sup>3</sup>	178 ± 69,8	188 ± 78,7	190 ± 77,5	182 ± 73,3	182 ± 69,5	0,985
Azúcares, g	71,2 ± 26,0	68,2 ± 25,4	76,9 ± 32,3	77,5 ± 26,5	73,8 ± 31,6	0,825
Polisacáridos, g	16,8 ± 9,19	17,0 ± 6,57	16,9 ± 8,13	19,0 ± 8,60	107 ± 51,7	0,807
Fibra, g	106 ± 38,2	95,2 ± 38,1	95,7 ± 29,3	87,7 ± 35,5	100 ± 34,7	0,593
Grasa, % <sup>3</sup>	33,8 ± 15,6	30,6 ± 14,4	30,8 ± 11,7	26,5 ± 13,2	31,2 ± 12,6	0,574
AGS, % <sup>3</sup>	44,3 ± 16,2	38,5 ± 14,6	39,8 ± 10,6	39,0 ± 15,4	42,4 ± 16,5	0,709
AGM, % <sup>3</sup>	18,1 ± 8,40	17,6 ± 9,84	14,7 ± 5,31	14,3 ± 7,38	17,5 ± 6,18	0,368
AGP, % <sup>3</sup>	378 ± 160	409 ± 235	389 ± 243	408 ± 220	358 ± 199	0,940
Colesterol, mg	94,8 ± 30,4	93,3 ± 32,6	87,9 ± 26,6	101 ± 32,5	93,0 ± 26,5	0,744
Proteínas, % <sup>3</sup>	2914 ± 1475	2973 ± 971	2939 ± 1277	3037 ± 1601	2651 ± 1108	0,911
Sodio, mg	2914 ± 1475	2973 ± 971	2939 ± 1277	3037 ± 1601	2651 ± 1108	0,911

<sup>1</sup>Las variables cuantitativas se expresan como media ± DE. Abreviaturas que aplican en la siguiente tabla: HC: hidratos de carbono; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza sin alcohol con composición estándar. AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados.

<sup>2</sup>El p valor se calculó mediante la prueba ANOVA.

<sup>3</sup>Expresado como porcentaje del total de calorías consumidas.

## 2. PARÁMETROS DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

### 3.1 ESTUDIO 1

#### 3.1.1 Variación e incremento de la glucosa

En la **Tabla 8** y **Figura 23A**, se muestra la variación de los niveles de glucosa durante los 120 minutos posteriores tras la ingesta de las diferentes bebidas durante el estudio 1. Los resultados muestran cómo el AUC de la variación de glucosa en sangre fue significativamente inferior después del consumo de CM que el AUC producido tras el consumo de CE ( $p = 0,016$ ). Sin embargo, cuando se compara el AUC de la variación de la glucosa tras el consumo de CIM y tras el consumo de la solución a base de glucosa, no se observaron diferencias significativas ( $p=0,772$ ).

Respecto al incremento máximo de glucosa, que fue calculado como la diferencia entre el valor basal y el pico máximo obtenido después de la ingesta de cada bebida, observamos como hubo diferencias significativas, produciéndose el mayor incremento máximo de glucosa tras el consumo de la CE, llegando a 60,4 mg/dL, seguido de la bebida a base de glucosa, que produjo 58,0 mg/dL frente a los 34,7 mg/dL producidos tras la ingesta de CIM y los 33,7 mg/dL de la CIM ( $p=0,005$ , **Tabla 12**). En esta línea, observamos en la **Figura 23B** como el AUC de variación del incremento máximo de glucosa fue significativamente menor después del consumo de CIM y CM que el producido después del consumo de la bebida a base de glucosa o CE.

**Tabla 8.** AUC de glucosa en sangre después de la ingesta de las bebidas correspondientes al estudio 1.<sup>1</sup>

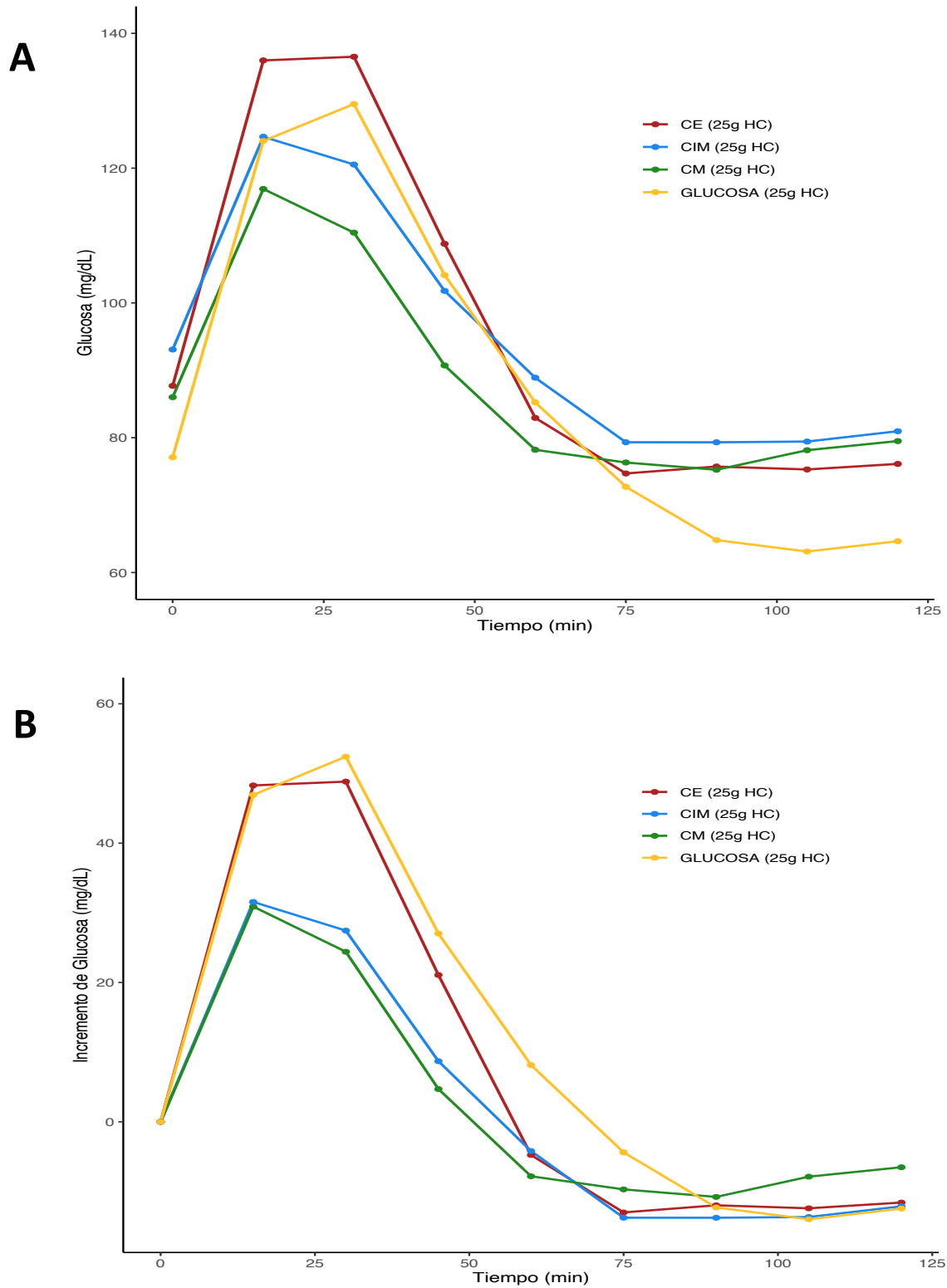
	<b>AUC GLUCOSA</b>	<b>95% IC</b>	<b>p2</b>	<b>p3</b>
CE (25 g de HC)	11578 ± 313	12211-10944	Ref.	0,027
CIM (25 g de HC)	11415 ± 241	11898-10932	0,608	0,085
CM (25 g de HC)	10631 ± 220	11077-10186	<b>0,016</b>	0,772
Glucosa (25 g de HC)	10721 ± 218	11162-10280	0,027	Ref.

<sup>1</sup>AUC significa área bajo la curva; HC: carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza estándar sin alcohol.

<sup>2</sup>El p valor denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia la AUC producida después del consumo de 25 g de HC procedente de CE y se calculó mediante la prueba t en el paquete PK.

<sup>3</sup>El p valor denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia la AUC producida tras el consumo de 25 g de HC procedente de la solución de glucosa y se calculó mediante la prueba t en el paquete PK.

**Figura 23.** Variación (A) e incremento máximo de glucosa en sangre (B) producidos tras el consumo de cada tipo de bebida en el estudio 1.



### 3.1.2. Variación e incremento de insulina

En la **Tabla 9 y Figura 24A**, se muestran las AUC de la variación de insulina en sangre después del consumo de cada bebida durante el estudio 1. En los resultados obtenidos, observamos como el AUC de la variación de insulina tras el consumo de CM y CIM fueron significativamente más bajas que el AUC producida tras el consumo de CE o de la bebida a base de glucosa ( $p = 0,036$ ;  $p = 0,024$ ;  $p < 0,001$  y  $p < 0,001$ , respectivamente).

Respecto al incremento máximo de insulina observamos diferencias significativas según cada una de las bebidas consumidas ( $p=0,012$ ), donde el mayor incremento de insulina se produjo después del consumo de CE, que alcanzó un valor máximo de insulina de 22,2  $\mu\text{U/mL}$  frente a los incrementos máximos alcanzados tras el consumo de CM, con 14,8  $\mu\text{U/mL}$  y CIM, con 12,1  $\mu\text{U/mL}$ , respectivamente (**Tabla 12 y Figura 24B**).

**Tabla 9.** AUC de insulina en sangre después de la ingesta de las bebidas correspondientes al estudio 1.<sup>1</sup>

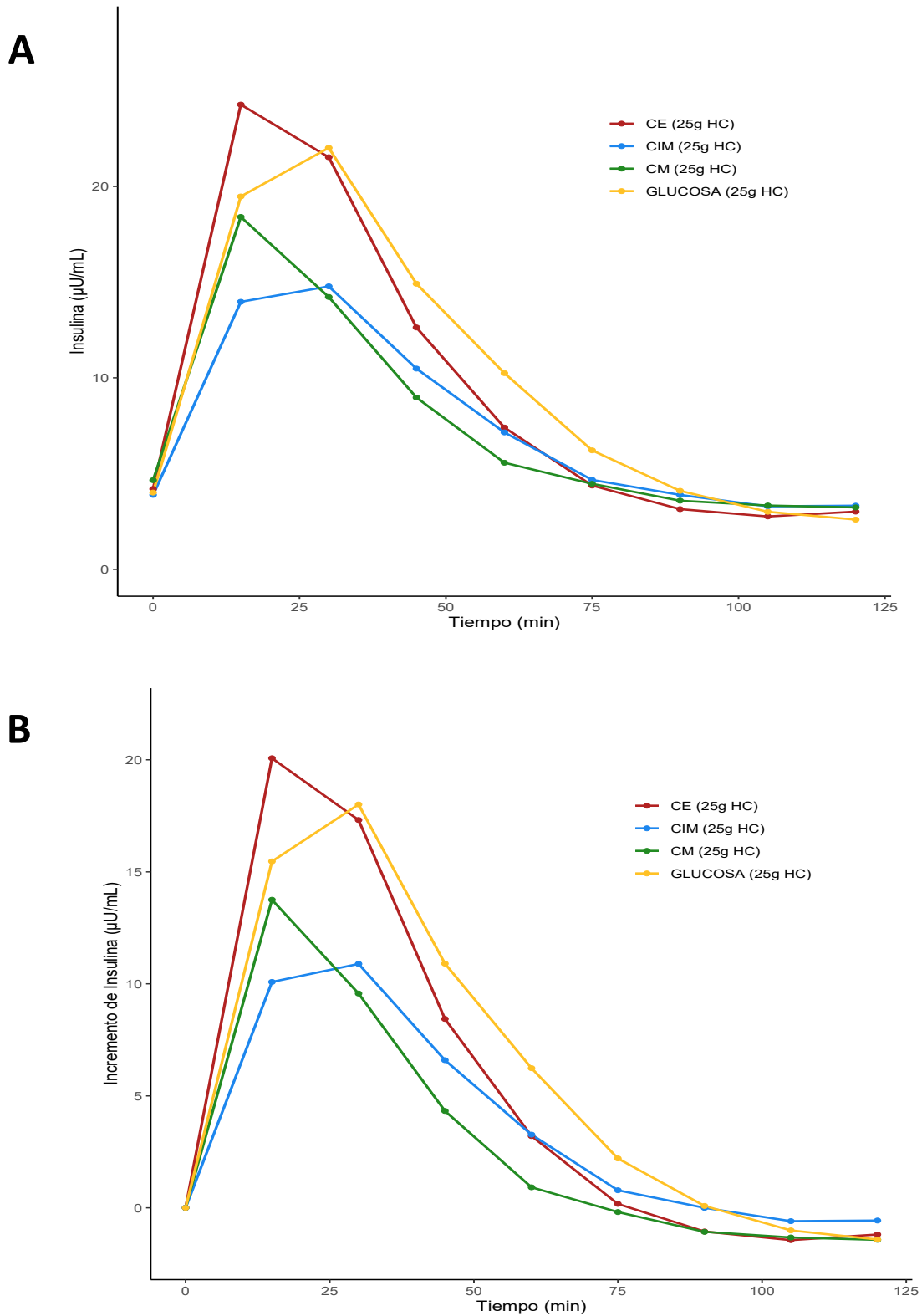
	<b>AUC INSULINA</b>	<b>95% IC</b>	<b><math>p^2</math></b>	<b><math>p^3</math></b>
CE (25 g de HC)	1196 $\pm$ 103,5	983 - 1408	Ref.	0,648
CIM (25 g de HC)	928 $\pm$ 51.3	824 - 1032	<b>0,024</b>	<b>&lt;0,001</b>
CM (25 g de HC)	937,6 $\pm$ 58,6	816 - 1059	<b>0,036</b>	<b>&lt;0,001</b>
Glucosa (25 g de HC)	1249 $\pm$ 50,7	1145 - 1353	0,648	Ref.

<sup>1</sup>AUC significa área bajo la curva; HC: carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza estándar sin alcohol.

<sup>2</sup>El valor  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia la AUC producida después del consumo de 25 g de HC procedente de CE y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

<sup>3</sup>El valor  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia la AUC producida tras el consumo de 25 g de HC procedente de la solución de glucosa y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK

**Figura 24.** Variación (A) e incremento máximo de insulina en sangre (B) producidos tras el consumo de cada tipo de bebida en el estudio 1.



### 3.1.3. Variación e incremento de GIP

En la **Tabla 10** y **Figura 25A**, se muestra las AUC de la variación de GIP en sangre producidas después del consumo de las diferentes bebidas consumidas en el estudio 1. Los resultados mostraron como la variación de GIP tras el consumo de CM y CIM fue significativamente menor que tras del consumo de CE y la bebida a base de glucosa ( $p < 0,001$ ).

Además, el incremento máximo de GIP fue significativamente menor después de la ingestión de CM o CIM que el producido tras el consumo de bebida a base de glucosa, que generó un incremento de 168 pg/mL, similar al incremento de 128 pg/mL producido tras la ingesta de la CE, ambos mucho mayores que los incrementos producidos tras la ingesta de las cervezas modificadas, donde la CM generó un incremento máximo de tan solo 34,6 pg/mL y la CIM de 18,9 pg/mL ( $p < 0,001$ , **Tabla 12** y **Figura 25B**).

**Tabla 10.** AUC de GIP en sangre después de la ingesta de las bebidas correspondientes al estudio 1.1

	<b>AUC GIP</b>	<b>95% IC</b>	<b><math>p^2</math></b>	<b><math>p^3</math></b>
CE (25 g de HC)	10065 ± 545	8961 - 11169	Ref.	0,077
CIM (25 g de HC)	6518 ± 324	5865 - 7172	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
CM (25 g de HC)	5795 ± 250	5290 - 6300	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
Glucosa (25 g de HC)	11801 ± 793	10180 - 13423	0,077	Ref.

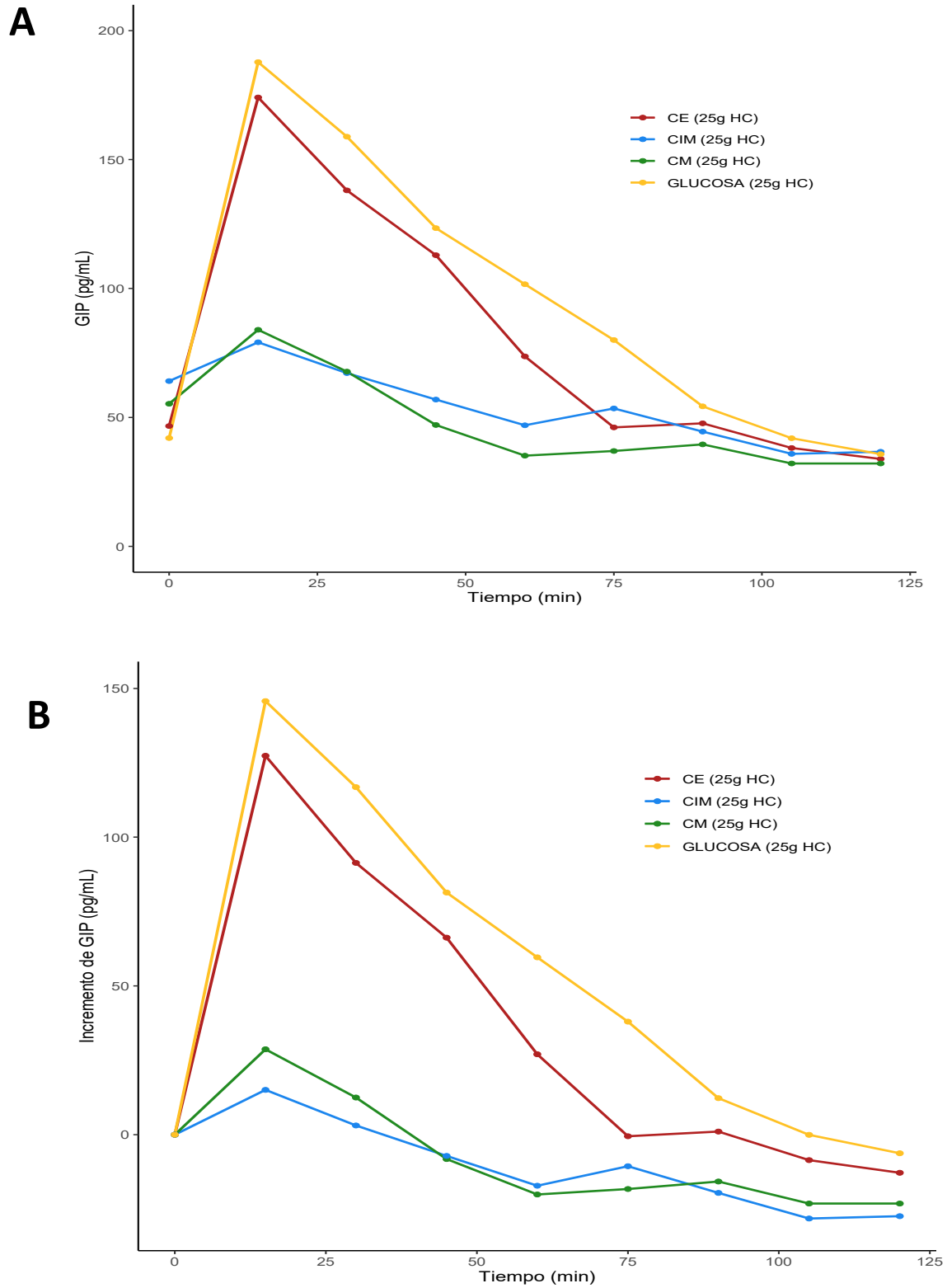
<sup>1</sup>AUC significa área bajo la curva; HC: carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza estándar sin alcohol.

<sup>2</sup>El valor  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia la AUC producida después del consumo de 25 g de HC procedente de CE y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

<sup>3</sup>El valor  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia la AUC producida tras el consumo de 25 g de HC procedente de la solución de glucosa y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.



**Figura 25.** Variación (A) e incremento máximo de GIP en sangre (B) producidos tras el consumo de cada tipo de bebida en el estudio 1.



### 3.1.4 Variación e incremento de GLP-1

En la **Tabla 11** y **Figura 26A** se muestra la variación de los niveles de GLP-1 producidos tras la ingesta de cada bebida durante el estudio 1. Observamos como el AUC de GLP-1 generada tras el consumo de la bebida a base de glucosa es significativamente más baja que el AUC producido después del consumo de cualquiera de las tres cervezas sin alcohol (CE, CM o CIM) ( $p < 0,001$ ).

Sin embargo, cuando se analizó el incremento máximo de GLP-1 no hubo diferencias significativas entre las AUC de los tres tipos de cervezas sin alcohol consumidas en el estudio 1, ya que el incremento máximo producido tras el consumo de CE fue de 17,9 pg/mL, similar al incremento máximo de 13,9 pg/mL generado tras el consumo de la bebida a base de glucosa, siendo ambos menores que los producidos tras el consumo de las cervezas modificadas, con 3,27 pg/mL y 1,67 pg/mL de las cervezas CIM y CM, respectivamente ( $p=0,529$ , **Tabla 12** y **Figura 26B**).

**Tabla 11.** AUC de GLP-1 en sangre después de la ingesta de las bebidas correspondientes al estudio 1.<sup>1</sup>

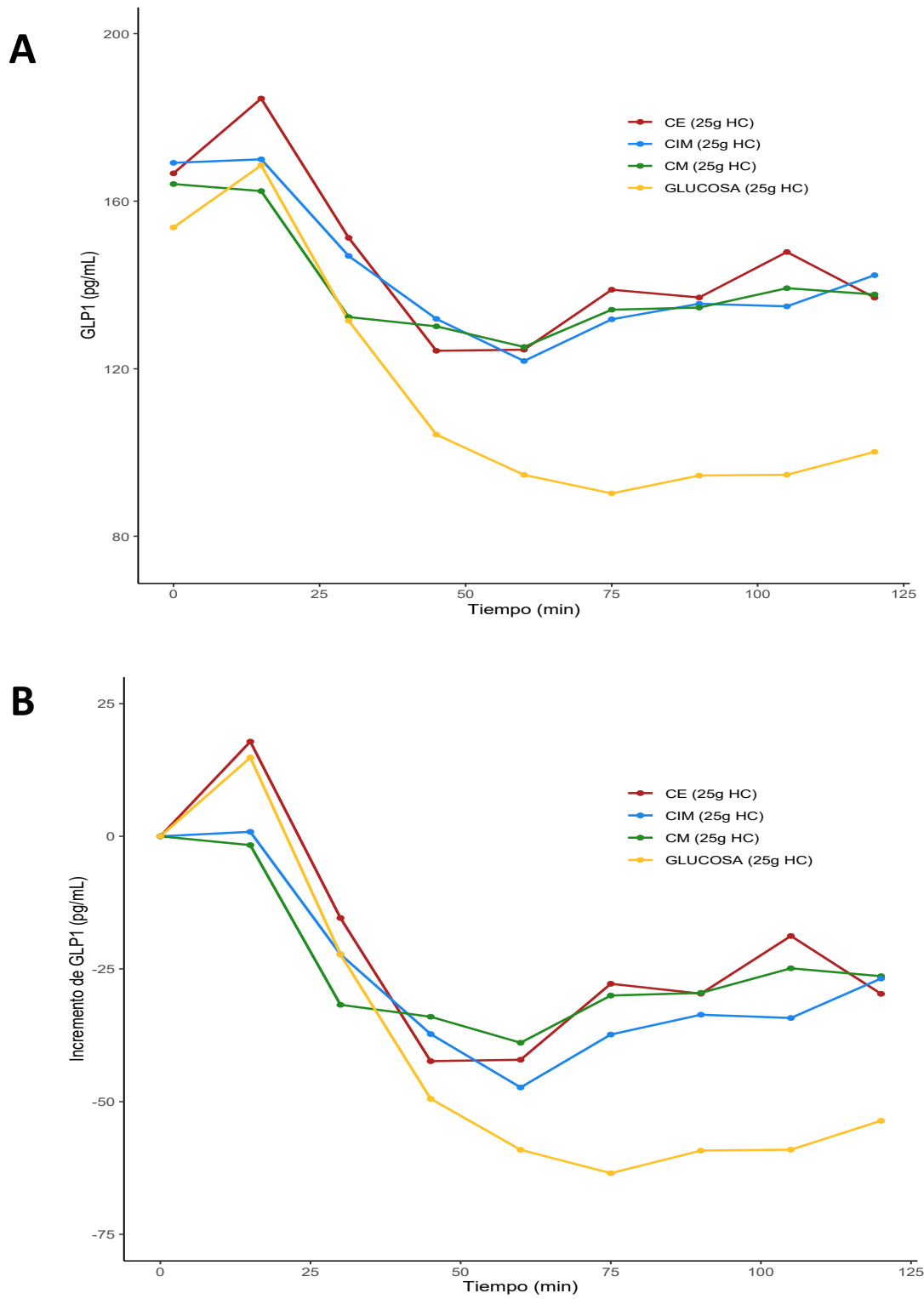
	<b>AUC GLP-1</b>	<b>95% IC</b>	<b><math>p^2</math></b>	<b><math>p^3</math></b>
CE (25 g de HC)	17402 ± 579	16246 - 18558	Ref.	<b>&lt;0,001</b>
CIM (25 g de HC)	16929 ± 639	15654 - 18203	0,584	<b>&lt;0,001</b>
CM (25 g de HC)	16633 ± 644	15341 - 17920	0,373	<b>&lt;0,001</b>
Glucosa (25 g de HC)	13580 ± 421	12739 - 14422	<b>&lt;0,001</b>	Ref.

<sup>1</sup>AUC significa área bajo la curva; HC: carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza estándar sin alcohol.

<sup>2</sup>El valor  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia la AUC producida después del consumo de 25 g de HC procedente de CE y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

<sup>3</sup>El valor  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia la AUC producida tras el consumo de 25 g de HC procedente de la solución de glucosa y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

**Figura 26.** Variación (A) e incremento máximo de GLP-1 en sangre (B) producidos tras el consumo de cada tipo de bebida en el estudio 1.



**Tabla 12.** Incremento máximo de glucosa, insulina, GIP y GLP-1 en sangre producidos tras el consumo de cada una de las bebidas en el estudio 1.

1

	Estudio 1				<i>p</i> <sup>2</sup>
	Cerveza sin alcohol estándar (CE) (25 g de HC)	Cerveza sin alcohol con isomaltulosa y maltodextrina resistente (CIM) (25 g de HC)	Cerveza sin alcohol con maltodextrina resistente (CM) (25 g de CH)	Solución a base de glucosa (25 g de HC)	
Pico máximo de glucosa, mg/dL	60,4 ± 24,1	33,7 ± 14,2*	34,7 ± 19,1*	58,0 ± 20,0	<b>0,005</b>
Pico máximo de insulina mg/dL	22,2 ± 12,2	12,1 ± 4,31*	14,8 ± 8,6+	18,8 ± 7,48	<b>0,012</b>
Pico máximo de GIP, pg/mL	128 ± 62,3	18,9 ± 23,8*	34,6 ± 22,1*	168 ± 112	<b>&lt;0,001</b>
Pico máximo de GLP1, pg/mL	17,9 ± 23,7	3,27 ± 33,0	1,67 ± 33,7	13,9 ± 35,0	0,529

<sup>1</sup>El aumento máximo de cada metabolito se calculó como la diferencia entre el valor máximo alcanzado durante 120 minutos y el valor basal. Las variables cuantitativas se expresaron como media ± DE. HC significa carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza estándar sin alcohol.

<sup>2</sup>El *p* valor se calculó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. \* Indica *p* <0,05 y + indica *p* <0,090 comparando CIM frente a CE o CM frente a CE, según corresponda, calculado mediante la prueba *t* en el paquete PK

### 3.2. ESTUDIO 2

#### 3.2.1 Variación e incremento de glucosa

En el estudio 2, el AUC de la variación de glucosa más bajo se produjo después del consumo de CM junto con pan blanco. De hecho, el consumo de 64,3 g de HC provenientes de CM con pan blanco produjo un AUC de glucosa significativamente más bajo que el producido después del consumo de la misma cantidad de HC procedentes únicamente de pan blanco ( $p=0,012$ , **Tabla 13**). Además, los AUC de glucosa producidos tras el consumo de 64,3 g de HC provenientes de la combinación de CM o CIM junto con pan blanco fueron significativamente inferiores a las AUC producidos tras el consumo de 64,3 g de HC provenientes de la ingesta de la CE junto con pan blanco ( $p=0,006$  y  $p<0,001$  respectivamente). De hecho, la mayor AUC fue la producida tras el consumo de 64,3 g de HC provenientes de la combinación de CE con pan blanco (**Figura 27A, Tabla 13**). El incremento máximo de glucosa difirió significativamente en función de la bebida ingerida ( $p=0,002$ , **Tabla 17**), mostrando que el AUC del incremento de glucosa fue significativamente superior tras la combinación de CE más pan blanco en comparación con el resto de combinaciones ( $p=0,002$ , **Figura 27B, Tabla 17**). Por el contrario, el menor incremento de glucosa se produjo tras la ingesta de las combinaciones de pan junto con las cervezas modificadas CM o CIM (**Figura 27B, Tabla 17**).

**Tabla 13.** AUC de glucosa producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2.<sup>1</sup>

	AUC GLUCOSA	95% IC	$p^2$	$p^3$	$p^4$
CE + Pan Blanco (64,3 g de HC)	14213 ± 179	13860 - 14568	0,055	0,204	Ref.
CIM + Pan Blanco (64,3 g de HC)	13590 ± 139	13315 - 13865	0,451	0,159	<b>0,006</b>
CM + Pan Blanco (64,3 g de HC)	13360 ± 133	13096 - 13624	0,067	<b>0,012</b>	<b>&lt;0,001</b>
Agua + Pan Blanco (64,3 g de HC)	13901 ± 169	13568 - 14235	0,518	Ref.	0,055
Agua + Pan Blanco (50 g de HC)	13751 ± 161	13433 - 14068	Ref.	0,518	0,204

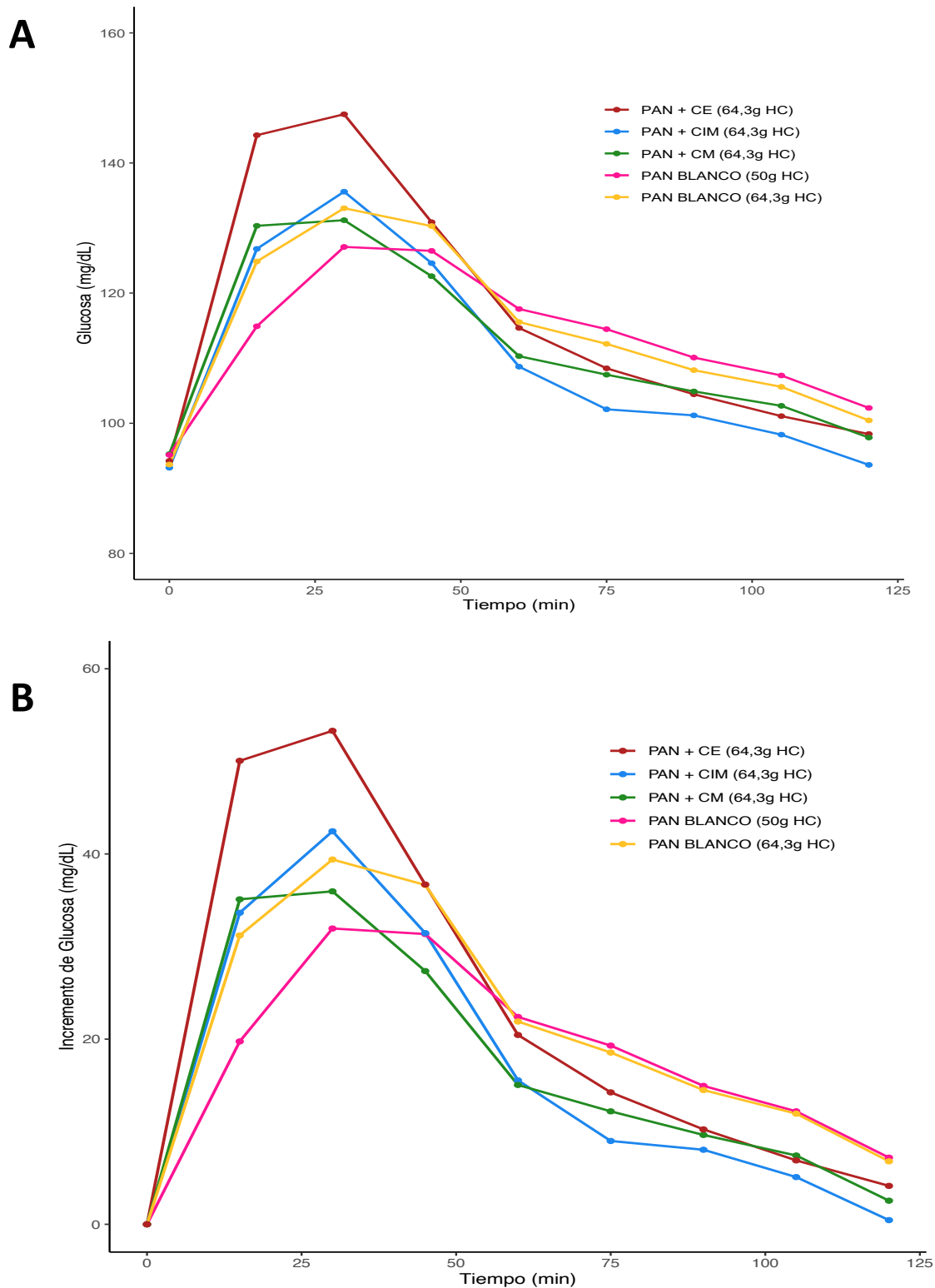
<sup>1</sup>AUC significa área bajo la curva; HC: carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza normal sin alcohol.

<sup>2</sup>El valor  $p$  denota la comparación entre los AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia el AUC producido después del consumo de 50 g de HC y agua y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

<sup>3</sup>El valor de  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, tomando como referencia las AUC producidas tras el consumo de 64,3 g de HC y agua, y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

<sup>4</sup>El valor de  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, tomando como referencia las AUC producidas tras el consumo de 14,3 g de HC provenientes de CE + 50 g de HC de pan blanco, y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

**Figura 27.** Variación (A) e incremento máximo de glucosa en sangre (B) producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.



### 3.2.2. Variación e incremento de insulina

El AUC correspondiente a la variación de insulina producida después del consumo de CE más pan blanco fue significativamente más alta que el AUC producido después de la ingestión de la misma cantidad de HC, provenientes todos ellos de pan blanco ( $p=0,043$ , **Tabla 14**). Mientras el consumo de CM o CIM junto con pan blanco, no produjo diferencias significativas frente al AUC producido tras la ingestión de la misma cantidad de HC, procedente todos ellos de pan blanco ( $p=0,128$  y  $p=0,554$ , respectivamente, **Tabla 14, Figura 28A**). Sin embargo, el consumo de CM junto con pan blanco produjo un AUC significativamente menor que el AUC producido después de la ingestión de CE combinada con pan blanco ( $p=0,028$ , **Tabla 14**).

Respecto al incremento máximo de insulina en sangre, no hubo diferencias significativas tras el consumo de las diferentes combinaciones de bebidas fermentadas junto con pan blanco ( $p=0,124$ , **Tabla 17**). Sin embargo, es importante destacar que el mayor incremento de insulina se produjo después del consumo de CE con pan blanco, llegando a alcanzar un pico de  $40,1 \mu\text{U/mL}$ , tal y como se muestra en la **Tabla 17 y Figura 28B**.

**Tabla 14.** AUC de insulina producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2.<sup>1</sup>

	AUC INSULINA	95% IC	$p^2$	$p^3$	$p^4$
CE + Pan Blanco (64,3 g de HC)	3115 ± 159	2798 - 3432	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,043</b>	Ref.
CIM + Pan Blanco (64,3 g de HC)	2847 ± 149	2552 - 3142	<b>0,017</b>	0,128	0,229
CM + Pan Blanco (64,3 g de HC)	2664 ± 127	2412 - 2915	<b>0,016</b>	0,554	<b>0,028</b>
Agua + Pan Blanco (64,3 g de HC)	2564 ± 105	2356 - 2771	<b>0,042</b>	Ref.	<b>0,043</b>
Agua + Pan Blanco (50 g de HC)	2234 ± 122	1993 - 2476	Ref.	<b>0,042</b>	<b>&lt;0,001</b>

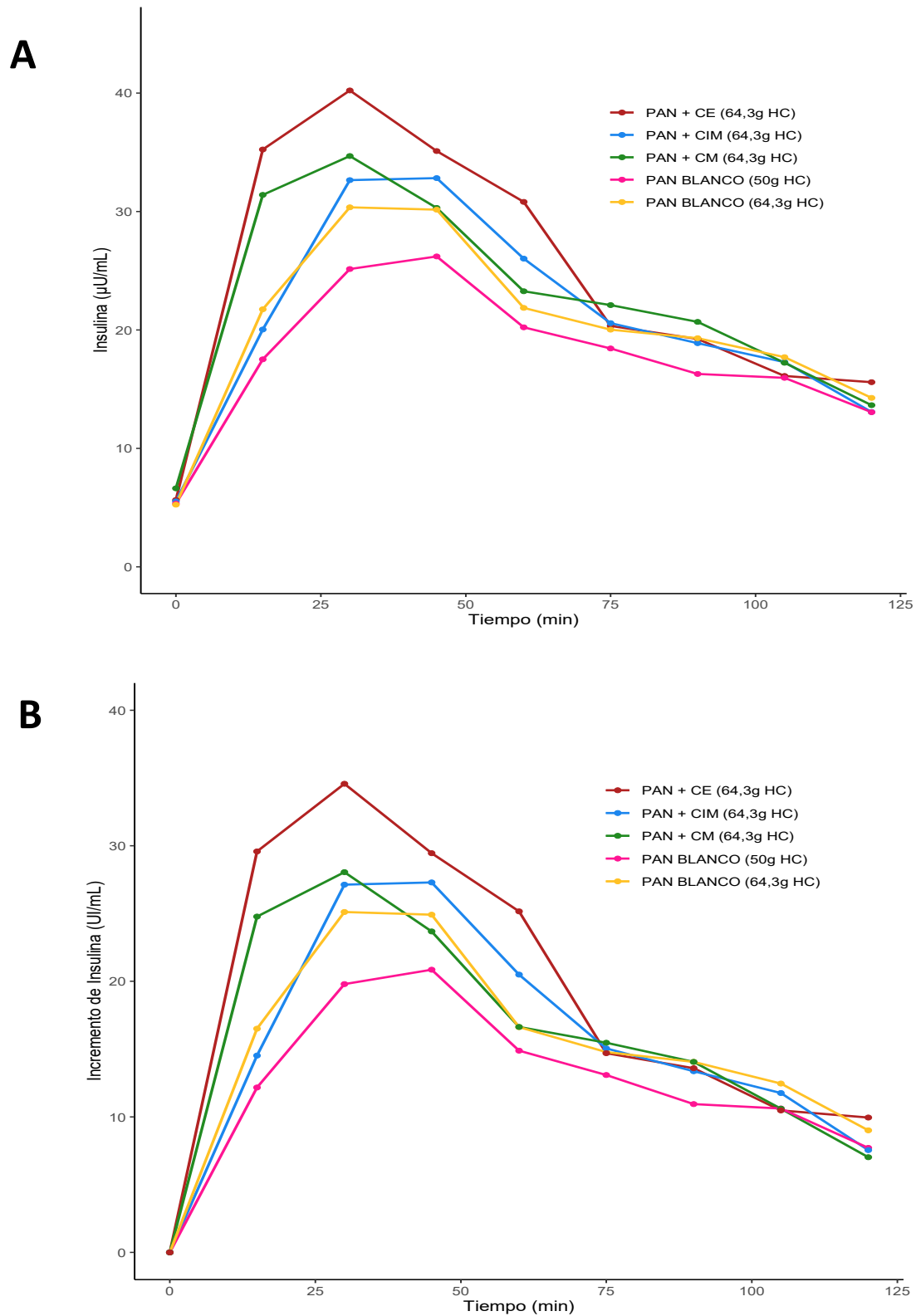
<sup>1</sup>AUC significa área bajo la curva; HC: carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza normal sin alcohol.

<sup>2</sup>El valor  $p$  denota la comparación entre los AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia el AUC producido después del consumo de 50 g de HC y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

<sup>3</sup>El valor de  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, tomando como referencia las AUC producidas tras el consumo de 64,3 g de HC y agua, y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

<sup>4</sup>El valor de  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, tomando como referencia las AUC producidas tras el consumo de 14,3 g de HC provenientes de CE + 50 g de HC de pan blanco, y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

**Figura 28.** Variación (A) e incremento máximo de insulina en sangre (B) producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.





### 3.2.2 Variación e incremento de GIP

En la **Tabla 15 y Figura 29A**, se muestra la variación de GIP en sangre después de la ingesta de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas durante el estudio 2, donde se observa que la menor AUC de GIP se produjo tras la ingesta de agua con 50 g de HC procedentes de pan blanco ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, cuando se comparan las variaciones de GIP tras la ingesta de la misma cantidad de HC, solamente la combinación de la CE junto con pan blanco produjo un AUC significativamente más elevada que el producido después del consumo de pan blanco y agua ( $p = 0,019$ ). Por el contrario, la variación de GIP no fue significativamente diferente tras el consumo de pan junto con las cervezas modificadas (CIM o CM), en comparación con la generada tras el consumo de la misma cantidad de HC, todos ellos provenientes de pan blanco ( $p = 0,857$  y  $p = 0,540$ , respectivamente). Además, las AUC de GIP después del consumo de CIM con pan blanco fue significativamente menor que la producida tras la ingesta de CE más pan blanco ( $p = 0,046$ , **Tabla 15, Figura 28A**). Cuando se analiza el incremento máximo de GIP, se observa que fue significativamente diferente dependiendo de la bebida ingerida ( $p = 0,011$ , **Tabla 17**). El mayor incremento de GIP se produjo después del consumo de CE junto con el pan blanco, llegando a generar un pico de 229 pg/mL, mientras que el menor incremento se produjo después de la ingestión de 50 g de HC, que tan solo generó un pico de 126 mg/dL (**Figura 29B, Tabla 17**).

**Tabla 15.** AUC de GIP producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2.1

	AUC GIP	95% IC	$p^2$	$p^3$	$p^4$
CE + Pan Blanco (64,3 g de HC)	25774 ± 1085	23627 - 27922	<0,001	0,019	Ref.
CIM + Pan Blanco (64,3 g de HC)	22545 ± 1194	20175 - 24915	<0,001	0,857	0,046
CM + Pan Blanco (64,3 g de HC)	23189 ± 1116	20978 - 25399	<0,001	0,540	0,098
Agua + Pan Blanco (64,3 g de HC)	22263 ± 1015	20244 - 24282	<0,001	Ref.	0,019
Agua + Pan Blanco (50 g de HC)	15994 ± 552	14902 - 17086	Ref.	<0,001	<0,001

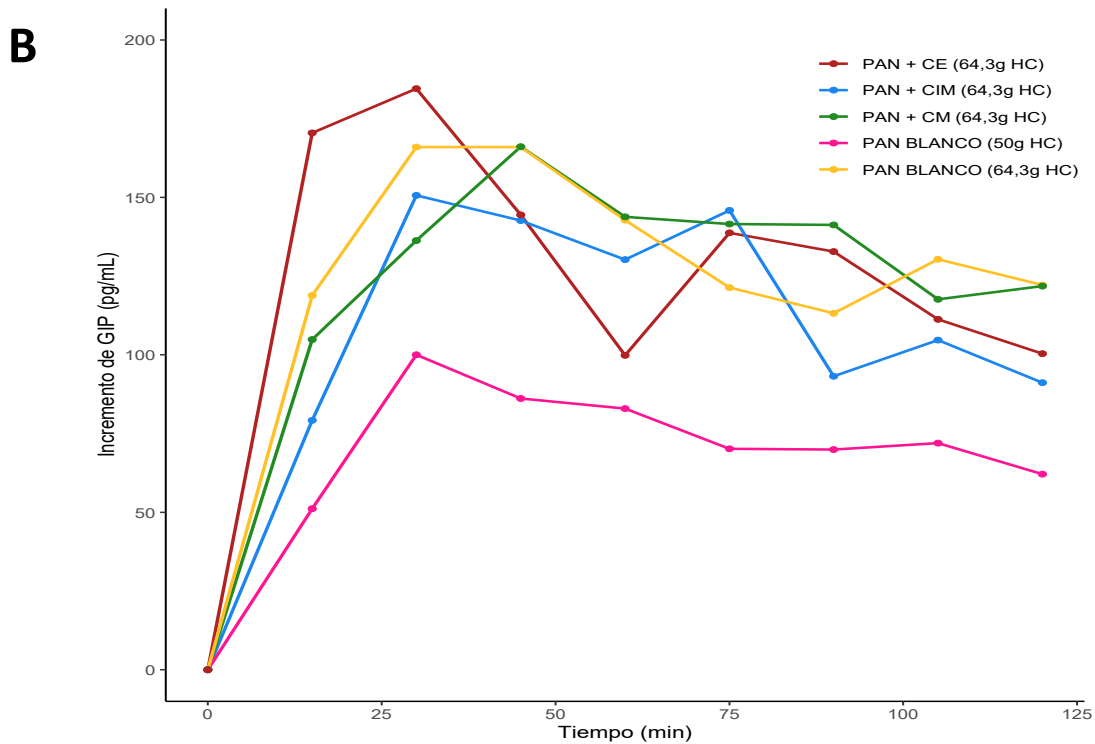
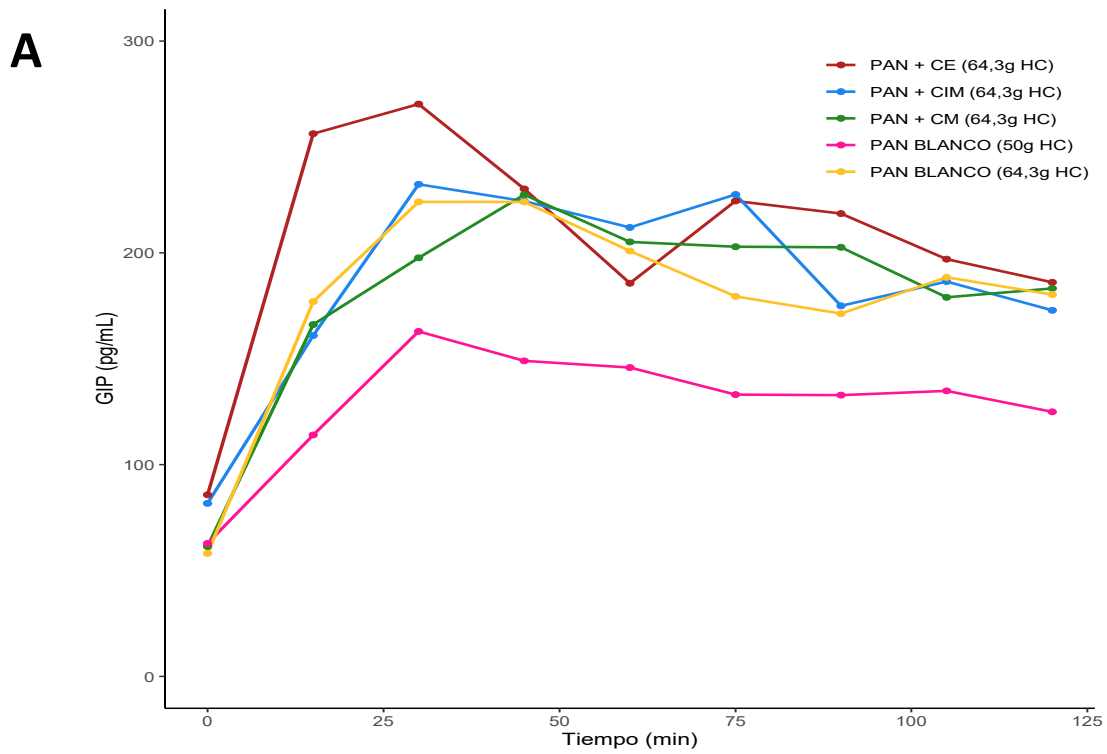
<sup>1</sup>AUC significa área bajo la curva; HC: carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza normal sin alcohol.

<sup>2</sup>El valor  $p$  denota la comparación entre los AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia el AUC producido después del consumo de 50 g de HC y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

<sup>3</sup>El valor de  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, tomando como referencia las AUC producidas tras el consumo de 64,3 g de HC y agua, y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

<sup>4</sup>El valor de  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, tomando como referencia las AUC producidas tras el consumo de 14,3 g de HC provenientes de CE + 50 g de HC de pan blanco, y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

**Figura 29.** Variación (A) e incremento máximo de GIP en sangre (B) producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.



### 3.2.3 Variación e incremento de GLP-1

En la **Tabla 16** y **Figura 30A** se muestra el AUC de la variación de los niveles de GLP-1 en sangre después de la ingesta de las diferentes bebidas combinadas con el pan blanco en el estudio 2. Los resultados muestran cómo el AUC más baja se produjo después de la ingesta de agua con 50 g de HC procedentes de pan blanco. Cuando se compararon las AUC producidas entre las tres cervezas sin alcohol, solo se observaron diferencias significativas entre el consumo de CIM y pan blanco con un AUC significativamente menor que el AUC producido tras la ingesta de CE con pan blanco ( $p = 0,028$ , **Tabla 16**, **Figura 30A**).

Respecto al incremento máximo de GLP-1 producido tras la ingesta de pan blanco combinado con las diferentes bebidas, no se observaron diferencias significativas en función del tipo de bebida consumida ( $p=0,058$ , **Tabla 17**). El menor incremento de GLP-1 se produjo tras la ingesta de CIM con pan blanco, que llegó a generar un pico de 13,3 pg/mL, mientras que el mayor incremento de GLP-1 se produjo tras la ingesta de la misma cantidad de HC, provenientes en su totalidad del pan blanco, que llegaron a generar un pico de 46,6 pg/mL (**Figura 30B**, **Tabla 17**).

**Tabla 16.** AUC de GLP-1 producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2.1

	AUC GLP-1	95% IC	$p^2$	$p^3$	$p^4$
CE + Pan Blanco (64,3 g de HC)	20813 ± 614	19599 - 22027	<0,001	0,074	Ref.
CIM + Pan Blanco (64,3 g de HC)	18338 ± 542	17266 - 19410	<b>0,005</b>	0,119	<b>0,028</b>
CM + Pan Blanco (64,3 g de HC)	19560 ± 585	18404 - 20715	<b>&lt;0,001</b>	0,874	0,141
Agua + Pan Blanco (64,3 g de HC)	19443 ± 453	18547 - 20339	<b>&lt;0,001</b>	Ref.	0,074
Agua + Pan Blanco (50 g de HC)	16286 ± 489	15320 - 17253	Ref.	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

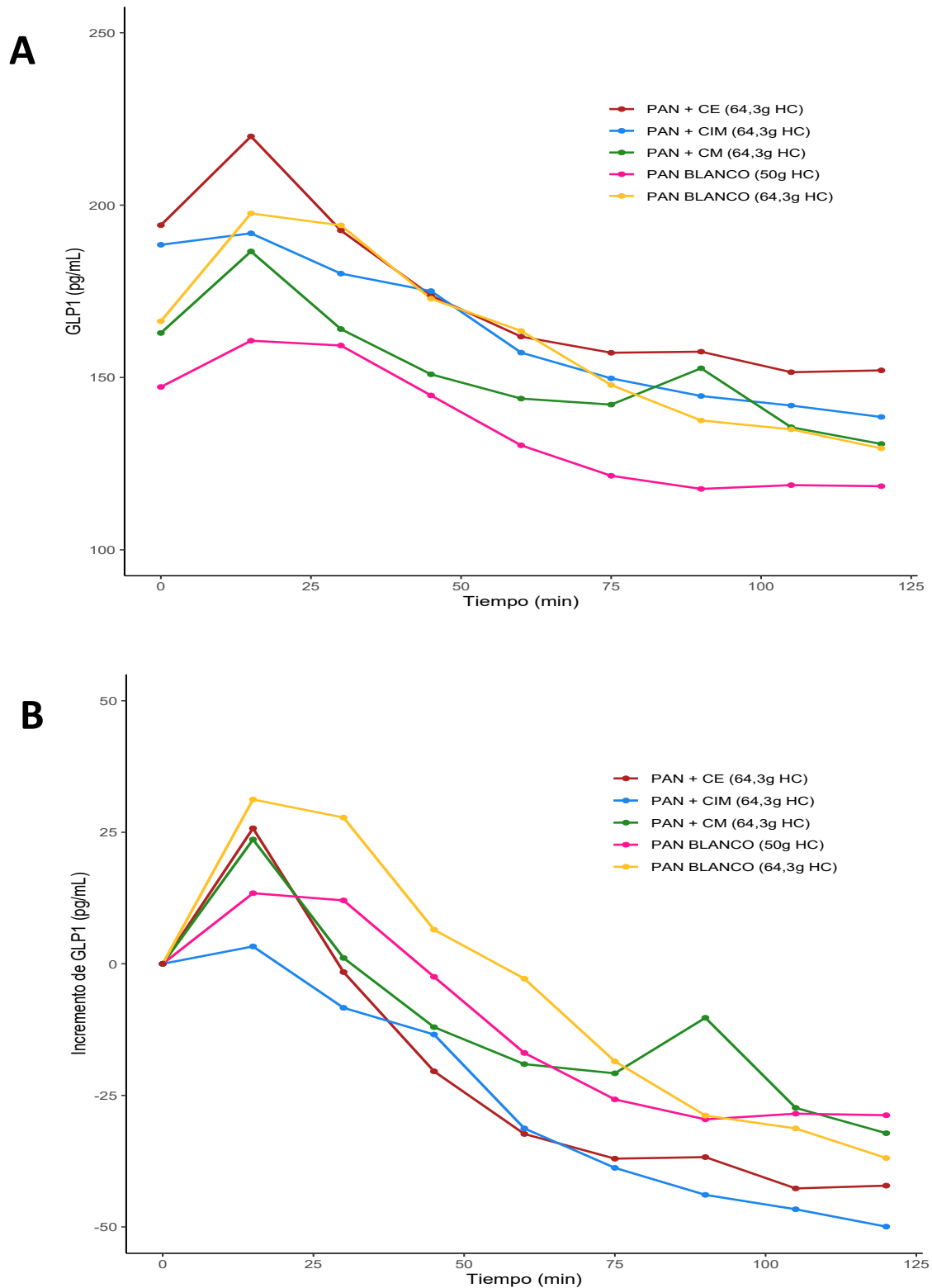
<sup>1</sup>AUC significa área bajo la curva; HC: carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza normal sin alcohol.

<sup>2</sup>El valor  $p$  denota la comparación entre los AUC que producen las comparaciones de dos a dos, utilizando como referencia el AUC producido después del consumo de 50 g de HC y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

<sup>3</sup>El valor de  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, tomando como referencia las AUC producidas tras el consumo de 64,3 g de HC y agua, y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

<sup>4</sup>El valor de  $p$  denota la comparación entre las AUC que producen las comparaciones de dos a dos, tomando como referencia las AUC producidas tras el consumo de 14,3 g de HC provenientes de CE + 50 g de HC de pan blanco, y se calculó mediante la prueba  $t$  en el paquete PK.

**Figura 30.** Variación (A) e incremento máximo de GLP-1 en sangre (B) producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.



**Tabla 17.** Incremento máximo de glucosa, insulina, GIP y GLP-1 producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2. <sup>1</sup>

	Estudio 2					
	CE + 50 g de HC de pan blanco (64,3 g de HC)	CIM + 50 g de HC de pan blanco (64,3 g de HC)	CM + 50 g de HC de pan blanco (64,3 g de HC)	Agua + 50 g de HC de pan blanco (50 g de HC)	Agua + 64,3 g de HC de pan blanco (64,3 g de HC)	<i>p</i> <sup>2</sup>
Pico máximo de glucosa, mg/dL	58,3 ± 14,9	44,7 ± 9,83*	41,1 ± 10,8*	41,2 ± 13,2	48,1 ± 14,8	<b>0,002</b>
Pico máximo de insulina, mg/dL	40,1 ± 17,8	31,1 ± 11,7+	35,9 ± 19,4	27,7 ± 14,9	30,5 ± 11,4	0,124
Pico máximo de GIP, pg/mL	229 ± 134	240 ± 189	229 ± 194	126 ± 41,4	216 ± 185	<b>0,011</b>
Pico máximo de GLP-1, pg/mL	27,0 ± 47,3	13,3 ± 33,7	28,8 ± 29,0	21,3 ± 30,9	46,6 ± 45,1	0,058

<sup>1</sup> El aumento máximo de cada metabolito se calculó como la diferencia entre el valor máximo alcanzado durante 120 minutos y el valor basal. Las variables cuantitativas se expresaron como media ± desviación estándar. HC significa carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza estándar sin alcohol.

<sup>2</sup> El *p* valor se calculó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. \* Indica *p* <0,05 y + indica *p* <0,090 comparando CIM frente a CE o CM frente a CE, según corresponda, calculado mediante la prueba *t* en el paquete

#### 4. HORMONAS GASTROINTESTINALES Y ADIPOCINAS

##### 4.1 Variación de los niveles de grelina, glucagón, PP, PY y leptina.

En la **Tabla 18** y **Figuras 31A y 31B** se muestra la variación de las hormonas gastrointestinales grelina y glucagón. En la **Tabla 19** y **Figura 32A y 32B**, se muestra la variación de hormonas gastrointestinales PY y PP. En la **Tabla 20** y **Figura 33**, se muestra la variación de leptina. Estas hormonas gastrointestinales glucagón, grelina, el PY y el PP y leptina juegan un papel fundamental en la regulación del apetito y la saciedad, entre otros efectos. Para todas ellas, se analizaron los valores basales, a los 60 y a los 120 minutos únicamente en el estudio 2, tal y como se ha explicitado en el apartado correspondiente a la metodología. Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas en la variación de estos metabolitos, tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas (**Tabla 18, 19 y 20** y **Figuras 31A, 31B, y Figura 32A, 32B y Figura 33**).

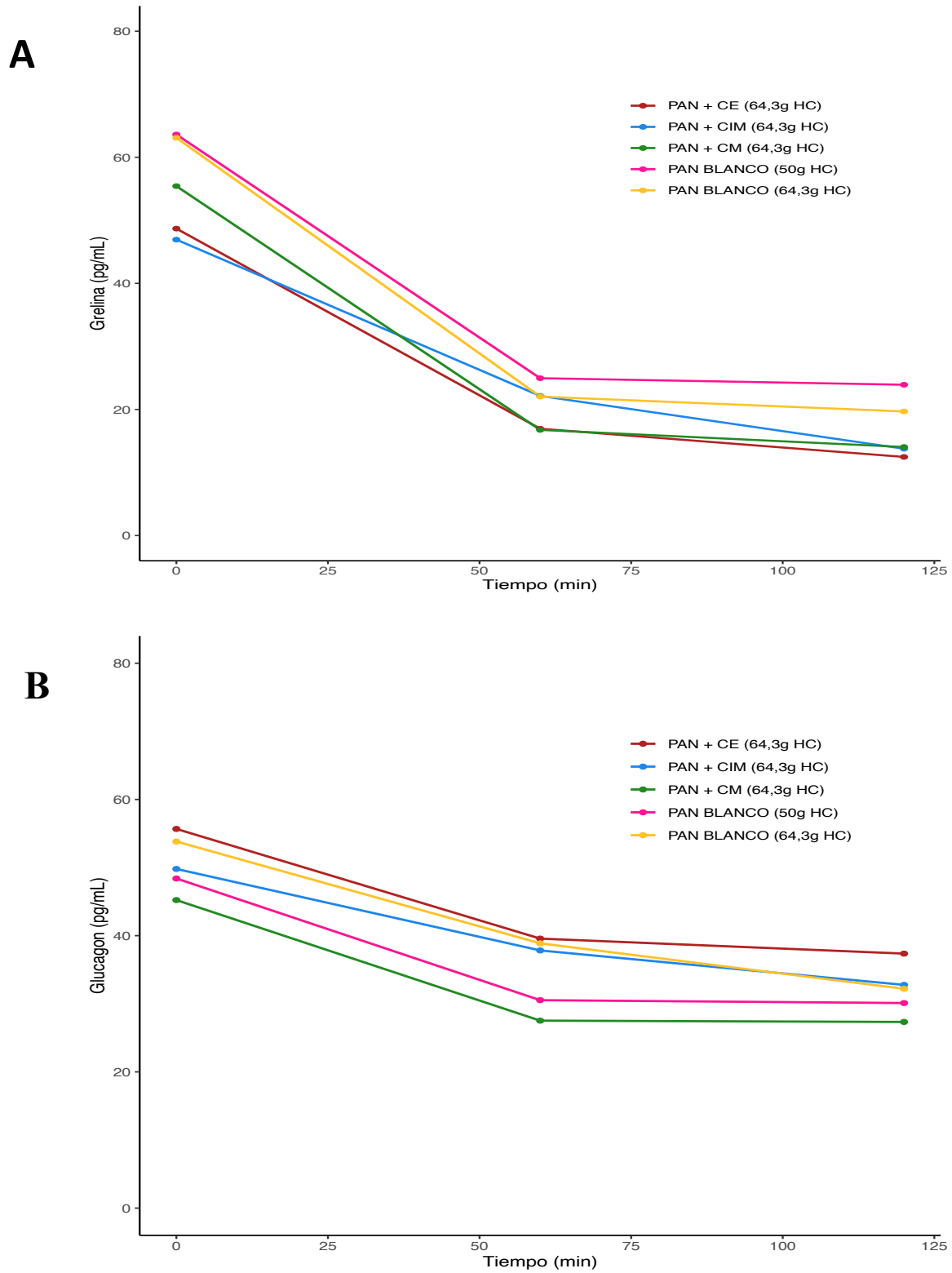
**Tabla 18.** AUC de la concentración de grelina y glucagón producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.

<b>GRELINA</b>	<b>Basal (pg/mL)</b>	<b>60 minutos (pg/mL)</b>	<b>120 minutos (pg/mL)</b>	<b>p<sup>2</sup></b>
CE + Pan blanco (64,3 g de HC)	49,3 (16,2 – 64,3)	11,8 (10,4 – 18,4)	11,6 (10,6 – 13,0)	0,942
CIM + Pan blanco (64,3 g de HC)	48,8 (31,3 – 84,3)	13,0 (12,1- 17,3)	13,0 (10,6 – 13,8)	
CM + Pan blanco (64,3 g de HC)	36,6 (23,9 – 65,3)	13,7 (11,8 – 27,3)	13,0 (11,5 – 16,4)	
Agua + Pan blanco (64,3 g de HC)	57,8 (19,2 – 90,3)	12,6 (10,6 – 17,9)	13,0 (10,6 – 17,2)	
Agua + Pan blanco (50 g de HC)	51,4 (20,6 – 74,7)	17,9 (12,9 – 34,0)	13,0 (11,0 – 33,3)	
<b>GLUCAGÓN</b>	<b>Basal (pg/mL)</b>	<b>60 minutos (pg/mL)</b>	<b>120 minutos (pg/mL)</b>	<b>p<sup>2</sup></b>
CE + Pan blanco (64,3 g de HC)	53,0 (44,1 – 60,0)	37,5 (24,4 – 53,2)	33,4 (19,6 – 47,2)	0,988
CIM + Pan blanco (64,3 g de HC)	43,9 (36,1 – 57,8)	23,0 (16,8 – 35,7)	24,9 (15,0 – 37,4)	
CM + Pan blanco (64,3 g de HC)	47,6 (38,2 – 62,5)	34,0 (27,1 – 47,5)	33,6 (18,1 – 40,3)	
Agua + Pan blanco (64,3 g de HC)	46,9 (36,9 – 61,5)	31,5 (23,4 – 53,4)	30,3 (20,6 – 39,2)	
Agua + Pan blanco (50 g de HC)	45,9 (36,4 – 54,5)	28,4 (19,1 – 42,9)	29,7 (15,0 – 39,5)	

<sup>1</sup>AUC significa área bajo la curva; HC: carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza normal sin alcohol.

<sup>2</sup> El p valor denota la comparación entre las AUC y se calculó mediante la prueba t en el paquete PK.

**Figura 31.** Variación de grelina **A)** de glucagón **B)** producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2



**Tabla 19.** AUC de la concentración de PP y PY producidos tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.

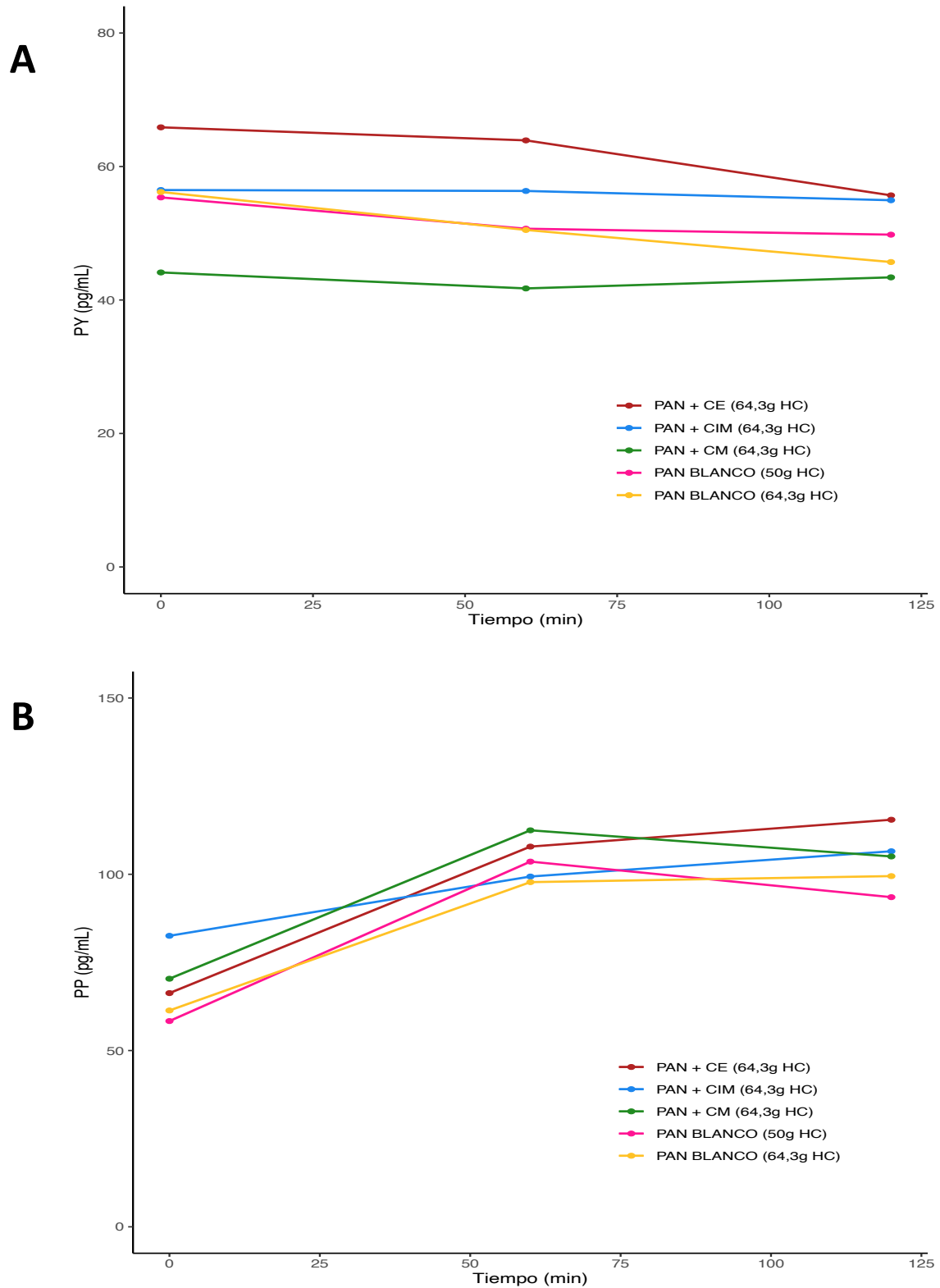
PP	Basal (pg/mL)	60 minutos (pg/mL)	120 minutos (pg/mL)	$p^2$
CE + Pan blanco (64,3 g de HC)	47,1 (31,4 – 65,7)	79,9 (65,7 – 105)	83,8 (57,4 – 132)	<b>0,982</b>
CIM + Pan blanco (64,3 g de HC)	47,2 (23,5 – 56,7)	82,0 (52,8 – 122)	71,0 (39,2 – 120)	
CM + Pan blanco (64,3 g de HC)	49,5 (37,1 – 88,6)	76,8 (46,3 – 127)	94,7 (47,4 – 114)	
Agua + Pan blanco (64,3 g de HC)	43,8 (35,5 – 58,7)	70,2 (47,8 – 110)	78,3 (63,4 – 112)	
Agua + Pan blanco (50 g de HC)	36,0 (30,2 – 55,3)	84,3 (41,7 – 117)	65,6 (38,4 – 99,5)	
PY	Basal (pg/mL)	60 minutos (pg/mL)	120 minutos (pg/mL)	$p^2$
CE + Pan blanco (64,3 g de HC)	13,0 (13,0 – 93,2)	30,0 (13,0 – 85,5)	13,0 (13,0 – 78,9)	<b>0,992</b>
CIM + Pan blanco (64,3 g de HC)	13,0 (13,0 – 58,9)	13,0 (13,0 – 51,1)	13,0 (13,0 – 58,4)	
CM + Pan blanco (64,3 g de HC)	13,0 (13,0 – 97,2)	13,0 (13,0 – 106)	13,0 (13,0 – 101)	
Agua + Pan blanco (64,3 g de HC)	13,0 (13,0 – 97,8)	20,5 (13,0 – 69,8)	13,0 (13,0 – 62,5)	
Agua + Pan blanco (50 g de HC)	26,8 (13,0 – 99,3)	13,0 (13,0 – 102)	13,0 (13,0 – 88,3)	

<sup>1</sup>AUC significa área bajo la curva; HC: carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza normal sin alcohol; PP: polipéptido pancreático; PY: polipéptido Y.

<sup>2</sup> El p valor denota la comparación entre las AUC y se calculó mediante la prueba t en el paquete PK.



**Figura 32.** Variación de PY **A)** y de PP **B)** producida después del consumo de cada una de las bebidas junto a pan blanco en el estudio 2.



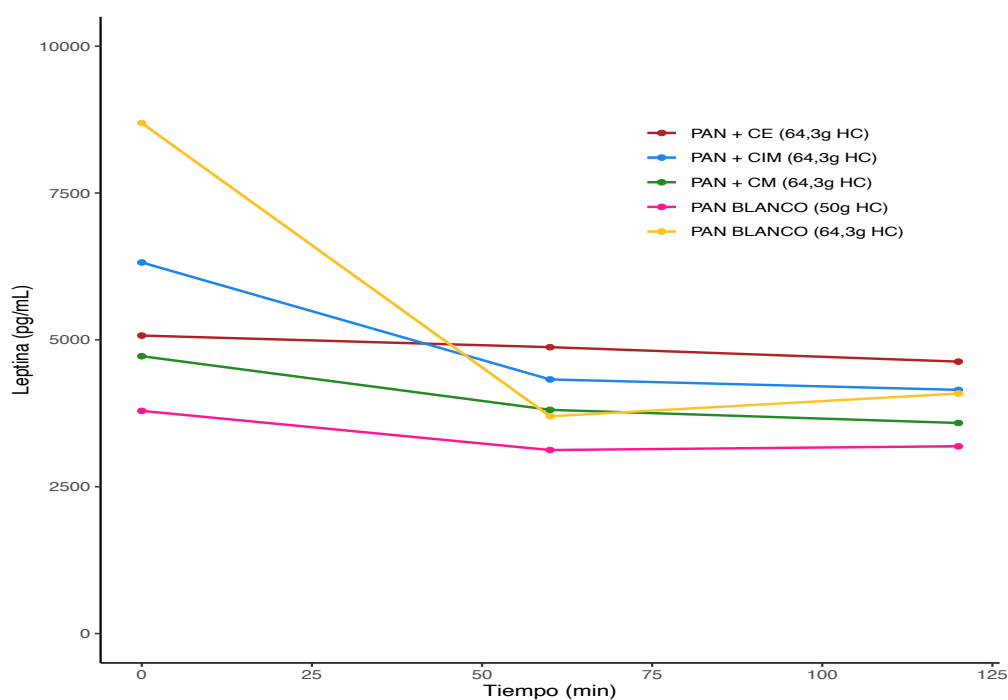
**Tabla 20.** AUC de la concentración de leptina tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2.

LEPTINA	Basal (pg/mL)	60 minutos (pg/mL)	120 minutos (pg/mL)	p <sup>2</sup>
CE + Pan blanco (64,3 g de HC)	3684 (1386 – 6801)	2714 (1243 – 6057)	3079 (1145 – 5408)	0,723
CIM + Pan blanco (64,3 g de HC)	2732 (980 – 5038)	2195 (824 – 4047)	2066 (819- 3804)	
CM + Pan blanco (64,3 g de HC)	3101 (1150 – 6119)	2450 (1178 – 4567)	2414 (1056 – 4389)	
Agua + Pan blanco (64,3 g de HC)	2576 (1372 – 7047)	2030 (1087 – 5380)	2281 (1033 – 6204)	
Agua + Pan blanco (50 g de HC)	2030 (1374 – 4289)	1977 (1177 – 3609)	1861 (1056 – 3533)	

<sup>1</sup>AUC significa área bajo la curva; HC: carbohidratos; CIM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL); CM: cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de HC regular y enriquecida con maltodextrina (2,0 g/100 mL); CE: cerveza normal sin alcohol;

<sup>2</sup> El p valor denota la comparación entre las AUC y se calculó mediante la prueba t en el paquete PK.

**Figuras 33. A)** Variación de leptina tras el consumo de pan blanco en combinación con las diferentes bebidas en el estudio 2



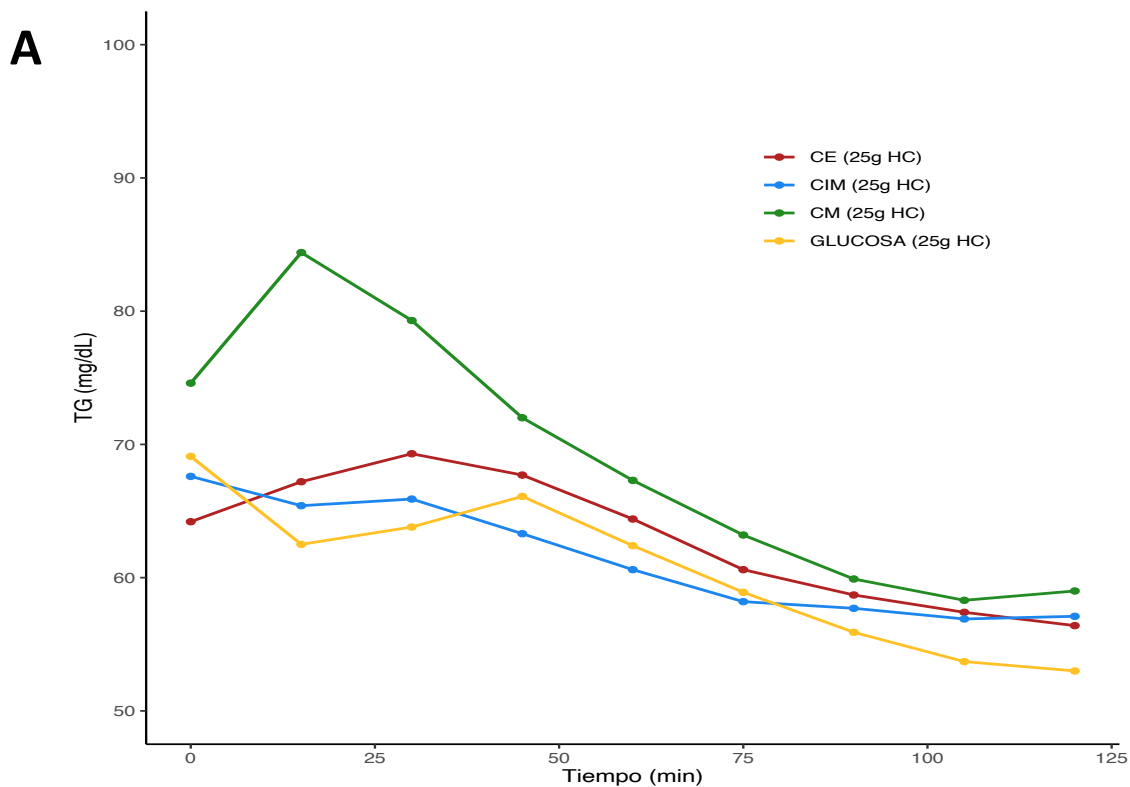
## 5. PARÁMETROS DEL PERFIL LIPÍDICO

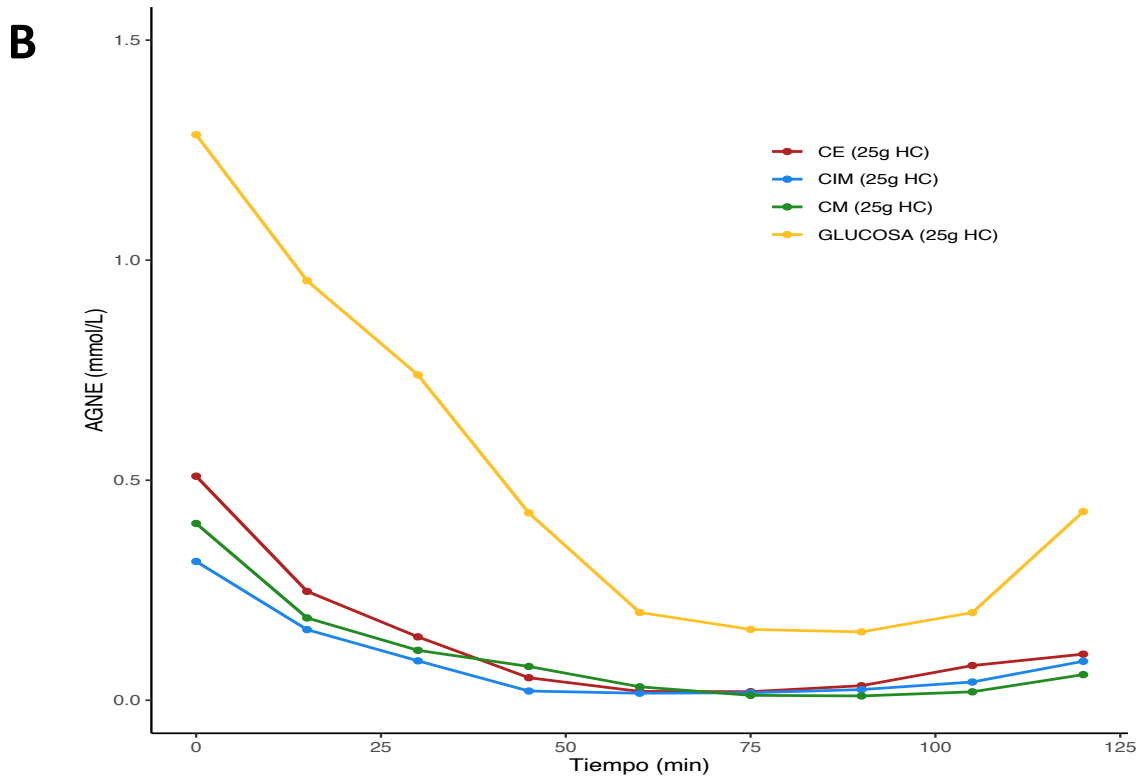
### 5.1 ESTUDIO 1

#### 5.1.1. Variación de los niveles de triglicéridos y AGNE

En la **Figura 34A y 34B** se muestran las AUC de la variación de los niveles de TG y AGNE tras el consumo de las diferentes bebidas del estudio 1. Los resultados mostraron como las AUC de la variación de los niveles de TG en sangre tras la ingesta de diferentes cervezas sin alcohol y la bebida a base de glucosa no fueron significativamente diferentes ( $p=0,436$ , **Figura 34A**). En la misma línea, la variación de los niveles de AGNE no mostraron diferencias significativas tras de la ingesta de cada bebida, generando similares descensos tras la ingesta de cada una de las bebidas incluidas en el estudio 1 ( $p=0,235$ , **Figura 34B**).

**Figura 34.** Variación de los niveles de TG (A) y AGNE (B) producidos tras el consumo de cada tipo de bebida en el estudio 1.



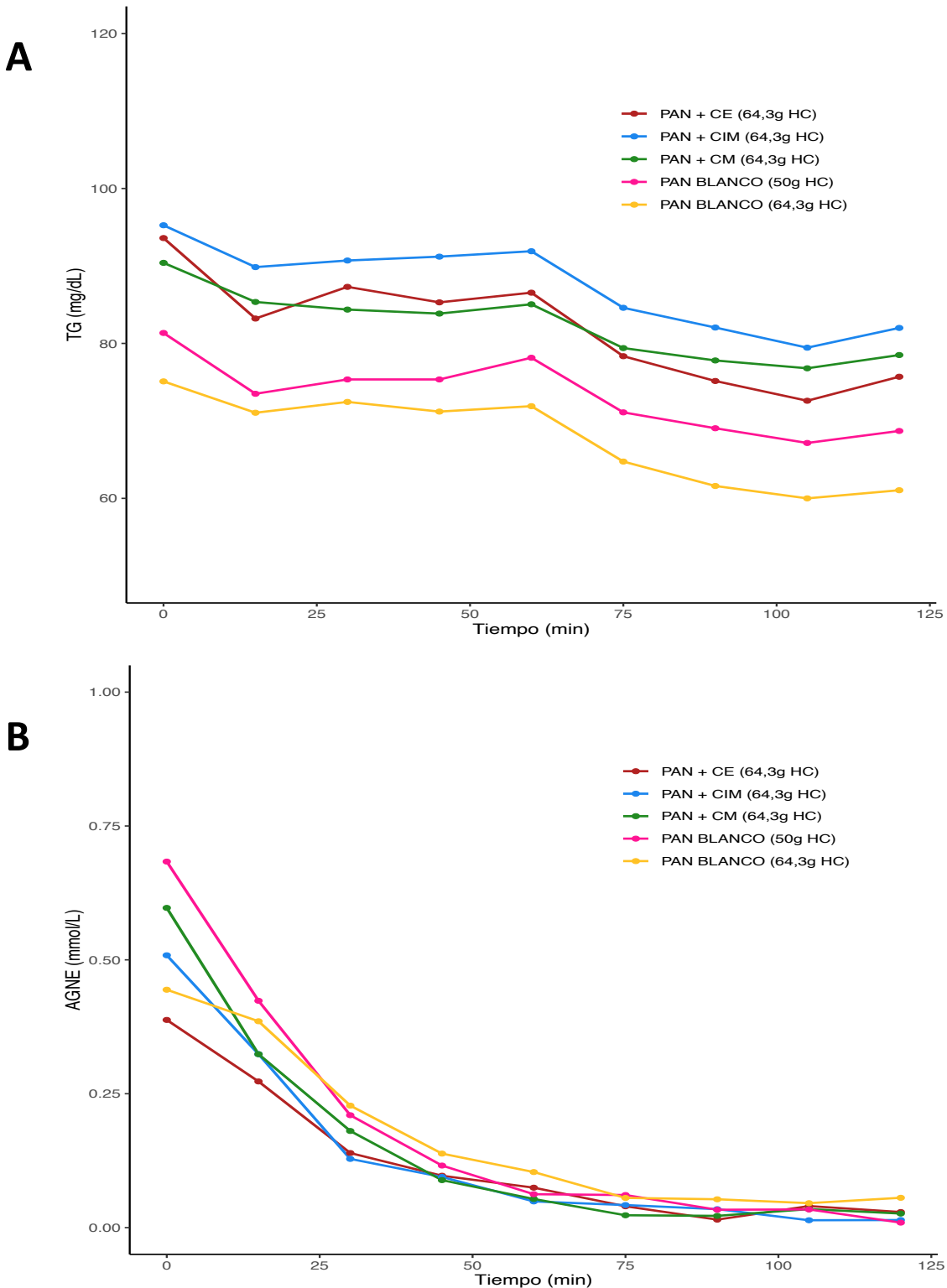


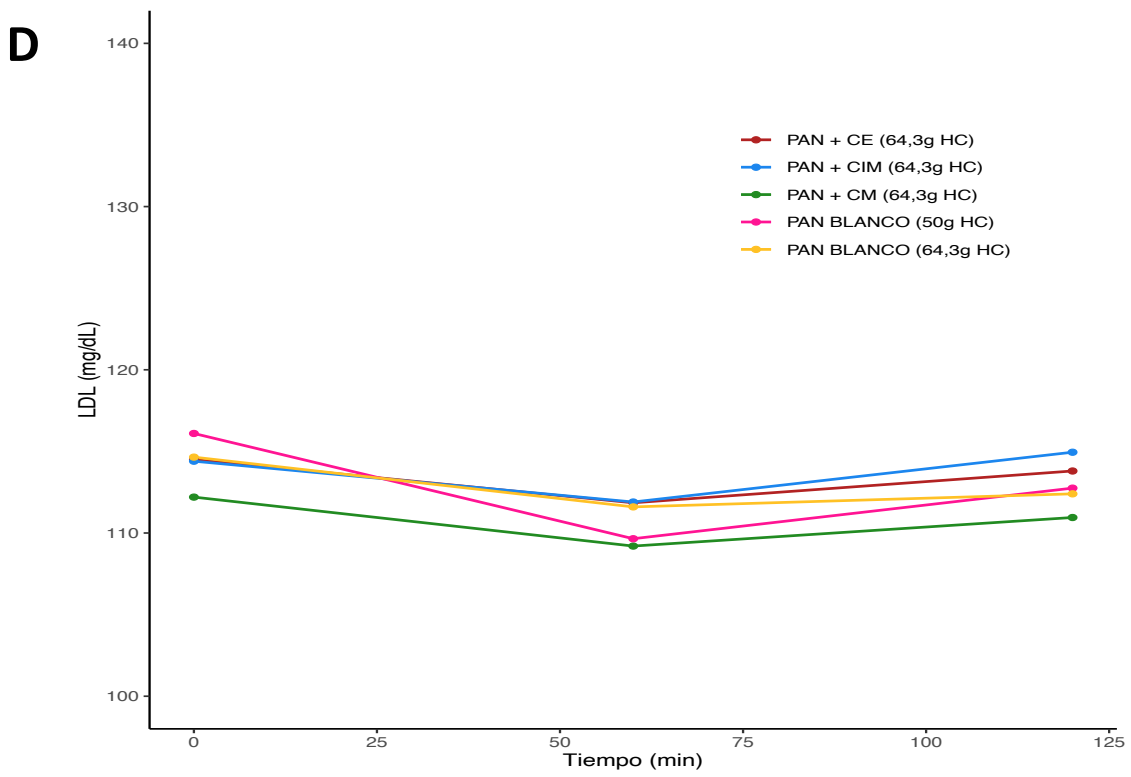
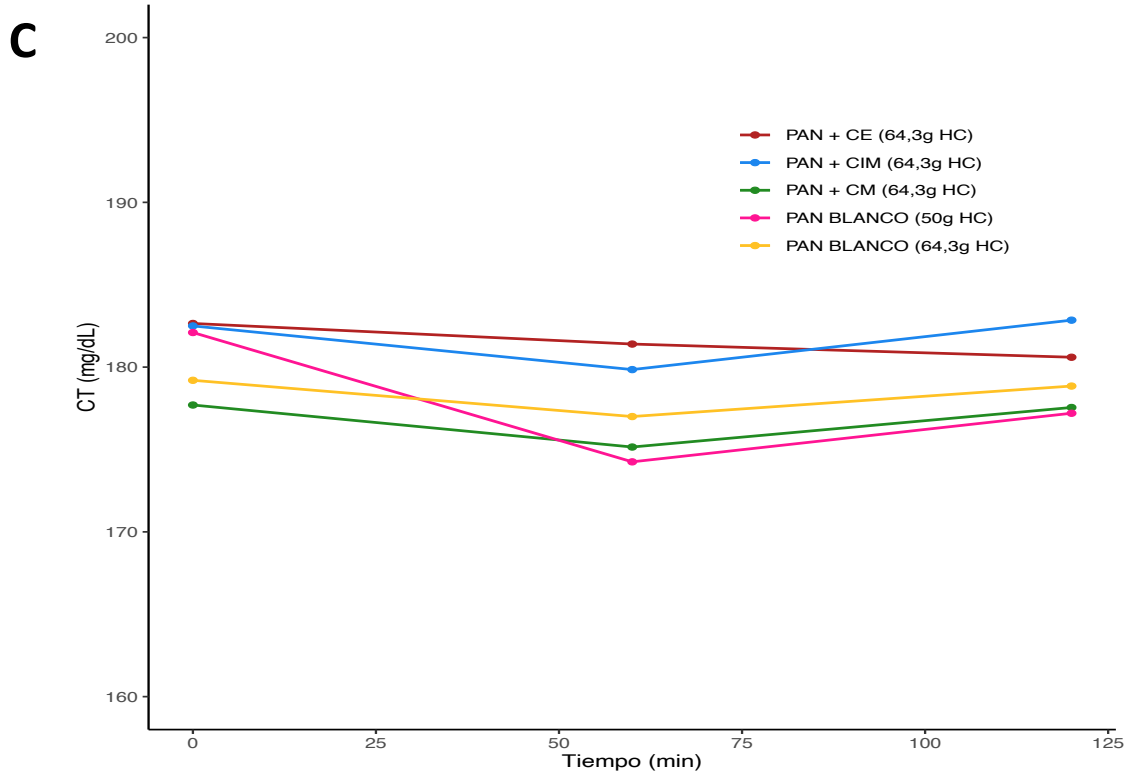
## 5.2 ESTUDIO 2

### 5.2.1. Variación de los niveles de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, TG y AGNE

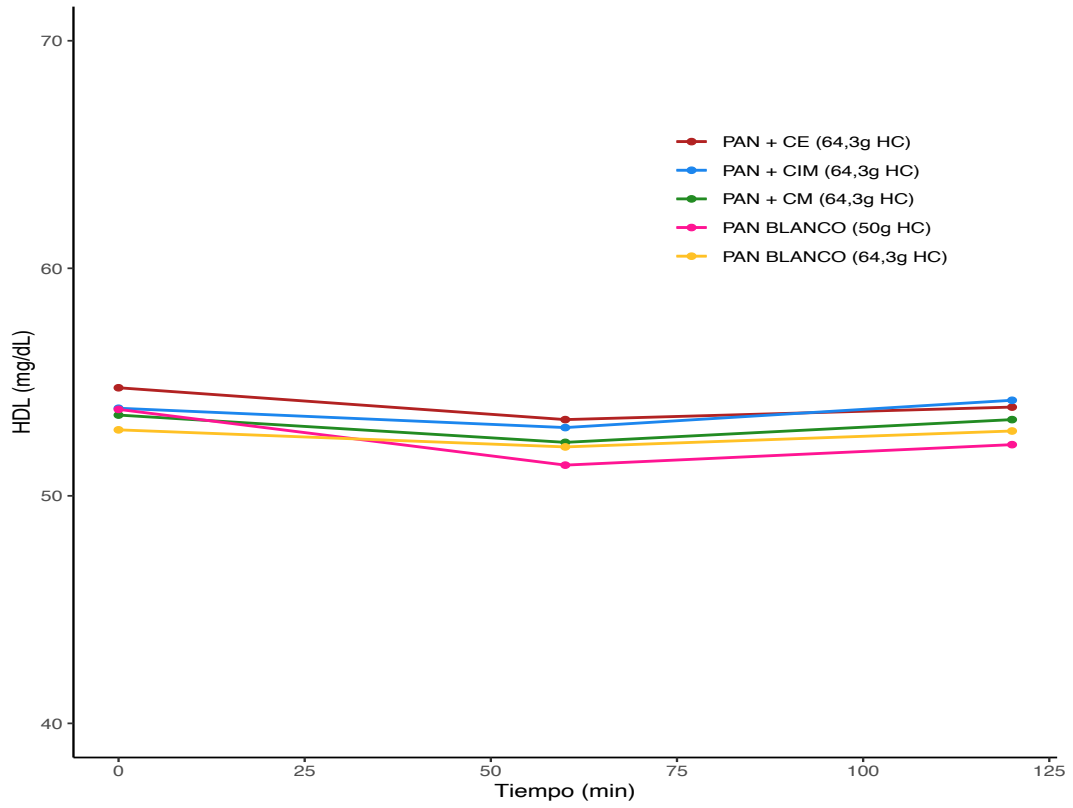
La **Figura 35** muestra la variación de las concentraciones de TG (**A**), AGNE (**B**), colesterol total (**C**), colesterol LDL (**D**) y colesterol HDL (**E**), producidas en el estudio 2, tras la ingesta de pan blanco combinado con las diferentes bebidas fermentadas. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas ni en la variación de colesterol total, ni colesterol LDL, ni colesterol HDL tras del consumo de diferentes bebidas con pan blanco ( $p=0,993$ ,  $p=0,995$  y  $p=0,992$ , respectivamente, **Figura 35C**, **35D** y **35E**). La variación de TG y AGNE tampoco difirió significativamente tras la ingesta de cada bebida combinada con pan blanco ( $p=0,812$  y  $p=0,075$ , respectivamente, **Figura 35A** y **35B**).

**Figura 35.** Variación de las concentraciones de TG (A), AGNE (B), colesterol total (C), colesterol LDL (D) y colesterol HDL (E) tras el consumo de pan blanco combinado con las diferentes bebidas fermentadas en el estudio 2.





E



# DISCUSIÓN





El presente estudio analizó la respuesta glucémica posprandial producida por el consumo de CIM. El objetivo incluyó comparar su consumo con CM, frente a una CE en sus HC. Todo ello con el objetivo de analizar el efecto individual de la isomaltulosa y maltodextrina resistente por separado, pero también su posible efecto sinérgico sobre la respuesta posprandial. Este estudio es la continuación de un estudio anterior donde, mediante una intervención doble ciega y cruzada, se analizó el efecto del consumo CIM sobre 41 sujetos con DM2 y sobrepeso u obesidad, comparándola con una CE. Cada cerveza sin alcohol fue tomada con las principales comidas del día (comida y cena) durante 10 semanas, cada una de ellas, habiendo un periodo de lavado entre ambas fases (152). Los resultados de este primer estudio revelaron que la ingesta de la cerveza con composición modificada y enriquecida con isomaltulosa y maltodextrina resistente tenía un efecto beneficioso sobre la homeostasis de la glucemia, con una mejora significativa en la RI independiente al resto de factores asociados. Además, el estudio de la microbiota en un subgrupo de los participantes evidenció mejoras en la microbiota intestinal lo que podría explicar parte del beneficio hallado (285). Sin embargo, los mecanismos por los cuales se produce esa mejora de la RI tras el consumo de esta cerveza sin alcohol modificada, quedaron pendientes de dilucidar. En ese contexto, se planteó el desarrollo del presente trabajo, de carácter novedoso y pionero, que ha constituido el eje central de la tesis doctoral. El objetivo de esta investigación se centró en explorar la respuesta glucémica producida por la cerveza sin alcohol con composición modificada, valorando si difería frente a diferentes intervenciones comparativas. La hipótesis fue que este tipo de cerveza mejoraba la RI gracias, entre otros mecanismos, a la modulación del IG inducido por las comidas.

Para conseguir dilucidar los posibles mecanismos de acción de esta CIM, se plantearon dos estudios. Los principales hallazgos del primero, mostraron que: a) El consumo de CIM, produce un menor incremento de glucosa e insulina que el producido tras el consumo de una CE; b) El incremento glucídico también fue significativamente menor tras el consumo de CM pero no isomaltulosa, en comparación con la ingesta de una CE; c) La variación de GIP después del consumo de las dos cervezas sin alcohol con composición modificada fue significativamente menor que tras el consumo de la CE. Los hallazgos del estudio 2 evidenciaron que: a) Consumir 50 g de HC provenientes del pan blanco junto con cualquiera de las dos cervezas sin alcohol con composición modificada CIM o CM (aportando un 64,3 g de HC) inducían el mismo incremento de glucosa que consumir exclusivamente 50 g de HC provenientes de pan blanco junto con agua; b) Ambas cervezas sin alcohol modificadas en su composición de HC, CIM y CM, producían un menor aumento de glucosa e insulina, y un mayor aumento de GIP que la ingesta de la CE. Por tanto, estos hallazgos evidencian que el consumo de una

CIM, es capaz de atenuar y mejorar la respuesta posprandial a la ingesta de HC en la comida (en este caso, pan blanco). Esta conclusión confirmaría la hipótesis anteriormente planteada, demostrando que esta mejora en la respuesta posprandial constituiría uno de los mecanismos responsables de que el consumo de este tipo de cerveza sin alcohol en las comidas, durante 10 semanas, contribuyó a la mejora de la RI en personas con prediabetes o DM2 (152). Por este motivo, esta investigación parece evidenciar el hecho de que pequeños cambios en la composición de la dieta pueden modificar la respuesta posprandial, lo que se traduce en beneficio clínico.

Diferentes estudios han demostrado que la isomaltulosa tiene efectos positivos sobre el metabolismo de la glucosa, logrando disminuir los niveles de glucosa e insulina en sujetos con sobrepeso, obesos y con DM2 (202, 286-289). Henry y cols. evidenciaron, en un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado y cruzado donde incluyeron a 20 hombres, que el consumo de una dieta controlada combinada con isomaltulosa redujo la respuesta glucémica y la variabilidad frente a la combinación de la misma dieta controlada con sacarosa (290). De la misma manera, Okuno y cols. demostraron, en 50 adultos sedentarios, que la suplementación con 40 g/día de isomaltulosa conseguía una reducción significativa de la RI después 12 semanas. Sin embargo, el efecto de este HC en sujetos con DM2 ha sido menos estudiado y los resultados son contradictorios (291). Por ejemplo, Brunner y cols. mostraron que la suplementación con 50 g/día de isomaltulosa en sujetos con DM2 no producía cambios significativos en la HbA1c tras 12 semanas de intervención (292). Por el contrario, otro estudio que incluyó a 11 participantes con DM2 mostró que la ingestión de 1 g/kg de isomaltulosa atenuaba la hiperglucemia posprandial, reduciendo las concentraciones plasmáticas medias de insulina, péptido C, glucagón y GIP en un 10-23% en comparación con la sacarosa (257). Los mecanismos subyacentes del beneficio de la isomaltulosa sobre la sensibilidad a la insulina no están completamente dilucidados. Kawaguchi y cols. demostraron que el consumo de 20 g de isomaltulosa mejoraba la RI en 5 pacientes con ENGNA. Los autores apuntaban a que este beneficio parecía estar directamente asociado con cambios metabólicos que habían observado y que estaba en relación con los ácidos biliares, ácidos grasos, glicina/serina, alteraciones en L-arginina y concentraciones de L-ornitina (293) Todos estos factores se han relacionado previamente con vías de señalización de insulina. Hasta donde sabemos, el presente estudio es el primero que explora los efectos posprandiales de dosis relativamente bajas de isomaltulosa y los resultados muestran que este disacárido conduce a una mejora de la glucemia posprandial que los HC convencionales que suele contener la cerveza, principalmente almidón y oligosacáridos como maltosa o maltotriosa. Es importante considerar un efecto sinérgico de la isomaltulosa con la dextrina resistente, al interpretar la mejor respuesta glucémica inducida por la

cerveza sin alcohol modificada ya que los efectos beneficiosos fueron observados en la cerveza a la que se le añadieron los dos componentes (isomaltulosa y maltodextrina resistente) pero también en la que sólo contenía la maltodextrina resistente.

En relación a la dextrina resistente, diferentes ensayos aleatorios controlados han demostrado que la suplementación con esta fibra dietética puede modular la inflamación, mejorar la RI y tener efectos beneficiosos sobre la salud mental e incluso sobre la respuesta del sistema inmunológico en mujeres con DM2 (200, 294). En este sentido, Li y cols. demostraron que la ingesta de 17 g de dextrina resistente producía la disminución de un 18% de la concentración de insulina en sujetos sanos, siendo además significativamente menor en comparación con el grupo de control (202). De la misma forma, otro estudio reportó una disminución significativa del 22,8% en la insulina, 24,9% en HOMA-IR, 0,6% en la glucosa y 9,6% en la concentración de HbA1c en 55 mujeres con DM2 que consumieron 10 g de dextrina resistente durante 8 semanas (294). Estas evidencias avalan las mejoras que produce la dextrina resistente sobre la homeostasis de la glucosa, aunque los mecanismos responsables de estos beneficios no se conocen del todo. En esta línea, nuestro grupo ha demostrado recientemente cómo el consumo de la CIM, durante 10 semanas en 14 sujetos con prediabetes o DM2, tenía un impacto significativo sobre la microbiota intestinal, provocando una disminución significativa de las especies del género *Parabacteroides* (152). Curiosamente, esta especie *Parabacteroides* se encuentra en menor proporción en pacientes con obesidad y diferentes enfermedades metabólicas y se ha demostrado que su abundancia incrementa tras una intervención basada en dieta mediterránea (295, 296). Otros investigadores especulan que la suplementación con una dextrina resistente, con probado efecto prebiótico, podría favorecer la diferenciación de células L, lo cual estimularía la secreción de hormonas digestivas como GLP-1, PY o GIP, entre otros (297).

GIP y GLP-1 son hormonas incretinas secretadas por las células endocrinas intestinales K y L, respectivamente, como respuesta a la ingestión de una dieta rica en HC y en grasas. La secreción de GLP-1 y GIP tiene acciones en diferentes órganos, pero en concreto a nivel pancreático, GLP-1 y GIP favorecen el aumento de la biosíntesis y secreción de insulina, y una disminución de la apoptosis de las células  $\beta$ , manteniendo la integridad celular (249), por lo que tienen un potencial regulador de la glucemia posprandial. En esta línea, la hipótesis en el estudio 1 mostró que el consumo de CIM produjo una menor sobrecarga de HC, con el resultado de un menor incremento de insulina y hormonas incretinas en comparación con la CE. Del mismo modo, el estudio 2 demostró que el consumo de la CIM junto con pan blanco produjo un pico menor de glucosa y, en consecuencia, menores aumentos

de insulina y hormonas incretinas, GIP y GLP-1, que el consumo de pan blanco con CE. Esto concuerda con los resultados en otras investigaciones donde la presencia de la isomaltulosa y la maltodextrina resistente parece retrasar la tasa de absorción de HC, influyendo, por tanto, en la liberación de GLP-1 y GIP. Estos resultados concuerdan con los de Keyhani-Nejah y cols., quienes demostraron en un estudio cruzado aleatorizado con 35 sujetos (15 sanos, 10 con prediabetes y 10 con DM2), que la ingesta de 50 g de HC procedentes de isomaltulosa producía un pico de glucosa e insulina significativamente más bajo y menor AUC de GIP (298). Otro ensayo controlado aleatorio incluyó a 16 sujetos con DM2, quienes ingirieron 25 g de HC provenientes de tres soluciones diferentes: una solución estándar; una solución con maltodextrina resistente y sucralosa; y otra con lactosa, isomaltulosa, y almidón resistente. Los autores reportaron que el consumo de la solución que contenía la isomaltulosa produjo un pico más bajo de GLP-1 (299). Estos autores demostraron que se produjo un mayor aumento de GIP tras el consumo de la solución estándar y la solución con isomaltulosa. No obstante, es importante destacar que la solución que contenía isomaltulosa también tenía lactosa, aunque los autores no explicitaban el porcentaje de cada HC contenido en la solución.

Respecto al análisis del efecto producido sobre las hormonas relacionadas con el apetito y la saciedad por el consumo de pan junto a las diferentes bebidas a estudio, ninguna de las intervenciones evaluadas indujo una variación posprandial significativa sobre los niveles de grelina, leptina, glucagón, PP y PY. Esta ausencia de cambio en la concentración de hormonas relacionadas con la saciedad y el apetito no parece coincidir con los resultados obtenidos del primer estudio, donde los participantes informaron de una mayor sensación de saciedad durante el período del consumo de la cerveza sin alcohol con composición modificada, en comparación con el periodo de consumo de la cerveza sin alcohol estándar (152). Una de las hipótesis que se plantearon, tras valorar los hallazgos del estudio mencionado, es que la cerveza sin alcohol modificada podría inducir una mayor saciedad y un vaciamiento gástrico más lento, induciendo así beneficios metabólicos. A pesar de que los resultados del presente estudio no confirman un efecto modulador sobre la saciedad, por parte de esta cerveza sin alcohol modificada, al menos de forma aguda, no habría que descartar por completo la posibilidad de un efecto a medio plazo, que es lo que se reflejaba en el primer estudio. Este incremento de la sensación de la saciedad podría tener relación con el efecto sobre la microbiota, pues diferentes estudios han demostrado que ésta tiene un rol esencial en la regulación de la saciedad, a través de la síntesis de ácidos grasos de cadena corta, entre otros mecanismos (300). También es importante señalar que, en el estudio anterior desarrollado por nuestro equipo, la evaluación de la saciedad se realizó mediante escalas analógicas visuales que son una herramienta subjetiva. Sería importante, en

estudios futuros, explorar si el efecto de la dextrina resistente sobre el microbioma intestinal podría influir en la regulación de la saciedad.

Esta demostrado los efectos negativos que produce el consumo de ciertas cantidades de fructosa , especialmente cuando es añadida a los alimentos, (301, 302) son aumento del peso corporal, un peor control glucémico, marcadores de EHGNA y aumento en la síntesis de TG y AGNE posprandiales, siendo de los factores del aumento de las enfermedades cardiometabólicas, como obesidad, DM2 o ECV (303).Esto mismo fue concluido en una revisión sistemática, donde determinaron como en intervenciones dietéticas isocalóricas la fructosa no altero el perfil lipídico incluidos los TG comparado con la sustitución de otro HC, pero en intervenciones hipercalóricas con fructosa frente a solo dietas hipercalóricas sin fructosa, aumento los TG y la apolipoproteína B (304, 305). Por lo tanto, según nuestros resultados ese efecto negativo que produce la fructosa por si sola, la isomaltulosa no lo produce. Posiblemente sea debido a las características químicas de su enlace glucosídico-1,6 que hace que la degradación de la isomaltulosa sea más lenta y además se caracteriza por una baja ingesta posprandial (258). Por lo tanto, nuestros resultados referentes al perfil lipídico con el consumo de cualquiera de estas bebidas sin alcohol fermentadas no produjo alteraciones sobre los niveles de c-HDL, c-LDL, TG o AGNE durante el período posprandial de 2 h a estudio. Esta ausencia de modificación de las concentraciones de los lípidos es consistente con los hallazgos previamente reportados (306).

El estudio tiene algunas limitaciones que es importante mencionar. El tamaño muestral, relativamente pequeño, podría haber condicionado y limitado la significación del efecto de las intervenciones sobre algunos metabolitos y, por lo tanto, las conclusiones derivadas de estos hallazgos. Sin embargo, el tamaño de la muestra se calculó en base a estudios previos, que implicaban la toma de suplementos de isomaltulosa y dextrina resistente, y que tenían características metodológicas similares, incluyendo incluso un tamaño de muestra aún más pequeño (299).

# CONCLUSIONES





1. El consumo de una cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de los hidratos de carbono y suplementada con isomaltulosa (2,5 g/100 mL) y una maltodextrina resistente (0,8 g/100 mL) produce un menor incremento de glucosa, insulina y GIP, que el consumo de una cerveza sin alcohol con composición estándar. Este efecto se observa igualmente tras la ingesta de una cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de los hidratos de carbono y suplementada sólo con una maltodextrina resistente, aunque en mayor dosis (2 g/100 mL).
2. El consumo de una cerveza con fermentación casi completa de los hidratos de carbono y suplementada con isomaltulosa y dextrina resistente, junto con pan blanco, induce un menor incremento glucídico que la ingesta de la misma cantidad de hidratos de carbono procedentes sólo de pan blanco, consumidos junto a agua. Este efecto se observa igualmente tras la ingesta de una cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de los hidratos de carbono y suplementada sólo con una maltodextrina resistente, aunque en mayor dosis.
3. El consumo de una cerveza con fermentación casi completa de los hidratos de carbono y suplementada con isomaltulosa y dextrina resistente, junto con pan blanco, induce el mismo incremento glucídico que el consumo de pan blanco con agua, a pesar de que esta última supone una ingesta de 14,3 g hidratos de carbono menos. Este efecto se observa igualmente tras la ingesta de una cerveza sin alcohol con fermentación casi completa de los hidratos de carbono y suplementada sólo con una maltodextrina resistente, aunque en mayor dosis.
4. Ninguna de las intervenciones evaluadas modificó significativamente la concentración de las hormonas gastrointestinales y adipoquinas que se valoraron, y que están directamente involucradas en la regulación del apetito y la saciedad. De este hallazgo se desprende la conclusión de que las cervezas sin alcohol con composición modificada (tanto la suplementada con isomaltulosa y maltodextrina resistente como la que sólo lleva este último componente) no inducen un incremento agudo de la saciedad.
5. Ninguna de las intervenciones evaluadas modificó significativamente la concentración de los diferentes parámetros evaluados en cuanto al perfil lipídico.
6. De los hallazgos del presente estudio se desprende la conclusión global de que las cervezas con composición modificada en HC (tanto la que contiene isomaltulosa y maltodextrina resistente como la que sólo contiene este último componente en mayor cantidad) son capaces de modular la respuesta posprandial de los HC consumidos. Este mecanismo podría explicar, al

menos en parte, el beneficio en la homeostasis de la glucosa que se observó en un estudio previo, en el que personas con prediabetes y DM2 consumieron este tipo de cerveza sin alcohol durante 10 semanas.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S15-S33.
2. Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, et al. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019;127(S 01):S1-S7.
3. American Diabetes Association. Introduction. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S1-S2.
4. Thomas NJ, Lynam AL, Hill AV, Weedon MN, Shields BM, Oram RA, et al. Type 1 diabetes defined by severe insulin deficiency occurs after 30 years of age and is commonly treated as type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2019;62(7):1167-72.
5. Mishra R, Hodge KM, Cousminer DL, Leslie RD, Grant SFA. A global perspective of latent autoimmune diabetes in adults. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(9):638-50.
6. Buzzetti R, Zampetti S, Maddaloni E. Adult-onset autoimmune diabetes: current knowledge and implications for management. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(11):674-86.
7. Herman WH. Are there clinical implications of racial differences in hba1c? yes, to not consider can do great harm! *Diabetes Care*. 2016;39(8):1458-61.
8. Mañe Serra L, Benaiges D, Goday Arno A. Diabetes Mellitus tipo 2. *Epidemiología y patogenia. Manual de endocrinología y nutrición. Sociedad Española de Endocrinología Española y nutrición. Barcelona 2020: 1-19.*
9. Christensen AA, Gannon M. The beta cell in type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2019;19(9):81.
10. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17).
11. American Diabetes Association. Management of diabetes in pregnancy. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S183-S92.
12. Jovanović L, Liang Y, Weng W, Hamilton M, Chen L, Wintfeld N. Trends in the incidence of diabetes, its clinical sequelae, and associated costs in pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015;31(7):707-16.
13. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*. 2002;25(10):1862-8.
14. Swisa A, Glaser B, Dor Y. Metabolic stress and compromised identity of pancreatic beta cells. *Front Genet*. 2017;21;8:21.
15. Rasmussen L, Poulsen CW, Kampmann U, Smedegaard SB, Ovesen PG, Fuglsang J. diet and healthy lifestyle in the management of gestational diabetes mellitus. *Nutrients*. 2020;12(10).
16. Kleinberger JW, Copeland KC, Gandica RG, Haymond MW, Levitsky LL, Linder B, et al. Monogenic diabetes in overweight and obese youth diagnosed with type 2 diabetes: the TODAY clinical trial. *Genet Med*. 2018;20(6):583-90.
17. Ackermann RT, Cheng YJ, Williamson DF, Gregg EW. Identifying adults at high risk for diabetes and cardiovascular disease using hemoglobin A1c National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *Am J Prev Med*. 2011;40(1):11-7.
18. Martínez Martín FJ. Definición y clasificación de la diabetes mellitus. *Ed Pedrianes*. 2020;(1):1-21.
19. Millán Núñez-Cortés J, Cases Amenós A, Ascaso Gimilio JF, Barrios Alonso V, Pascual Fuster V, Pedro-Botet Montoya JC, et al. consensus on the statin of choice in patients with impaired glucose metabolism: results of the DIANA study. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2017;17(2):135-42.
20. Park ZH, Juska A, Dyakov D, Patel RV. Statin-associated incident diabetes: a literature review. *Consult Pharm*. 2014;29(5):317-34.
21. Committee IE. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(7):1327-34.
22. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlogge AW, et al. idf

- diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;138:271-81.
23. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1997;20(7):1183-97.
  24. Pérez-Arellano JL. *Manual de patología general.* Sisinio De Castro. 7ª ed. Barcelona 2013.
  25. Selvin E, Wang D, Matsushita K, Grams ME, Coresh J. prognostic implications of single-sample confirmatory testing for undiagnosed diabetes: a prospective cohort study. *Ann Intern Med.* 2018;169(3):156-64.
  26. Selvin E, Rawlings AM, Bergenstal RM, Coresh J, Brancati FL. No racial differences in the association of glycated hemoglobin with kidney disease and cardiovascular outcomes. *Diabetes Care.* 2013;36(10):2995-3001.
  27. Selvin E. Are there clinical implications of racial differences in HbA1c? A difference, to be a difference, must make a difference. *Diabetes Care.* 2016;39(8):1462-7.
  28. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet.* 2012;379(9833):2279-90.
  29. Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. *Endocr Rev.* 2016;37(3):278-316.
  30. Wens J, Van Royen P. Evaluation and comparison of guidelines for the management of people with type 2 diabetes from eight European countries on behalf of the GUIDANCE study group. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;92(3):407-8.
  31. Kolb H, Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med.* 2017;15(1):131.
  32. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107843.
  33. Sinclair A, Saeedi P, Kaundal A, Karuranga S, Malanda B, Williams R. Diabetes and global ageing among 65-99-year-old adults: Findings from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;162:108078.
  34. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;128:40-50.
  35. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94(3):311-21.
  36. (NCD-RisK Factor Collaboration) (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet.* 2016;387(10027):1513-30.
  37. Altobelli E, Angeletti PM, Profeta VF, Petrocelli R. Lifestyle risk factors for type 2 Diabetes Mellitus and National Diabetes care systems in European countries. *Nutrients.* 2020;12(9).
  38. Martín-Peláez S, Fito M, Castaner O. Mediterranean Diet Effects on Type 2 Diabetes Prevention, Disease Progression, and Related Mechanisms. A Review. *Nutrients.* 2020;12(8).
  39. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia.* 2012;55(1):88-93.
  40. World Health Organization. *Global report on diabetes.* Geneva 2016.
  41. Williams R, Karuranga S, Malanda B, Saeedi P, Basit A, Besançon S, et al. Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;162:108072.
  42. Rorsman P, Ashcroft FM. Pancreatic  $\beta$ -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice

- and Men. *Physiol Rev.* 2018;98(1):117-214.
43. Levy M.N, Berne RM, Koepen BM, Staton BA. *Fisiología.* 6ª ed. Barcelona. Elsevier 2009.
  44. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2013;9(1):25-53.
  45. Seino S, Shibasaki T, Minami K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2118-25.
  46. Jones B, Bloom SR, Buenaventura T, Tomas A, Rutter GA. Control of insulin secretion by GLP-1. *Peptides.* 2018;100:75-84.
  47. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev.* 2018;98(4):2133-223.
  48. Højlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan Med J.* 2014;61(7):B4890.
  49. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia.* 1992;35(4):389-97.
  50. 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):787-94.
  51. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of Diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes.* 2017;66(2):241-55.
  52. Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, et al. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *Diabetes Care.* 2011;34(6):1424-30.
  53. Castro AV, Kolka CM, Kim SP, Bergman RN. Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(6):600-9.
  54. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005;365(9467):1333-46.
  55. Cerf ME. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:37.
  56. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet.* 2014;383(9922):1068-83.
  57. Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J.* 2016;92(1084):63-9.
  58. Prentki M, Peyot ML, Masiello P, Madiraju SRM. Nutrient-induced metabolic stress, adaptation, detoxification, and toxicity in the pancreatic  $\beta$ -Cell. *Diabetes.* 2020;69(3):279-90.
  59. Ye R, Onodera T, Scherer PE. Lipotoxicity and. *J Endocr Soc.* 2019;3(3):617-31.
  60. Römer A, Linn T, Petry SF. Lipotoxic impairment of mitochondrial function in  $\beta$ -Cells: A Review. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(2).
  61. Al-Mrabeh A.  $\beta$ -Cell dysfunction, hepatic lipid metabolism, and cardiovascular health in type 2 Diabetes: new directions of research and novel therapeutic strategies. *Biomedicines.* 2021;9(2).
  62. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, et al.  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Diabetes Care.* 2014;37(6):1751-8.
  63. Dendup T, Feng X, Clingan S, Astell-Burt T. Environmental risk factors for developing type 2 Diabetes Mellitus: A systematic review. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(1).
  64. Gupta D, Krueger CB, Lastra G. Over-nutrition, obesity and insulin resistance in the development of  $\beta$ -cell dysfunction. *Curr Diabetes Rev.* 2012;8(2):76-83.
  65. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet.* 2011;378(9786):169-81.
  66. Petersen KF, Shulman GI. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes

- mellitus. *Am J Cardiol.* 2002;90(5A):11G-8G.
67. Czech MP. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med.* 2017;23(7):804-14.
68. Gastaldelli A, Gaggini M, DeFronzo RA. Role of adipose tissue insulin resistance in the natural history of type 2 diabetes: results from the san antonio metabolism study. *Diabetes.* 2017;66(4):815-22.
69. Smith U, Kahn BB. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *J Intern Med.* 2016;280(5):465-75.
70. Kojta I, Chacińska M, Błachnio-Zabielska A. Obesity, bioactive lipids, and adipose tissue inflammation in insulin resistance. *nutrients.* 2020;12(5).
71. Scherer PE. The many secret lives of adipocytes: implications for diabetes. *Diabetologia.* 2019;62(2):223-32.
72. Sitar-Taut AV, Coste SC, Tarmure S, Orasan OH, Fodor A, Negrean V, et al. diabetes and obesity-cumulative or complementary effects on adipokines, inflammation, and insulin resistance. *J Clin Med.* 2020;9(9).
73. Calabrò P, Golia E, Maddaloni V, Malvezzi M, Casillo B, Marotta C, et al. Adipose tissue-mediated inflammation: the missing link between obesity and cardiovascular disease? *Intern Emerg Med.* 2009;4(1):25-34.
74. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem.* 2009;42(13-14):1331-46.
75. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002;23(2):201-29.
76. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1793-801.
77. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2017;127(1):1-4.
78. Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science.* 2003;300(5622):1140-2.
79. Sergi D, Naumovski N, Heilbronn LK, Abeywardena M, O'Callaghan N, Lionetti L, et al. mitochondrial (dys)function and insulin resistance: from pathophysiological molecular mechanisms to the impact of diet. *Front Physiol.* 2019;10:532.
80. Burhans MS, Hagman DK, Kuzma JN, Schmidt KA, Kratz M. contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. *Compr Physiol.* 2018;9(1):1-58.
81. Ying W, Fu W, Lee YS, Olefsky JM. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and  $\beta$ -cell abnormalities. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(2):81-90.
82. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci.* 2014;11(11):1185-200.
83. Ding M, Bhupathiraju SN, Chen M, van Dam RM, Hu FB. Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose-response meta-analysis. *Diabetes Care.* 2014;37(2):569-86.
84. Knott C, Bell S, Britton A. alcohol consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of more than 1.9 million individuals from 38 observational studies. *Diabetes Care.* 2015;38(9):1804-12.
85. Li XH, Yu FF, Zhou YH, He J. Association between alcohol consumption and the risk of incident type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(3):818-29.
86. Dali-Youcef N, Mecili M, Ricci R, Andrès E. Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance. *Ann Med.* 2013;45(3):242-53.



87. Smith AD, Crippa A, Woodcock J, Brage S. Physical activity and incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetologia*. 2016;59(12):2527-45.
88. Venkatasamy VV, Pericherla S, Manthuruthil S, Mishra S, Hanno R. effect of physical activity on insulin resistance, inflammation and oxidative stress in diabetes mellitus. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(8):1764-6.
89. Gurung M, Li Z, You H, Rodrigues R, Jump DB, Morgun A, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*. 2020;51:102590.
90. Allin KH, Nielsen T, Pedersen O. Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 2015;172(4):R167-77.
91. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013;93(1):137-88.
92. American Diabetes Association. Glycemic targets. *diabetes care*. 2020;43(Suppl 1):S66-S76.
93. American Diabetes Association. Prevention or delay of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S32-S6.
94. Association AD. 11. Microvascular complications and foot care. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S135-S51.
95. Bourne RR, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2013;1(6):e339-49.
96. Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 2004;350(1):48-58.
97. Zatalia SR, Sanusi H. The role of antioxidants in the pathophysiology, complications, and management of diabetes mellitus. *Acta Med Indones*. 2013;45(2):141-7.
98. Volmer-Thole M, Lobmann R. Neuropathy and diabetic foot syndrome. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).
99. Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic Neuropathy: A position statement by the american diabetes association. *Diabetes Care*. 2017;40(1):136-54.
100. Zimmermann A, Reeps C, Härtl F, Ockert S, Eckstein HH. [The diabetic foot]. *Chirurg*. 2009;80(5):430-6.
101. Huang D, Refaat M, Mohammedi K, Jayyousi A, Al Suwaidi J, Abi Khalil C. Macrovascular complications in patients with diabetes and prediabetes. *Biomed Res Int*. 2017;2017:7839101.
102. Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*. 2015;58(5):886-99.
103. Scheen AJ. Cardiovascular and renal protection with SGLT2 inhibitors: from EMPA-REG OUTCOME to VERTIS CV. *Rev Med Suisse*. 2020;16(703):1483-8.
104. Low Wang CC, Hess CN, Hiatt WR, Goldfine AB. Clinical Update: cardiovascular disease in diabetes mellitus: atherosclerotic cardiovascular disease and heart failure in type 2 diabetes mellitus - mechanisms, management, and clinical considerations. *Circulation*. 2016;133(24):2459-502.
105. Poznyak A, Grechko AV, Poggio P, Myasoedova VA, Alfieri V, Orekhov AN. The Diabetes mellitus-atherosclerosis connection: the role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5).
106. Shah PK. Inflammation, infection and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2019;29(8):468-72.
107. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J*. 2013;34(31):2436-43.
108. Milenkovic T, Bozhinovska N, Macut D, Bjekic-Macut J, Rahelic D, Velija Asimi Z, et al. Mediterranean diet and type 2 diabetes mellitus: a perpetual inspiration for the scientific world. A review. *Nutrients*. 2021;13(4).
109. Draznin B, Aroda VR, Bakris G, Benson G, Brown FM, Freeman R, et al. Facilitating behavior

- change and well-being to improve health outcomes: standards of medical care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*. 2022;45(Supplement\_1):S60-S82.
110. Khurshheed R, Singh SK, Wadhwa S, Kapoor B, Gulati M, Kumar R, et al. Treatment strategies against diabetes: success so far and challenges ahead. *Eur J Pharmacol*. 2019;862:172625.
111. Balducci S, D'Errico V, Haxhi J, Sacchetti M, Orlando G, Cardelli P, et al. Effect of a Behavioral intervention strategy on sustained change in physical activity and sedentary behavior in patients with type 2 diabetes: The IDES\_2 randomized clinical trial. *JAMA*. 2019;321(9):880-90.
112. Gargallo-Fernández M, Escalada San Martín J, Gómez-Peralta F, Rozas Moreno P, Marco Martínez A, Botella-Serrano M, et al. Clinical recommendations for sport practice in diabetic patients (RECORD Guide). Diabetes Mellitus Working Group of the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition (SEEN). *Endocrinol Nutr*. 2015;62(6):e73-93.
113. Thrasher J. Pharmacologic management of type 2 diabetes mellitus: available therapies. *Am J Cardiol*. 2017;120(15):S4-S16.
114. An H, He L. Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J Endocrinol*. 2016;228(3):R97-106.
115. American Diabetes Association. Pharmacologic approaches to glycemic treatment. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S98-S110.
116. Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 diabetes mellitus: a review of multi-target drugs. *Molecules*. 2020;25(8).
117. Seino S. Cell signalling in insulin secretion: the molecular targets of ATP, cAMP and sulfonylurea. *Diabetologia*. 2012;55(8):2096-108.
118. Garber AJ, Abrahamson MJ, Barzilay JI, Blonde L, Bloomgarden ZT, Bush MA, et al. Consensus statement by the american association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology on the comprehensive type 2 diabetes management algorithm - 2017. *Endocr Pract*. 2017;23(2):207-38.
119. Madsbad S. Review of head-to-head comparisons of glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *Diabetes Obes Metab*. 2016;18(4):317-32.
120. Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(10):566-92.
121. Aroda VR, Henry RR, Han J, Huang W, DeYoung MB, Darsow T, et al. Efficacy of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors: meta-analysis and systematic review. *Clin Ther*. 2012;34(6):1247-58.e22.
122. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Inhibition of renal glucose reabsorption: a novel strategy for achieving glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Endocr Pract*. 2008;14(6):782-90.
123. Storgaard H, Gluud LL, Bennett C, Grøndahl MF, Christensen MB, Knop FK, et al. Benefits and harms of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166125.
124. Scheen AJ, Lancellotti P. SGLT2 inhibitors, new option to prevent or treat heart failure. *Rev Med Liege*. 2021;76(4):248-55.
125. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006;368(9548):1696-705.
126. Zhang X, Zhao Q. Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on blood pressure in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*. 2016;34(2):167-75.
127. Beverly EA, Hultgren BA, Brooks KM, Ritholz MD, Abrahamson MJ, Weinger K. Understanding physicians' challenges when treating type 2 diabetic patients' social and emotional difficulties: a qualitative study. *Diabetes Care*. 2011;34(5):1086-8.
128. Draznin B, Aroda VR, Bakris G, Benson G, Brown FM, Freeman R, et al. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: standards of medical care in diabetes-2022. *Diabetes Care*.

2022;45(Supplement\_1):S125-S43.

129. Micha R, Shulkin ML, Peñalvo JL, Khatibzadeh S, Singh GM, Rao M, et al. Etiologic effects and optimal intakes of foods and nutrients for risk of cardiovascular diseases and diabetes: Systematic reviews and meta-analyses from the nutrition and chronic diseases expert group (NutriCoDE). *PLoS One*. 2017;12(4):e0175149.
130. Marrero S, Adashi EY. Noncommunicable diseases. *Semin Reprod Med*. 2015;33(1):35-40.
131. Mozaffarian D. Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: a comprehensive review. *Circulation*. 2016;133(2):187-225.
132. Micha R, Peñalvo JL, Cudhea F, Imamura F, Rehm CD, Mozaffarian D. Association between dietary factors and mortality from heart disease, stroke, and type 2 diabetes in the united states. *JAMA*. 2017;317(9):912-24.
133. Jacobs DR, Tapsell LC. Food, not nutrients, is the fundamental unit in nutrition. *Nutr Rev*. 2007;65(10):439-50.
134. Jannasch F, Kröger J, Schulze MB. Dietary patterns and type 2 diabetes: a systematic literature review and meta-analysis of prospective studies. *J Nutr*. 2017;147(6):1174-82.
135. Esposito K, Giugliano D. Mediterranean diet and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014;30 Suppl 1:34-40.
136. Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev*. 2012;70(1):3-21.
137. Evert AB, Boucher JL, Cypress M, Dunbar SA, Franz MJ, Mayer-Davis EJ, et al. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl 1:S120-43.
138. Malik VS, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and cardiometabolic health: an update of the evidence. *Nutrients*. 2019;11(8).
139. Neuenschwander M, Ballon A, Weber KS, Norat T, Aune D, Schwingshackl L, et al. Role of diet in type 2 diabetes incidence: umbrella review of meta-analyses of prospective observational studies. *BMJ*. 2019;366:l2368.
140. Schwingshackl L, Hoffmann G, Lampousi AM, Knüppel S, Iqbal K, Schwedhelm C, et al. Food groups and risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur J Epidemiol*. 2017;32(5):363-75.
141. Ojo O. Dietary Intake and Type 2 Diabetes. *Nutrients*. 2019;11(9).
142. Georgoulis M, Kontogianni MD, Yiannakouris N. Mediterranean diet and diabetes: prevention and treatment. *Nutrients*. 2014;6(4):1406-23.
143. Esposito K, Chiodini P, Maiorino MI, Bellastella G, Panagiotakos D, Giugliano D. Which diet for prevention of type 2 diabetes? A meta-analysis of prospective studies. *Endocrine*. 2014;47(1):107-16.
144. Chiavaroli L, Vigiouk E, Nishi SK, Blanco Mejia S, Rahelić D, Kahleová H, et al. DASH Dietary pattern and cardiometabolic outcomes: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Nutrients*. 2019;11(2).
145. Evert AB, Dennison M, Gardner CD, Garvey WT, Lau KHK, MacLeod J, et al. Nutrition therapy for adults with diabetes or prediabetes: a consensus report. *Diabetes Care*. 2019;42(5):731-54.
146. U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. *2015 – 2020 Dietary Guidelines for Americans*. 8th Edition. December 2015. Available at <https://health.gov/our-work/food-nutrition/previous-dietary-guidelines/2015>.
147. Luger M, Holstein B, Schindler K, Kruschitz R, Ludvik B. Feasibility and efficacy of an isocaloric high-protein vs. standard diet on insulin requirement, body weight and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes on insulin therapy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2013;121(5):286-94.
148. American Diabetes Association. Facilitating behavior change and well-being to improve health outcomes. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S48-S65.

149. Qian F, Korat AA, Malik V, Hu FB. Metabolic effects of monounsaturated fatty acid-enriched diets compared with carbohydrate or polyunsaturated fatty acid-enriched diets in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized Controlled Trials. *Diabetes Care*. 2016;39(8):1448-57.
150. Pietraszek A, Gregersen S, Hermansen K. Alcohol and type 2 diabetes. A review. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010;20(5):366-75.
151. de Gaetano G, Costanzo S, Di Castelnuovo A, Badimon L, Bejko D, Alkerwi A, et al. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2016;26(6):443-67.
152. Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Lamiquiz-Moneo I, Marco-Benedí V, Bea AM, Fumanal AJ, et al. Effect of an alcohol-free beer enriched with isomaltulose and a resistant dextrin on insulin resistance in diabetic patients with overweight or obesity. *Clin Nutr*. 2020;39(2):475-83.
153. Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martínez P, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*. 2012;4(7):759-81.
154. Mozaffarian D, Appel LJ, Van Horn L. Components of a cardioprotective diet: new insights. *Circulation*. 2011;123(24):2870-91.
155. Chiu S, Bergeron N, Williams PT, Bray GA, Sutherland B, Krauss RM. Comparison of the DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) diet and a higher-fat DASH diet on blood pressure and lipids and lipoproteins: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(2):341-7.
156. Marrone G, Guerriero C, Palazzetti D, Lido P, Marolla A, Di Daniele F, et al. Vegan Diet Health Benefits in Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2021;13(3).
157. Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. *Public Health Nutr*. 2014;17(12):2769-82.
158. de Koning L, Chiuve SE, Fung TT, Willett WC, Rimm EB, Hu FB. Diet-quality scores and the risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care*. 2011;34(5):1150-6.
159. Schröder H. Protective mechanisms of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes. *J Nutr Biochem*. 2007;18(3):149-60.
160. Guasch-Ferré M, Merino J, Sun Q, Fitó M, Salas-Salvadó J. Dietary polyphenols, mediterranean diet, prediabetes, and type 2 diabetes: a narrative review of the evidence. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6723931.
161. Barbaresko J, Koch M, Schulze MB, Nöthlings U. Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation: a systematic literature review. *Nutr Rev*. 2013;71(8):511-27.
162. Victor VM, Rocha M, Herance R, Hernandez-Mijares A. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes. *Curr Pharm Des*. 2011;17(36):3947-58.
163. Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem*. 2002;13(11):636-44.
164. Torres-Peña JD, Garcia-Rios A, Delgado-Casado N, Gomez-Luna P, Alcalá-Díaz JF, Yubero-Serrano EM, et al. Mediterranean diet improves endothelial function in patients with diabetes and prediabetes: A report from the CORDIOPREV study. *Atherosclerosis*. 2018;269:50-6.
165. Weickert MO, Pfeiffer AFH. Impact of dietary fiber consumption on insulin resistance and the prevention of type 2 diabetes. *J Nutr*. 2018;148(1):7-12.
166. Lattimer JM, Haub MD. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*. 2010;2(12):1266-89.
167. Reynolds AN, Akerman AP, Mann J. Dietary fibre and whole grains in diabetes management: Systematic review and meta-analyses. *PLoS Med*. 2020;17(3):e1003053.
168. Estruch R, Ros E, Martínez-González MA. Mediterranean diet for primary prevention of

- cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2013;369(7):676-7.
169. Esposito K, Maiorino M, Giugliano D. Which diet is best for diabetes? *Diabetologia.* 2009;52(5):988-9.
170. Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. *FAO Food Nutr Pap.* 1998;66:1-140.
171. Shafaeizadeh S, Muhardi L, Henry CJ, van de Heijning BJM, van der Beek EM. Macronutrient Composition and Food Form Affect Glucose and Insulin Responses in Humans. *Nutrients.* 2018;10(2).
172. Reynolds A, Mann J, Cummings J, Winter N, Mete E, Te Morenga L. Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet.* 2019;393(10170):434-45.
173. Smith JD, Hou T, Ludwig DS, Rimm EB, Willett W, Hu FB, et al. Changes in intake of protein foods, carbohydrate amount and quality, and long-term weight change: results from 3 prospective cohorts. *Am J Clin Nutr.* 2015;101(6):1216-24.
174. Mozaffarian D. Diverging global trends in heart disease and type 2 diabetes: the role of carbohydrates and saturated fats. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3(8):586-8.
175. Sievenpiper JL. Low-carbohydrate diets and cardiometabolic health: the importance of carbohydrate quality over quantity. *Nutr Rev.* 2020;78(Suppl 1):69-77.
176. Gross LS, Li L, Ford ES, Liu S. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):774-9.
177. Bhupathiraju SN, Tobias DK, Malik VS, Pan A, Hruby A, Manson JE, et al. Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes: results from 3 large US cohorts and an updated meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2014;100(1):218-32.
178. Livesey G, Taylor R, Livesey H, Liu S. Is there a dose-response relation of dietary glycemic load to risk of type 2 diabetes? Meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(3):584-96.
179. Barazzoni R, Deutz NEP, Biolo G, Bischoff S, Boirie Y, Cederholm T, et al. Carbohydrates and insulin resistance in clinical nutrition: Recommendations from the ESPEN expert group. *Clin Nutr.* 2017;36(2):355-63.
180. Seal CJ, Courtin CM, Venema K, de Vries J. Health benefits of whole grain: effects on dietary carbohydrate quality, the gut microbiome, and consequences of processing. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2021;20(3):2742-68.
181. Erbe JK. Low glycemic index diets for the management of diabetes. *Am Fam Physician.* 2009;80(9):941.
182. Ball SD, Keller KR, Moyer-Mileur LJ, Ding YW, Donaldson D, Jackson WD. Prolongation of satiety after low versus moderately high glycemic index meals in obese adolescents. *Pediatrics.* 2003;111(3):488-94.
183. Barclay AW, Petocz P, McMillan-Price J, Flood VM, Prvan T, Mitchell P, et al. Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(3):627-37.
184. Brand-Miller J, Hayne S, Petocz P, Colagiuri S. Low-glycemic index diets in the management of diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Care.* 2003;26(8):2261-7.
185. Wheatley SD, Deakin TA, Arjomandkhah NC, Hollinrake PB, Reeves TE. Low carbohydrate dietary approaches for people with type 2 diabetes-a narrative review. *Front Nutr.* 2021;8:687658.
186. Zafar MI, Mills KE, Zheng J, Regmi A, Hu SQ, Gou L, et al. Low-glycemic index diets as an intervention for diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2019;110(4):891-902.
187. Jenkins DJA, Dehghan M, Mente A, Bangdiwala SI, Rangarajan S, Srichaikul K, et al. Glycemic index, glycemic load, and cardiovascular disease and mortality. *N Engl J Med.* 2021;384(14):1312-22.
188. Anand SS, Hawkes C, de Souza RJ, Mente A, Dehghan M, Nugent R, et al. Food consumption

- and its impact on cardiovascular disease: importance of solutions focused on the globalized food system: a report from the workshop convened by the world heart federation. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(14):1590-614.
189. Hojsak I. Digestible and non-digestible carbohydrates. Nutritional needs. *World Rev Nutr Diet.* 2015;113:46-50.
190. Verdú JM. *Nutricion y alimentación humana.* ERGON; Madrid: 2002.
191. Verdú JM. *Nutricion y alimentación humana.* ERGON, Madrid 2002;(1):50-60.
192. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(8):491-502.
193. Verdú JM. *Nutricion y alimentación humana.* ERGON, Madrid.2002;(1):120-35.
194. Hall KD. A review of the carbohydrate-insulin model of obesity. *Eur J Clin Nutr.* 2018;72(1):183.
195. Kendall FE, Marchand O, Haszard JJ, Venn BJ. The comparative effect on satiety and subsequent energy intake of ingesting sucrose or isomaltulose sweetened trifle: a randomized crossover trial. *Nutrients.* 2018;10(10).
196. Maresch CC, Petry SF, Theis S, Bosy-Westphal A, Linn T. Low glycemic index prototype isomaltulose-update of clinical trials. *Nutrients.* 2017;9(4).
197. Keyhani-Nejad F, Irmeler M, Isken F, Wirth EK, Beckers J, Birkenfeld AL, et al. Nutritional strategy to prevent fatty liver and insulin resistance independent of obesity by reducing glucose-dependent insulinotropic polypeptide responses in mice. *Diabetologia.* 2015;58(2):374-83.
198. Trithavisup K, Krusong K, Tananuwong K. In-depth study of the changes in properties and molecular structure of cassava starch during resistant dextrin preparation. *Food Chem.* 2019;297:124996.
199. Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes.* 2017;8(2):172-84.
200. Farhangi MA, Javid AZ, Sarmadi B, Karimi P, Dehghan P. A randomized controlled trial on the efficacy of resistant dextrin, as functional food, in women with type 2 diabetes: Targeting the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune system. *Clin Nutr.* 2018;37(4):1216-23.
201. Hu Q, Lu Y, Hu F, He S, Xu X, Niu Y, et al. Resistant dextrin reduces obesity and attenuates adipose tissue inflammation in high-fat diet-fed mice. *Int J Med Sci.* 2020;17(17):2611-21.
202. Li S, Guerin-Deremaux L, Pochat M, Wils D, Reifer C, Miller LE. NUTRIOSE dietary fiber supplementation improves insulin resistance and determinants of metabolic syndrome in overweight men: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2010;35(6):773-82.
203. Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(3 Suppl):517S-20S.
204. Tucker LA, Thomas KS. Increasing total fiber intake reduces risk of weight and fat gains in women. *J Nutr.* 2009;139(3):576-81.
205. Baer DJ, Rumpler WV, Miles CW, Fahey GC. Dietary fiber decreases the metabolizable energy content and nutrient digestibility of mixed diets fed to humans. *J Nutr.* 1997;127(4):579-86.
206. Meyer KA, Kushi LH, Jacobs DR, Slavin J, Sellers TA, Folsom AR. Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(4):921-30.
207. Schulze MB, Liu S, Rimm EB, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(2):348-56.
208. Weickert MO, Pfeiffer AF. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J Nutr.* 2008;138(3):439-42.

209. Weickert MO, Mohlig M, Koebnick C, Holst JJ, Namsolleck P, Ristow M, et al. Impact of cereal fibre on glucose-regulating factors. *Diabetologia*. 2005;48(11):2343-53.
210. Ludwig DS, Hu FB, Tappy L, Brand-Miller J. Dietary carbohydrates: role of quality and quantity in chronic disease. *BMJ*. 2018;361:k2340.
211. Augustin LS, Kendall CW, Jenkins DJ, Willett WC, Astrup A, Barclay AW, et al. Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An international scientific consensus summit from the international carbohydrate quality consortium (ICQC). *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015;25(9):795-815.
212. American Diabetes Association. Lifestyle Management. *Diabetes Care*. 2019;42(Suppl\_1):S46-S60.
213. Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, et al. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr*. 1981;34(3):362-6.
214. Vega-López S, Venn BJ, Slavin JL. Relevance of the glycemic index and glycemic load for body weight, diabetes, and cardiovascular disease. *Nutrients*. 2018;10(10).
215. Ley SH, Hamdy O, Mohan V, Hu FB. Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies. *Lancet*. 2014;383(9933):1999-2007.
216. Mente A, de Koning L, Shannon HS, Anand SS. A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med*. 2009;169(7):659-69.
217. Ludwig DS. The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *JAMA*. 2002;287(18):2414-23.
218. Bao J, Atkinson F, Petocz P, Willett WC, Brand-Miller JC. Prediction of postprandial glycemia and insulinemia in lean, young, healthy adults: glycemic load compared with carbohydrate content alone. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(5):984-96.
219. Wolever TM, Gibbs AL, Mehling C, Chiasson JL, Connelly PW, Josse RG, et al. The Canadian Trial of Carbohydrates in Diabetes (CCD), a 1-y controlled trial of low-glycemic-index dietary carbohydrate in type 2 diabetes: no effect on glycosylated hemoglobin but reduction in C-reactive protein. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(1):114-25.
220. J C. Guía práctica para el manejo de la Diabetes mellitus tipo 2. Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitateko Argitalpen Zerbitzua. Bilbao 2015: 59-62.
221. Kirwan JP, Sacks J, Nieuwoudt S. The essential role of exercise in the management of type 2 diabetes. *Cleve Clin J Med*. 2017;84(7 Suppl 1):S15-S21.
222. Cannata F, Vadalà G, Russo F, Papalia R, Napoli N, Pozzilli P. Beneficial effects of physical activity in diabetic patients. *J Funct Morphol Kinesiol*. 2020;5(3).
223. Prior SJ, McKenzie MJ, Joseph LJ, Ivey FM, Macko RF, Hafer-Macko CE, et al. Reduced skeletal muscle capillarization and glucose intolerance. *Microcirculation*. 2009;16(3):203-12.
224. Najafipour F, Mobasser M, Yavari A, Nadrian H, Aliasgarzadeh A, Mashinchi Abbasi N, et al. Effect of regular exercise training on changes in HbA1c, BMI and VO. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2017;5(1):e000414.
225. Colberg SR, Sigal RJ, Yardley JE, Riddell MC, Dunstan DW, Dempsey PC, et al. Physical Activity/exercise and diabetes: a position statement of the american diabetes association. *Diabetes Care*. 2016;39(11):2065-79.
226. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. a consensus report by the american diabetes association (ADA) and the European association for the study of diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2018;41(12):2669-701.
227. Sluik D, Buijsse B, Muckelbauer R, Kaaks R, Teucher B, Johnsen NF, et al. Physical activity and mortality in individuals with diabetes mellitus: a prospective study and meta-analysis. *Arch Intern*

Med. 2012;172(17):1285-95.

228. Church TS, Blair SN, Cocreham S, Johannsen N, Johnson W, Kramer K, et al. Effects of aerobic and resistance training on hemoglobin A1c levels in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010;304(20):2253-62.
229. Dunstan DW, Daly RM, Owen N, Jolley D, De Courten M, Shaw J, et al. High-intensity resistance training improves glycemic control in older patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25(10):1729-36.
230. Nauck MA, Meier JJ. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20 Suppl 1:5-21.
231. van Son J, Koekkoek LL, La Fleur SE, Serlie MJ, Nieuwdorp M. The role of the gut microbiota in the gut-brain axis in obesity: mechanisms and future implications. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6).
232. Stanley S, Wynne K, Bloom S. Gastrointestinal satiety signals III. Glucagon-like peptide 1, oxyntomodulin, peptide YY, and pancreatic polypeptide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286(5):G693-7.
233. Larder R, O'Rahilly S. Shedding pounds after going under the knife: guts over glory-why diets fail. *Nat Med*. 2012;18(5):666-7.
234. Samkani A, Skytte MJ, Thomsen MN, Astrup A, Deacon CF, Holst JJ, et al. Acute effects of dietary carbohydrate restriction on glycemia, lipemia and appetite regulating hormones in normal-weight to obese subjects. *Nutrients*. 2018;10(9).
235. Hernandez TL, Mande A, Barbour LA. Nutrition therapy within and beyond gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;145:39-50.
236. Steinert RE, Feinle-Bisset C, Asarian L, Horowitz M, Beglinger C, Geary N. Ghrelin, cck, glp-1, and ppy(3-36): secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB. *Physiol Rev*. 2017;97(1):411-63.
237. Dimitriadis GD, Maratou E, Kountouri A, Board M, Lambadiari V. Regulation of postabsorptive and postprandial glucose metabolism by insulin-dependent and insulin-independent mechanisms: an integrative approach. *Nutrients*. 2021;13(1).
238. Salvatore T, Nevola R, Pafundi PC, Monaco L, Rizzo C, Imbriani S, et al. Incretin hormones: the link between glycemic index and cardiometabolic diseases. *Nutrients*. 2019;11(8).
239. Phillips LK, Deane AM, Jones KL, Rayner CK, Horowitz M. Gastric emptying and glycaemia in health and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(2):112-28.
240. Opinto G, Natalicchio A, Marchetti P. Physiology of incretins and loss of incretin effect in type 2 diabetes and obesity. *Arch Physiol Biochem*. 2013;119(4):170-8.
241. Michałowska J, Miller-Kasprzak E, Bogdański P. Incretin hormones in obesity and related cardiometabolic disorders: the clinical perspective. *Nutrients*. 2021;13(2).
242. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab*. 2013;17(6):819-37.
243. Smith NK, Hackett TA, Galli A, Flynn CR. GLP-1: Molecular mechanisms and outcomes of a complex signaling system. *Neurochem Int*. 2019;128:94-105.
244. D'Alessio D. Intestinal hormones and regulation of satiety: the case for CCK, GLP-1, PYY, and Apo A-IV. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2008;32(5):567-8.
245. Gutzwiller JP, Göke B, Drewe J, Hildebrand P, Ketterer S, Handschin D, et al. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut*. 1999;44(1):81-6.
246. Torekov SS, Madsbad S, Holst JJ. Obesity - an indication for GLP-1 treatment? Obesity pathophysiology and GLP-1 treatment potential. *Obes Rev*. 2011;12(8):593-601.
247. Santilli F, Simeone PG, Guagnano MT, Leo M, Maccarone MT, Di Castelnuovo A, et al. Effects of liraglutide on weight loss, fat distribution, and  $\beta$ -cell function in obese subjects with prediabetes or early type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2017;40(11):1556-64.



248. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 2006;3(3):153-65.
249. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2131-57.
250. Gonzalez-Anton C, Rico MC, Sanchez-Rodriguez E, Ruiz-Lopez MD, Gil A, Mesa MD. Glycemic responses, appetite ratings and gastrointestinal hormone responses of most common breads consumed in Spain. A randomized control trial in healthy humans. *Nutrients.* 2015;7(6):4033-53.
251. Eelderink C, Noort MWJ, Sozer N, Koehorst M, Holst JJ, Deacon CF, et al. Difference in postprandial GLP-1 response despite similar glucose kinetics after consumption of wheat breads with different particle size in healthy men. *Eur J Nutr.* 2017;56(3):1063-76.
252. Tricò D, Baldi S, Tulipani A, Frascerra S, Macedo MP, Mari A, et al. Mechanisms through which a small protein and lipid preload improves glucose tolerance. *Diabetologia.* 2015;58(11):2503-12.
253. Gentilcore D, Chaikomin R, Jones KL, Russo A, Feinle-Bisset C, Wishart JM, et al. Effects of fat on gastric emptying of and the glycemic, insulin, and incretin responses to a carbohydrate meal in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2062-7.
254. Shukla AP, Iliescu RG, Thomas CE, Aronne LJ. Food order has a significant impact on postprandial glucose and insulin levels. *Diabetes Care.* 2015;38(7):e98-9.
255. Maeda A, Miyagawa J, Miuchi M, Nagai E, Konishi K, Matsuo T, et al. Effects of the naturally-occurring disaccharides, palatinose and sucrose, on incretin secretion in healthy non-obese subjects. *J Diabetes Investig.* 2013;4(3):281-6.
256. Keyhani-Nejad F, Kemper M, Schueler R, Pivovarova O, Rudovich N, Pfeiffer AF. Effects of palatinose and sucrose intake on glucose metabolism and incretin secretion in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2016;39(3):e38-9.
257. Ang M, Linn T. Comparison of the effects of slowly and rapidly absorbed carbohydrates on postprandial glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus patients: a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2014;100(4):1059-68.
258. Keller J, Kahlhöfer J, Peter A, Bosy-Westphal A. Effects of low versus high glycemic index sugar-sweetened beverages on postprandial vasodilatation and inactivity-induced impairment of glucose metabolism in healthy men. *Nutrients.* 2016;8(12).
259. Boland BB, Rhodes CJ, Grimsby JS. The dynamic plasticity of insulin production in  $\beta$ -cells. *Mol Metab.* 2017;6(9):958-73.
260. Kullmann S, Kleinridders A, Small DM, Fritsche A, Häring HU, Preissl H, et al. Central nervous pathways of insulin action in the control of metabolism and food intake. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(6):524-34.
261. Holst JJ, Holland W, Gromada J, Lee Y, Unger RH, Yan H, et al. Insulin and glucagon: partners for life. *endocrinology.* 2017;158(4):696-701.
262. Müller TD, Finan B, Clemmensen C, DiMarchi RD, Tschöp MH. The new biology and pharmacology of glucagon. *Physiol Rev.* 2017;97(2):721-66.
263. Kleinert M, Sachs S, Habegger KM, Hofmann SM, Müller TD. Glucagon regulation of energy expenditure. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21).
264. Adamska-Patruno E, Ostrowska L, Goscik J, Pietraszewska B, Kretowski A, Gorska M. The relationship between the leptin/ghrelin ratio and meals with various macronutrient contents in men with different nutritional status: a randomized crossover study. *Nutr J.* 2018;17(1):118.
265. Crespo MA, González Matías LC, Lozano MG, Paz SF, Pérez MR, Gago EV, et al. Gastrointestinal hormones in food intake control. *Endocrinol Nutr.* 2009;56(6):317-30.
266. Verhulst PJ, Depoortere I. Ghrelin's second life: from appetite stimulator to glucose regulator. *World J Gastroenterol.* 2012;18(25):3183-95.
267. van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev.* 2004;25(3):426-57.

268. Kim MH, Kim H. Role of leptin in the digestive system. *Front Pharmacol.* 2021;12:660040.
269. Denroche HC, Huynh FK, Kieffer TJ. The role of leptin in glucose homeostasis. *J Diabetes Investig.* 2012;3(2):115-29.
270. Cui H, López M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(6):338-51.
271. Al-Suhaimi EA, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *Eur J Med Res.* 2013;18:12.
272. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001;104(4):531-43.
273. Morton GJ. Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. *J Physiol.* 2007;583(Pt 2):437-43.
274. Holzer P, Reichmann F, Farzi A. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides.* 2012;46(6):261-74.
275. Lafferty RA, Flatt PR, Irwin N. Emerging therapeutic potential for peptide YY for obesity-diabetes. *Peptides.* 2018;100:269-74.
276. Persaud SJ, Bewick GA. Peptide YY: more than just an appetite regulator. *Diabetologia.* 2014;57(9):1762-9.
277. Ueno H, Yamaguchi H, Mizuta M, Nakazato M. The role of PYY in feeding regulation. *Regul Pept.* 2008;145(1-3):12-6.
278. Aragón F, Karaca M, Novials A, Maldonado R, Maechler P, Rubí B. Pancreatic polypeptide regulates glucagon release through PPYR1 receptors expressed in mouse and human alpha-cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1850(2):343-51.
279. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes.* 2011;60(10):2441-9.
280. Stich V, Berlan M. Physiological regulation of NEFA availability: lipolysis pathway. *Proc Nutr Soc.* 2004;63(2):369-74.
281. Sobczak AIS, Pitt SJ, Smith TK, Ajjan RA, Stewart AJ. Lipidomic profiling of plasma free fatty acids in type-1 diabetes highlights specific changes in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2021;1866(1):158823.
282. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci.* 2016;61(5):1282-93.
283. Russolillo G, Marqués I. *Sistema de Intercambio de Alimentos para la Confeción de Dietas y Planificación de Menús.* Pamplona 2011.
284. Taylor HL, Jacobs DR, Schucker B, Knudsen J, Leon AS, Debacker G. A questionnaire for the assessment of leisure time physical activities. *J Chronic Dis.* 1978;31(12):741-55.
285. Mateo-Gallego R, Moreno-Indias I, Bea AM, Sánchez-Alcoholado L, Fumanal AJ, Quesada-Molina M, et al. An alcohol-free beer enriched with isomaltulose and a resistant dextrin modulates gut microbiome in subjects with type 2 diabetes mellitus and overweight or obesity: a pilot study. *Food Funct.* 2021;12(8):3635-46.
286. Takeda E, Yamanaka-Okumura H, Taketani Y, Inagaki N, Hosokawa M, Shide K, et al. Effect of nutritional counseling and long term isomaltulose based liquid formula (MHN-01) intake on metabolic syndrome. *J Clin Biochem Nutr.* 2015;57(2):140-4.
287. Khera AV, Won HH, Peloso GM, Lawson KS, Bartz TM, Deng X, et al. Diagnostic yield and clinical utility of sequencing familial hypercholesterolemia genes in patients with severe hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(22):2578-89.
288. van Can JG, Ijzerman TH, van Loon LJ, Brouns F, Blaak EE. Reduced glycaemic and insulinaemic responses following isomaltulose ingestion: implications for postprandial substrate use. *Br J Nutr.* 2009;102(10):1408-13.

289. König D, Theis S, Kozianowski G, Berg A. Postprandial substrate use in overweight subjects with the metabolic syndrome after isomaltulose (Palatinose™) ingestion. *Nutrition*. 2012;28(6):651-6.
290. Henry CJ, Kaur B, Quek RYC, Camps SG. A low glycaemic index diet incorporating isomaltulose is associated with lower glycaemic response and variability, and promotes fat oxidation in asians. *Nutrients*. 2017;9(5).
291. Okuno M, Kim MK, Mizu M, Mori M, Mori H, Yamori Y. Palatinose-blended sugar compared with sucrose: different effects on insulin sensitivity after 12 weeks supplementation in sedentary adults. *Int J Food Sci Nutr*. 2010;61(6):643-51.
292. Brunner S, Holub I, Theis S, Gostner A, Melcher R, Wolf P, et al. Metabolic effects of replacing sucrose by isomaltulose in subjects with type 2 diabetes: a randomized double-blind trial. *Diabetes Care*. 2012;35(6):1249-51.
293. Kawaguchi T, Nakano D, Oriishi T, Torimura T. Effects of isomaltulose on insulin resistance and metabolites in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A metabolomic analysis. *Mol Med Rep*. 2018;18(2):2033-42.
294. Aliasgharzadeh A, Dehghan P, Gargari BP, Asghari-Jafarabadi M. Resistant dextrin, as a prebiotic, improves insulin resistance and inflammation in women with type 2 diabetes: a randomised controlled clinical trial. *Br J Nutr*. 2015;113(2):321-30.
295. Lv Y, Qin X, Jia H, Chen S, Sun W, Wang X. The association between gut microbiota composition and BMI in Chinese male college students, as analysed by next-generation sequencing. *Br J Nutr*. 2019;122(9):986-95.
296. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, De Stefanis C, Gnani D, et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology*. 2017;65(2):451-64.
297. Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, Sohet FM, Pachikian BD, Naslain D, et al. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(5):1236-43.
298. Keyhani-Nejad F, Barbosa Yanez RL, Kemper M, Schueler R, Pivovarova-Ramich O, Rudovich N, et al. Endogenously released GIP reduces and GLP-1 increases hepatic insulin extraction. *Peptides*. 2020;125:170231.
299. Angarita Dávila L, Bermúdez V, Aparicio D, Céspedes V, Escobar MC, Durán-Agüero S, et al. Effect of oral nutritional supplements with sucromalt and isomaltulose versus standard formula on glycaemic index, entero-insular axis peptides and subjective appetite in patients with type 2 diabetes: a randomised cross-over study. *Nutrients*. 2019;11(7).
300. Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. The microbiota-gut-brain axis in obesity. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(10):747-56.
301. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, et al. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(20):2292-333.
302. Booth G, Cheng AY, Committee CDACPE. Canadian Diabetes Association 2013 clinical practice guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada. *Methods*. *Can J Diabetes*. 2013;37 Suppl 1:S4-7.
303. Sievenpiper JL, de Souza RJ, Mirrahimi A, Yu ME, Carleton AJ, Beyene J, et al. Effect of fructose on body weight in controlled feeding trials: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2012;156(4):291-304.
304. Chiavaroli L, de Souza RJ, Ha V, Cozma AI, Mirrahimi A, Wang DD, et al. Effect of fructose on established lipid targets: a systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(9):e001700.

305. Livesey G, Taylor R. Fructose consumption and consequences for glycation, plasma triacylglycerol, and body weight: meta-analyses and meta-regression models of intervention studies. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(5):1419-37.
306. Vega-López S, Ausman LM, Matthan NR, Lichtenstein AH. Postprandial lipid responses to standard carbohydrates used to determine glycaemic index values. *Br J Nutr.* 2013;110(10):1782-8.

# **ARTÍCULOS PRINCIPALES**



	Referencia Bibliográfica	Área Temática	Factor de Impacto	Aportación del doctorado
<b>Artículo 1</b>	Mateo-Gallego R, <b>Pérez-Calahorra S</b> , Lamiquiz-Moneo I, Marco-Benedí V, Bea AM, Fumanal AJ, Prieto-Martín A, Laclaustra M, Cenarro A, Civeira F. Effect of an alcohol-free beer enriched with isomaltulose and a resistant dextrin on insulin resistance in diabetic patients with overweight or obesity. Clin Nutr. 2020.Feb;39(2):475-483.doi: 10.1016/j.clnu.2019.02.025.	Nutrición y Dietética	7,324	Colaboración en diseño estudio; Recogida de datos; Análisis de resultados; Colaboración en la elaboración de manuscrito
<b>Artículo 2</b>	Lamiquiz-Moneo I* and <b>Pérez-Calahorra S*</b> , Gracia-Rubio I, Cebollada A, Bea AM, Fumanal A, Ferrer-Mairal A, Prieto-Martín A Sanz-Fernández ML, Cenarro A, Civeira F, Mateo-Gallego R. Effect of the consumption of alcohol-free beers with different carbohydrate composition on postprandial metabolic response. <b>Nutrients. 2022 (Under Review)</b>	Nutrición y Dietética	<b>5,429</b>	Elaboración diseño estudio; Recogida de datos; Análisis de resultados; Colaboración en la elaboración de manuscrito



## Original article

# Effect of an alcohol-free beer enriched with isomaltulose and a resistant dextrin on insulin resistance in diabetic patients with overweight or obesity



Rocío Mateo-Gallego<sup>a, b</sup>, Sofía Pérez-Calahorra<sup>a</sup>, Itziar Lamiquiz-Moneo<sup>a, \*</sup>, Victoria Marco-Benedí<sup>a</sup>, Ana M. Bea<sup>a</sup>, Antonio J. Fumanal<sup>c</sup>, Ascensión Prieto-Martín<sup>c</sup>, Martín Laclaustra<sup>a, d</sup>, Ana Cenarro<sup>a</sup>, Fernando Civeira<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), CIBERCV, Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

<sup>c</sup> Grupo Ágora - La Zaragozana S.A., Zaragoza, Spain

<sup>d</sup> Fundación Aragón Investigación y Desarrollo (ARAID), Zaragoza, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 August 2018

Accepted 16 February 2019

## Keywords:

Alcohol-free beer

Isomaltulose

Resistant dextrin

Type 2 diabetes

Obesity

Insulin resistance

## SUMMARY

**Background & aims:** The quality of carbohydrates has an essential role in nutritional management of type 2 diabetes mellitus (T2DM) because of its substantial impact on glucose homeostasis. Alcohol-free beer has beneficial bioactive components but it has a relatively high glycemic-index so its consumption is restricted in diabetic subjects. We aimed to explore the effect of an alcohol-free beer with modified carbohydrate composition almost completely eliminating maltose and adding isomaltulose (16.5 g/day) and a resistant maltodextrin (5.28 g/day) in comparison to a regular alcohol-free beer on glycemic control of diabetic subjects with overweight or obesity.

**Design:** We randomized 41 subjects into two groups: a) consumption of 66 cL/day of; regular alcohol-free beer for the first 10 weeks and 66 cL/day of alcohol-free beer with modified carbohydrate composition for the next 10 weeks; b) the same described intervention in opposite order. There was a washout period for 6–8 weeks between the two interventions. Participants were counseled to adhere to a healthy diet for cardiovascular health and to increase physical activity. Clinical, biochemical, anthropometric, lifestyle and satiety assessments were performed at the beginning and at the end of each period.

**Results:** Subjects showed significantly weight loss after the two ten weeks periods ( $-1.69 \pm 3.21\%$  and  $-1.77 \pm 3.70\%$  after experimental and regular alcohol-free beers, respectively,  $P = 0.881$ ). Glucose and glycated hemoglobin did not significantly change after any period. Insulin concentrations and HOMA-IR significantly decreased ( $-11.1 [-21.3-4.64]\%$  and  $-1.92 \pm 32.8\%$  respectively) after the intake of experimental alcohol-free beer but not after regular alcohol-free beer. Reductions remained statistically significant after adjusting for weight loss, energy intake, physical activity and intervention order. Subjects reported higher satiety scores after consuming experimental alcohol-free beer.

**Conclusions:** An alcohol-free beer including the substitution of regular carbohydrates for low doses of isomaltulose and the addition of a resistant maltodextrin within meals led to an improvement in insulin resistance in subjects with T2DM and overweight or obesity.

**Clinical trial registration:** The clinical trial has been registered in ClinicalTrials.gov (Identifier: NCT03337828).

© 2019 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

**Abbreviations:** AST, Aspartate transaminase; BMI, Body mass index; CRP, C-reactive protein; GGT, Gamma-glutamyl transferase; GI, Glycemic index; GLP-1, Glucagon-like peptide-1; GPT, Glutamic-pyruvic transaminase; HbA1c, Glycated hemoglobin; HOMA-IR, Homeostasis model assessment of insulin resistance; T2DM, Type 2 diabetes mellitus; VAS, Visual analogic scale.

\* Corresponding author. Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Aterosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Paseo Isabel La Católica, 1-3, 50009, Zaragoza, Spain. Fax: +34 976369985.

E-mail address: [itziarlamiquiz@gmail.com](mailto:itziarlamiquiz@gmail.com) (I. Lamiquiz-Moneo).

<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.02.025>

0261-5614/© 2019 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.



## 1. Introduction

Diabetes mellitus burden is becoming a cause of concern due to its rapidly increasing global prevalence, complications and the excessive mortality rate which follows from its diagnosis [1,2]. Lifestyle intervention is a key issue in diabetes management and includes, among other aspects, medical nutrition therapy [3]. In the presence of overweight or obesity, weight loss constitutes one of the key objectives of treatment. However, there is limited evidence on the optimal diet to control hyperglycemia and obesity in type 2 diabetes mellitus (T2DM). The amount and type of carbohydrate is one of the cornerstones in nutrition therapy of T2DM patients since they commonly comprise fifty percent or more of all calories consumed, and they have a substantial impact on glucose homeostasis [4]. The effect of low-carbohydrate diets in patients with T2DM remains unclear [3,5,6]. Beyond the quantity, carbohydrate composition directly impacts postprandial glucose control [7]. The metabolic effects of carbohydrate-containing foods are determined, mainly, by their content of sugars, dietary fiber, glycemic responses to digestion, processing and whole-grain content. Several clinical trials have documented the beneficial effect of low-glycemic index (GI) diets on glycemic control in T2DM [8]. More recently, several studies have demonstrated that the impact of carbohydrates on insulin secretion and postprandial glycemia can substantially change depending on the types of foods with which the carbohydrates are consumed [9].

Isomaltulose, a disaccharide composed of  $\alpha$ -1,6-linked glucose and fructose, was recently introduced as an alternative sugar with delayed digestion and absorption resulting in a low GI of 32 [10]. A relatively high isomaltulose consumption (over 20 g per day) leads to cardiometabolic benefits including glycemic control, macronutrient oxidation and improved lipid profile, both in healthy and in diabetic patients [11]. Resistant dextrin is a glucose polymer (rich in  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 linkages) derived from wheat or maize [12]. It is incompletely hydrolyzed and absorbed in the small intestine, while the majority is fermented in the colon. High doses ( $\geq 10$  g) of resistant dextrin induce beneficial effects on glycemic status, systemic inflammation, body weight, and body composition in humans [13–15]. To the best of our knowledge, no study has previously explored the potential synergistic beneficial effect of isomaltulose and resistant dextrin in glucose homeostasis of subjects with prediabetes or T2DM.

Beer is over 90% water while the rest of components are mainly carbohydrates (glucose polymers) and alcohol. As a product of cereals fermentation of cereals, beer has B-complex vitamins, in particular folate and choline, and trace amounts of minerals such as potassium, calcium and magnesium [16]. Beer composition also includes a range of polyphenols such as flavonoids and phenolic acids that have protective effects on cardiovascular health as measured by inflammatory biomarkers, among other biomarkers [17–20]. Beer is widely consumed and it is often a preferred drink both in social events and on a daily basis. However, beer is usually restricted in T2DM patients because of its high content of carbohydrates and alcohol [3,5]. Alcohol-free beer has the same bioactive compounds (although in lower concentrations) than regular beer, excluding the alcohol [16,21]. GI is estimated as 119 in regular beer and 80 in alcohol-free beer, which is similar to that of potatoes, white bread or rice. In this context, we aimed to explore the effects of an alcohol-free beer with modified carbohydrates (almost completely eliminating maltose and adding isomaltulose (16.5 g/day) and a resistant maltodextrin (5.28 g/day)) on glycemic control (HOMA-IR as main outcome) in diabetic subjects who are overweight or obese, in comparison to an alcohol-free beer with regular composition to overcome the

restrictions to regular beer for T2DM. A secondary and exploratory objective of the study was to address the effect of modified alcohol-free beer on satiety.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study design and subjects

A randomized, controlled, double-blind design with two parallel groups was performed among volunteers of both sexes aged 18–80, with a body mass index (BMI) ranging from 25 to 40 kg/m<sup>2</sup> and steady weight ( $\pm 4$  Kg) in the previous 2 months. We included those subjects with any of the following criteria: a) Diagnosis of prediabetes or T2DM according to international guidelines (fasting glucose concentration  $\geq 100$  mg/dL and/or glycated hemoglobin (HbA1c)  $\geq 5.7\%$ , and not taking antidiabetic drugs); b) Previous diagnosis of prediabetes or T2DM on stable dose of metformin for 2 months, regardless of glucose and/or HbA1c levels. We excluded those subjects with poorly controlled diabetes defined as HbA1c concentration over 7%. Other exclusion criteria were: gluten intolerance, lipid-lowering drugs and/or supplements of sterols or omega-3 fatty acids, weight loss medications, kidney disease (glomerular filtration rate  $< 45$  mL/min), active liver disease, uncontrolled hypothyroidism, and any other disease or condition that could limit the study compliance.

### 2.2. Recruitment and pre-screening

Volunteers were recruited by public advertisements on local television and newspapers. They were invited to an informative session in which study objectives, and inclusion and exclusion criteria were explained in depth. Participants willing to participate completed a questionnaire that included: body weight, height, medical history, common medications, and availability to participate. Those volunteers who completed the study questionnaire and were eligible according to the inclusion and exclusion criteria were scheduled for a pre-screening visit. The visit was performed to assess eligibility criteria. It included clinical and anthropometric measurements to confirm that participants met BMI and other clinical criteria like gluten tolerance or pharmacological use, among others. We reviewed the most recently ( $< 2$  months) glucose and HbA1c concentrations to check inclusion and exclusion criteria. If not available, we performed a blood extraction collection to assess these values according to the described methodology. If participant was eligible to enter the study, they were provided with dietary and exercise counseling and a randomization visit was scheduled 2–4 weeks later. We aimed to stabilize the lifestyle among participants during the entire study. Informed consent was obtained at this visit (Fig. 1).

The trial was carried out in the Clinical and Research Unit on Lipids and Atherosclerosis (Hospital Universitario Miguel Servet at Zaragoza (Spain)) from February 2017 to December 2017. The study protocol was approved by the local institutional ethical committee (Comité de Ética e Investigación Clínica de Aragón). All procedures were in accordance with the ethical standards of that committee. This clinical trial was registered in [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) under identifier NCT03337828.

### 2.3. Randomization and intervention

Participants were randomized into two groups (Fig. 1): a) consumption of two bottles (33 cL each) per day of alcohol-free beer with regular composition for the first 10 weeks and two bottles (33 cL each) per day of alcohol-free beer with modified carbohydrates

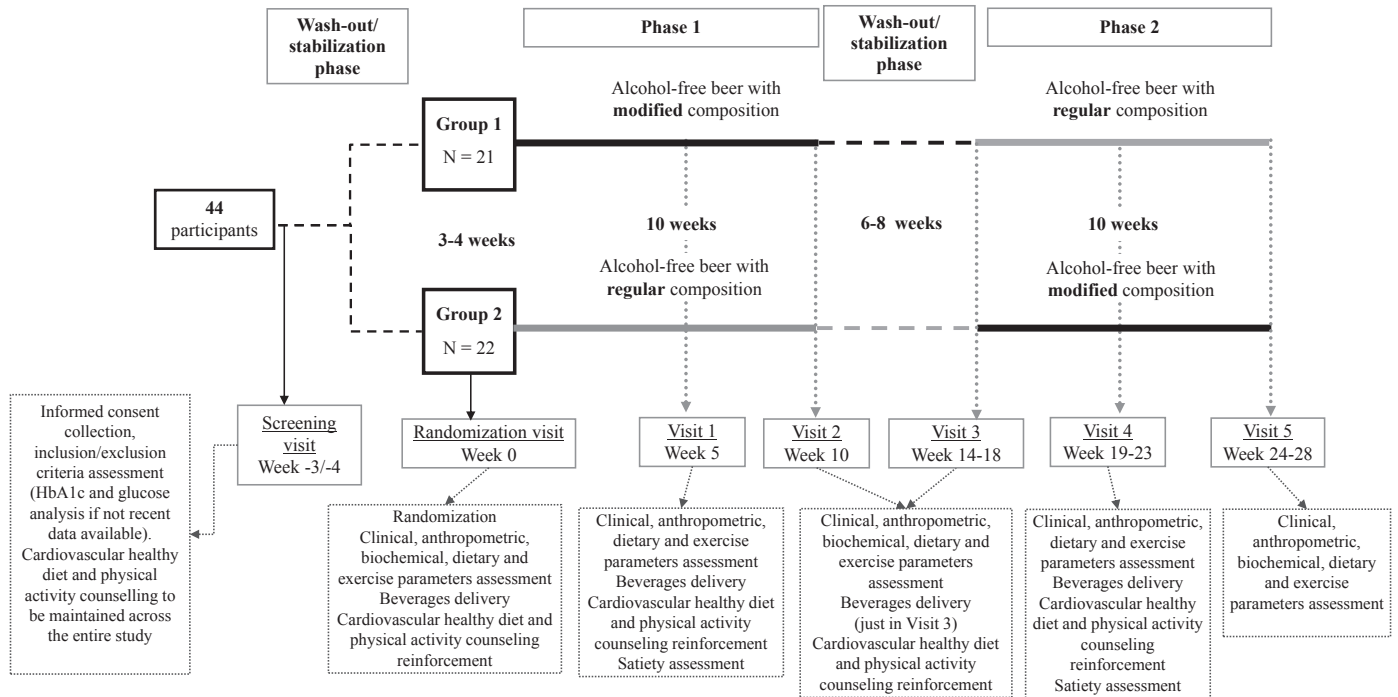


Fig. 1. Study design description.

composition for the next 10 weeks; b) the same described intervention in opposite order. There was a washout phase for 6–8 weeks between the two intervention phases, during which time no beer was consumed. Alcohol-free beer with modified carbohydrates included a complete fermentation which almost completely eliminated maltose (0.07 g/100 mL) and the addition of isomaltulose (2.5 g/100 mL) and resistant maltodextrin (0.8 g/100 mL). The participants received 16.5 g per day of isomaltulose and 5.28 g per day of resistant dextrin. The complete nutritional composition of both alcohol-free beers is provided in Supplemental Table 1.

Alcohol-free beers were provided to participants without charge and they were counseled to take the beers within main meals (lunch and dinner). Volunteers and research staff were blinded to the type of beer that individuals were assigned to consume in each phase. A local brewery prepared the beers in similar containers to maintain the blinding which was only revealed after the results were analyzed. Randomization was performed by using online software which generated a sequence of 44 numbers. Study numbers were correlatively assigned to the participants and they were assigned to a different intervention order based on the computer generated sequence. Participants were asked to fill in a daily questionnaire by recording all beers they consumed during the study. If they skipped any prescribed beer, it was recorded together with the reason on the beer was not consumed. The questionnaire was reviewed by a researcher on each visit who recorded consumption compliance. Participants were urged not to consume other beers (both with alcohol and alcohol-free) during the entire study.

Clinical, anthropometric and biochemical parameters along with dietary and physical activity information were collected at the following visits: randomization, end of the first phase, beginning of the second phase and end of the second phase (Fig. 1). Intermediate visits including clinical and anthropometric measurements and dietary and physical activity assessments were performed in the middle of each phase. These mid-phase visits intended to monitor the study intervention and to reinforce lifestyle intervention.

#### 2.4. Diet and physical activity

Eligible participants were provided with counseling on cardiovascular healthy diet at pre-screening visits and at each study visit. Dietary counseling included established recommendations for subjects with T2DM and overweight or obesity. Advice included higher consumption of fruits, vegetables, whole-grains, low-fat dairy products and nuts and lower intake of red and processed meats, sweetened soft-drinks, alcohol, sweets or snacks. Illustrative sized portions were shown according to each participant's energy requirements to try to achieve a restriction of calorie consumption. All participants were provided with general physical-activity advice that was in accordance with their physical status. Physical activity advice was quite heterogeneous due to the different fitness conditions of subjects (i.e.: walk one hour a day or running 30 min three times a week).

Diet and physical activity were monitored across the study to control lifestyle factors that could interfere in the study findings. Participants were asked to complete a 3-day weighed food record before each visit. Dietary analysis was performed by an open source online tool (© InsideMyFood.com) which is based on Spanish food-composition tables [22]. The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), a brief validated exercise questionnaire, was administered by direct interview from the researcher to the participant [23].

#### 2.5. Satiety questionnaire

Participants were instructed to complete a satiety questionnaire 60–90 min after drinking one of the alcohol-free beers along with the eating food. We asked the volunteers to fill it in at 4 time-points: once during the first 5 weeks of each phase and once during the last 5 weeks. The questionnaire was based on visual analogic scales (VAS) by including 8 questions regarding satiety and fullness. It included 100 mm horizontal lines anchored with the extremes of the subjective feeling of hunger to be quantified (i.e.:

“not at all hungry” (0 mm) and “as hungry as I have ever felt” (100 mm). This scale is commonly used and validated to measure appetite sensations and it is known to have good repeat reliability between groups [24]. Subjects were asked to record the amounts and times of eating all foods in the last 3 days. These amounts were analyzed in relation to the consumption of the different beers and to the proportions of calories, proteins, carbohydrates and fats consumed. This data was analyzed by an open source software, as previously explained.

## 2.6. Anthropometric and clinical parameters

Body weight was measured in subjects without shoes to the nearest 0.1 kg with a calibrated scale (Seca 813, Seca Deutschland®, Hamburg, Deutschland). Height was assessed to the nearest 0.1 cm with a wall-mounted stadiometer (Seca 217, Seca Deutschland®, Hamburg, Deutschland). BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Waist circumference was measured with anthropometric tape midway between the lowest rib and the iliac crest. Body composition was assessed via bioelectrical impedance through the bipolar foot-to-foot technique (Tanita TBF 410 GS, Omron Corporation®, Tokyo, Japan) [25]. All measurements were taken in accordance with the recommended guidelines: no food or drink 3 h prior to measurements, no exhausting exercise 12 h prior to measurements, and no alcohol or caffeine consumption 24 h prior to measurements. Blood pressure was measured in triplicate with a validated semiautomatic oscillometer (Omron M3, Omron Cop; Hoofddorp, the Netherlands).

## 2.7. Laboratory measurements

Blood samples were drawn by venipuncture after 12 h fasting. The levels of total cholesterol, triglycerides, and HDL cholesterol, uric acid, gamma-glutamyl transferase (GGT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and aspartate transaminase (AST) were measured with standard enzymatic methods. LDL cholesterol levels were calculated with the Friedewald formula when serum triglycerides were <400 mg/dL. Non-HDL cholesterol was calculated as total cholesterol minus HDL cholesterol. Blood glucose concentration was measured with the glucose-oxidase method. Insulin levels were measured via radioimmunoassay. The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was estimated using fasting serum glucose (mg/dL)  $\times$  plasma insulin ( $\mu$ U/mL)/405. HbA1c was determined via high-performance liquid chromatography. C-reactive protein (CRP) was determined by nephelometry using IMMAGE-Immunochemistry System (Beckman Coulter, USA).

## 2.8. Statistical analyses

HOMA-IR was established as the main outcome and its variability was estimated at 1.5 units. We expected a difference of HOMA-IR of 0.70 among intervention groups after dietary intervention. A total sample size of 41 subjects was obtained by considering 80% power ( $Z\beta$  unilateral = 0.842) to detect a difference between treatment groups and a confidence interval ( $1-\alpha$ ) of 90% ( $Z\alpha$  unilateral = 1.282). All subjects who completed the study were included in the data analysis, independent of reported intervention compliance according to intention-to-treat analysis. Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  SD or median (25th percentile – 75th percentile) as applicable and categorical (nominal) variables are reported as percentages of total sample. Differences between independent variables were calculated by *t*-test or Mann–Whitney test, as appropriate, while categorical variables were compared using the chi-squared test. Two-tailed *t* tests or the Wilcoxon rank-sum test for paired samples as appropriate were used to compare

changes in outcome variables in response to each alcohol-free beer. Differences between both alcohol-free beers across the study were tested using linear mixed-effects models by including the 4 study time-points. To examine whether there was any carryover effect from intervention order and clinical and biochemical changes across the study, we used multiple linear regressions by including potential confounding factors (weight loss, energy intake and physical activity after intervention, and intervention order) as independent variables and study outcomes as dependent variables. All statistical analyses were performed with SPSS version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R version 3.4.3 and significance was set at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Participants and study course

A total of 57 participants were examined for eligibility of which 43 met all inclusion/exclusion criteria. Just one participant (a man beginning with alcohol-free beer with regular composition) dropped out of the study because of personal reasons and he was not included in the final analysis. As shown in Table 1, those participants assigned to one of the two study intervention sequences did not differ in terms of clinical or biochemical characteristics at baseline ( $P > 0.05$  for all parameters). Participants were mostly middle-aged ( $55.8 \pm 7.41$  years) with a mean BMI of  $31.9 \pm 3.09$  kg/m<sup>2</sup> and there were more men than women in both groups. Glucose, insulin, HOMA-IR and HbA1c concentrations were  $111 \pm 18.6$  mg/dL,  $9.90 \pm 3.84$  mg/dL,  $2.70 \pm 1.10$  and  $6.01 \pm 0.59\%$ , respectively, at the beginning of the study. Eight participants were taking metformin in stable doses during the whole study. The percentage of volunteers taking metformin did not significantly differ between those participants beginning with alcohol-free beer with modified composition ( $N = 6$ ) and those starting by alcohol-free beer with regular composition ( $N = 2$ ).

We observed a high compliance in beer consumption in both intervention periods. Subjects reported 96.2% (95% CI: 94.8–97.5) compliance during the period of consuming alcohol-free beer with regular composition and 96.7% (95% CI: 95.5–97.8) compliance during the period of consuming alcohol-free beer with modified carbohydrates composition. High compliance was constant across the study: 97.3% (95% CI: 96.1–98.4) at the intermediate visit and 95.2% (95% CI: 93.1–97.2) at the final visit in the regular alcohol-free beers intervention period; and 97.1% (95% CI: 96.0–98.2) at the intermediate visit and 96.3% (95% CI: 94.7–97.8) at the final visit in modified composition alcohol-free beer period. The sequence of study intervention did not significantly influence the compliance.

### 3.2. Weight loss and body composition

Subjects showed a significant weight loss in both interventions:  $-1.69 \pm 3.21\%$  ( $P = 0.004$ ) in the period of consuming the alcohol-beer with modified carbohydrates composition and  $-1.77 \pm 3.70\%$  ( $P = 0.007$ ) in the period of consuming the regular alcohol-free beer (Table 2). Weight loss did not significantly differ between consumption periods of the two alcohol-free beers according to intervention order (data not shown). A similar significant decrease was observed in waist circumference after both intervention periods while no significant change was observed in body composition in any phase.

### 3.3. Glucose metabolism parameters

As indicated in Table 2 and in Fig. 2, blood glucose levels did not significantly change in any phase. HbA1c slightly decreased after

**Table 1**  
Clinical and biochemical characteristics at baseline according to dietary intervention sequence.<sup>a</sup>

	Alcohol-free beer with regular composition → Alcohol-free beer with modified composition sequence N = 22	Alcohol-free beer with modified composition → Alcohol-free beer with regular composition sequence N = 21	<i>P</i> <sup>b</sup>
Age, years	55.7 ± 8.68	55.9 ± 6.03	0.939
Gender, n (%) males	15 (68.2)	12 (57.1)	0.454
Weight, kg	90.6 ± 11.0	88.8 ± 11.8	0.618
Waist circumference, cm	113 [105–120]	110 [105–113]	0.265
Fat mass, kg	31.0 ± 7.12	30.6 ± 6.91	0.885
Fat free mass, kg	58.6 ± 10.8	57.5 ± 9.72	0.745
Visceral fat, levels	13.9 ± 3.42	13.6 ± 3.63	0.809
Systolic blood pressure, mmHg	130 ± 16.9	129 ± 13.8	0.927
Diastolic blood pressure, mmHg	85.0 ± 8.56	84.3 ± 9.21	0.794
Metformin, n (%)	2 (9.10)	6 (28.6)	0.132
Total cholesterol, mg/dL	208 ± 34.1	206 ± 30.9	0.815
HDL cholesterol, mg/dL	51.2 ± 7.90	52.7 ± 8.78	0.575
Triglycerides, mg/dL	111 ± 46.3	125 ± 51.1	0.211
LDL cholesterol, mg/dL	134 ± 27.6	133 ± 24.7	0.824
Apolipoprotein B, mg/dL	108 ± 31.6	114 ± 28.3	0.473
Glucose, mg/dL	112 ± 18.4	110 ± 19.1	0.706
Insulin, mg/dL	9.38 ± 3.36	10.4 ± 4.24	0.368
HOMA-IR	2.57 ± 0.91	2.84 ± 1.27	0.419
HbA1c, %	5.98 ± 0.67	6.05 ± 0.50	0.700
GGT, U/L	24.5 [18.5–35.0]	25.0 [21.5–39.5]	0.490
AST, U/L	22.0 [19.5–28.0]	24.5 [20.0–31.0]	0.955
GPT, U/L	23.3 ± 8.91	23.6 ± 10.0	0.905
Uric acid, mg/dL	6.32 ± 1.09	6.15 ± 1.80	0.707
CRP, mg/dL	0.17 [0.08–0.36]	0.27 [0.15–0.48]	0.198

<sup>a</sup> Values are expressed as mean ± SD or median (25th percentile – 75th percentile) as applicable. AST denotes aspartate transaminase; CRP, C-reactive protein; GGT, gamma-glutamyl transferase; GPT, gamma-glutamyl transaminase; HbA1c, glycated hemoglobin; HOMA-IR, Homeostasis model assessment of insulin resistance.

<sup>b</sup> *P* refers to differences within each beer intervention period calculated by  $\chi^2$  test, *t*-test or Mann–Whitney U test as applicable.

both phases  $-0.75 \pm 5.16\%$  after regular alcohol-free beer consumption and  $-1.11 \pm 4.61\%$  after modified alcohol-free beer intake, with no differences within interventions ( $P = 0.500$  and  $P = 0.177$ , respectively). We did find significant differences between both beers ( $P = 0.001$ ; Fig. 2) although differences disappeared after adjusting by weight loss and other confounding factors. Insulin concentrations significantly decreased by  $-11.1\%$  ( $P = 0.019$ ) after the intake of experimental alcohol-free beer while no significant

change was observed in the period consuming the regular beer ( $P = 0.812$ ). We found statistically significant differences between diets ( $P = 0.043$ ; Fig. 2) that remained significant after BMI change and order intervention adjustment ( $P = 0.001$ ). However, the significance was lost in the fully adjusted model (BMI change, intervention order, gender, energy consumption, physical activity and fat mass change),  $P = 0.051$ . HOMA-IR significantly decreased by  $-1.92 \pm 32.8\%$  ( $P = 0.041$ ) after consuming the modified alcohol-

**Table 2**  
Percentage change in clinical and biochemical characteristics after each type of alcohol-free beer.<sup>a</sup>

	Alcohol-free beer with regular composition		Alcohol-free beer with modified composition	
	$\Delta\%$ change after intervention N = 43	<i>P</i> <sup>b</sup>	$\Delta\%$ change after intervention N = 42	<i>P</i> <sup>b</sup>
Weight	$-1.77 \pm 3.70$	0.007	$-1.69 \pm 3.21$	0.004
Waist circumference	$-2.87 \pm 4.40$	0.006	$-1.55 \pm 2.45$	0.003
Fat mass	$-2.70 \pm 9.95$	0.112	$-4.05 \pm 9.94$	0.167
Fat free mass	$-0.23 \pm 3.62$	0.833	$-0.28 \pm 3.13$	0.142
Visceral fat	0 [–7.85–0]	0.113	0 [–8.33–0]	0.243
Systolic blood pressure	$-2.93 \pm 8.84$	0.020	$-1.46 \pm 9.55$	0.247
Diastolic blood pressure	$-3.70 \pm 8.62$	0.006	$-3.65 \pm 9.17$	0.046
Total cholesterol	$2.02 \pm 10.8$	0.309	$6.44 \pm 17.7$	0.050
HDL cholesterol	$1.38 \pm 9.72$	0.419	$2.76 \pm 8.98$	0.047
Triglycerides	$9.17 \pm 33.8$	0.268	$-0.41 \pm 30.9$	0.197
LDL cholesterol	$2.02 \pm 14.7$	0.550	$5.41 \pm 19.7$	0.029
Apolipoprotein B	$-4.54 [–9.60–15.8]$	0.881	$1.06 [–9.33–13.2]$	0.674
Glucose	$0.21 \pm 10.6$	0.503	$1.26 \pm 12.2$	0.751
Insulin	$-1.64 [–20.5–18.2]$	0.812	$-11.1 [–21.3–4.64]$	0.019
HOMA-IR	$10.4 \pm 59.6$	0.504	$-1.92 \pm 32.8$	0.041
HbA1c	$-0.75 \pm 5.16$	0.500	$-1.11 \pm 4.61$	0.177
GGT	$-3.70 [–12.5–5.45]$	0.231	$0.86 [–15.7–6.70]$	0.566
AST	$-0.56 \pm 20.1$	0.326	$6.01 \pm 18.5$	0.176
GPT	$-0.02 \pm 23.5$	0.269	$9.28 \pm 34.2$	0.434
Uric acid	$-0.72 \pm 10.3$	0.377	$-0.77 \pm 11.0$	0.175
CRP	$11.1 [–32.2–50.0]$	0.688	$0 [–24.3–27.6]$	0.519

<sup>a</sup> Values are expressed as mean ± SD or median (25th percentile – 75th percentile) as applicable. AST denotes aspartate transaminase; CRP, C-reactive protein; GGT, gamma-glutamyl transferase; GPT, gamma-glutamyl transaminase; HbA1c, glycated hemoglobin; HOMA-IR, Homeostasis model assessment of insulin resistance.

<sup>b</sup> *P* refers to differences within each beer intervention period calculated by paired *t*-test or Wilcoxon test as applicable.

free beer while regular alcohol-free beer intake did not lead to significant change ( $10.4 \pm 59.6\%$ ,  $P = 0.504$ ). There was statistical significant differences in HOMA-IR change between both beers ( $P < 0.001$ ) that remained significant after adjusting by BMI change, intervention order, gender, energy consumption, physical activity and fat mass change ( $P = 0.030$ ).

### 3.4. Other cardiometabolic parameters

Systolic blood pressure significantly decreased just after the regular alcohol-free beer period while diastolic blood pressure significantly decreased after the consumption of both alcohol-free beers. There were not significant differences between the two alcohol-free beers in systolic ( $P = 0.203$ ) and diastolic ( $P = 0.074$ ) blood pressure after adjusting for BMI change, intervention order, gender, energy consumption, physical activity and fat mass change. LDL and HDL cholesterol slightly and significantly increased during the period of modified composition alcohol-free beer consumption while no significant change was observed during the regular alcohol-free beer period. LDL cholesterol varied from  $135 \pm 25.2$  mg/dL at baseline to  $139 \pm 26.0$  mg/dL at the end of intervention ( $P = 0.029$ ) and HDL cholesterol increased from  $52.5 \pm 8.74$  mg/dL to  $54.0 \pm 10.6$  mg/dL ( $P = 0.047$ ). However, statistical differences disappeared after adjusting by all confounding factors (BMI change, intervention order, gender, energy consumption, physical activity and fat mass change;  $P = 0.104$  and  $P = 0.204$  for LDL and HDL, respectively). The rest of the biochemical parameters did not significantly change after any intervention.

### 3.5. Dietary and physical activity parameters

Dietary characteristics reported by participants across the study are included in [Supplemental Table 2](#). Baseline dietary characteristics did not significantly differ between both phases ( $P \geq 0.05$  for

all dietary parameters). Participants did not report a significant change of energy intake in the period of consuming the regular alcohol-free beer. However, a significant decrease in energy intake at the intermediate visit in the period of consuming the experimental alcohol-free beer was observed ( $P = 0.013$  across intervention;  $P = 0.024$  comparing intermediate and final visits). The percentage of fat intake also decreased at the intermediate visit in the period in which participants were consuming modified composition alcohol-free beer ( $P = 0.023$  across intervention,  $P = 0.043$  comparing intermediate and final visits). This change was mainly observed at the expense of saturated fat ( $P = 0.007$  across interventions with experimental alcohol-free beer,  $P = 0.022$  comparing baseline and intermediate visits and  $P = 0.003$  comparing intermediate and final visits). Fiber and polyunsaturated fatty acid intake heterogeneously changed during regular composition alcohol-free beer period ( $P = 0.027$  and  $P = 0.017$  across interventions for fiber and polyunsaturated fatty acids, respectively).

Physical activity significantly differed at baseline between those subjects beginning with regular and those starting with experimental alcohol-free beer ( $1752 \pm 1305$  and  $961 \pm 732$  METS-h/week respectively,  $P = 0.025$ ). However, baseline physical activity did not significantly differ between both periods ( $P = 0.140$ ). During the study physical activity changed by  $49.7 \pm 128\%$  ( $P = 0.569$  comparing baseline and the final visit) in the period consuming regular composition alcohol-free beer and it varied by  $36.1 \pm 88.6\%$  ( $P = 0.030$  comparing baseline and final visit) in the phase consuming modified composition alcohol-free beer. For that reason, we included physical activity change across the study in full-adjustment models previously described.

### 3.6. Satiety assessment

As reported in [Table 3](#), participants reported a mean fullness score of  $51.4 \pm 5.26$  (mean of the two satiety assessments during the

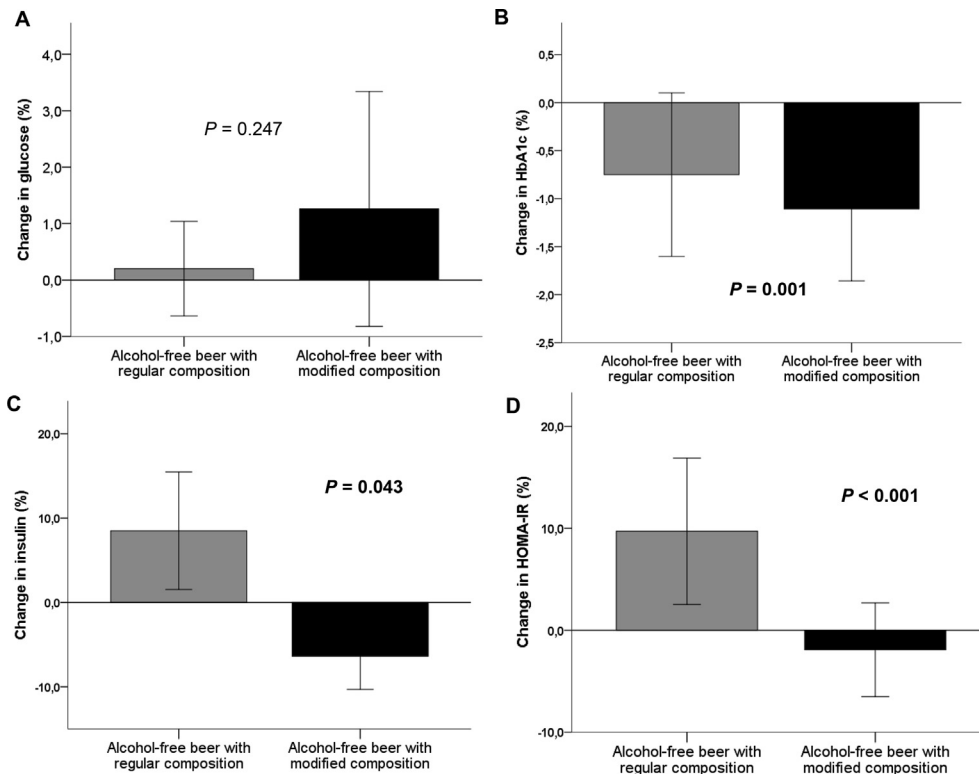


Fig. 2. Glucose metabolism parameters change after each alcohol-free beer. <sup>1</sup>Statistical significance tested using linear mixed-effects models.

intervention) after modified composition alcohol-free beer while this score was  $48.5 \pm 8.55$  after the intake of regular alcohol-free beer ( $P = 0.024$  comparing both beers). These values were adjusted by potential confounders: time since last alcohol-free beer consumption and carbohydrates, fiber, proteins and fat intake in the last meal. Subjects reported lower hunger scores (mean of  $23.9 \pm 7.10$  between intermediate and final visits within intervention) after experimental alcohol-free consumption comparing to regular alcohol-free beer intake (mean of  $26.9 \pm 7.49$  between intermediate and final visits within intervention), although no significant differences were denoted ( $P = 0.059$ ). No differences were detected in others questions regarding appetite and desire for specific food types.

### 3.7. Adverse events

Subjects reported 31 non-severe adverse events across the study: 13 occurred during the period subjects were consuming the alcohol-free beer with modified composition and 18 during the period under regular alcohol-free beer intervention. Seven adverse events were related to mild gastrointestinal symptoms: 3 participants reported abdominal discomfort (2 during the modified beer consumption period and 1 during the regular beer consumption beer), 2 subjects reported constipation, 1 subject reported dyspepsia and 1 reported diarrhea. These last 5 adverse events were observed during the regular alcohol-free beer consumption period. All gastrointestinal adverse events were solved without requiring medication or any other medical intervention.

## 4. Discussion

The main finding of this randomized, double-blind and cross-over study was that the consumption, within main meals, of 66 cL per day of alcohol-free beer including the substitution of regular carbohydrates by isomaltulose (16.5 g per day) and the addition of a resistant maltodextrine (5.28 g per day) led to an improvement in insulin resistance in subjects with T2DM and overweight or obesity. This benefit was not denoted in while consuming regular alcohol-free beer and it was observed regardless of weight loss and other potential confounders like physical activity. Subjects reported higher satiety after consumption of modified composition alcohol-free beer in comparison with the regular alcohol-free beer consumption.

Different trials have revealed that isomaltulose decreases glucose and insulin concentrations and leads to an increase in fat oxidation in healthy, overweight and obese subjects [11,26–28]. Khalhöfer et al. reported a 28% reduction in insulin secretion and 5%

in blood glucose levels in healthy men consuming 37 g of isomaltulose during 7 days [29]. However, the effect of this carbohydrate in subjects with T2DM has been barely explored. Brunner et al. did not observe significant changes in glucose metabolism after intake of 50 g/d of isomaltulose during 12 weeks although they did denote a significant decrease in triglycerides compared with those participants consuming 50 g/d of sucrose [30]. Another research study demonstrated that the ingestion of 1 g/kg-isomaltulose attenuated postprandial hyperglycemia by reducing oral glucose appearance and inhibiting endogenous glucose production, in comparison with the intake of rapidly absorbed sucrose in patients with T2DM [31]. Authors observed that isomaltulose decreased the mean plasma concentrations of insulin, C-peptide, glucagon, and glucose-dependent insulinotropic peptide by 10–23% in comparison with sucrose. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) increased by 64% more and the cumulative amount of systemic glucose appearance was 35% lower after isomaltulose than after sucrose consumption. Similar metabolic effects have also been described in healthy subjects [32].

To our knowledge, only two trials have determined the effect of resistant dextrin, which is a prebiotic, on glucose metabolism and both of them showed it to be beneficial. A clinical trial carried out in 60 healthy subjects showed a 18% decrease in plasma insulin after intake of 17 g of resistant dextrin which was statistically significantly higher than in controls [33]. A slightly higher glucose metabolism improvement was observed in 55 women with T2DM that were randomized to 10 g of resistant dextrin or placebo for 8 weeks. The researchers reported a significant 22.8% decrease in insulin, 24.9% in HOMA-IR, 0.6% in glucose and 9.6% in HbA1c [13]. The benefits observed in glucose metabolism, weight loss and inflammation have been attributed to two different mechanisms. First, the supplementation with prebiotics has been demonstrated to favor the differentiation of L-cells which promote secretion of digestive hormones like GLP-1, peptide YY or gastric inhibitory polypeptide, among others [34]. Second, increased levels of endotoxins have been reported in diabetic patients [35]. Increased endotoxin levels like bacterial lipopolysaccharides (metabolic endotoxaemia) lead to disturbances in appetite regulation and the expression of pro-inflammatory cytokines which are directly related to decrease in insulin action [36–38]. It has been proposed that resistant dextrin may contribute to the modulation of glycemic status by reducing body weight and inflammatory biomarkers through decreased metabolic endotoxaemia [13]. The modified alcohol-free beer provided in our study involved lower doses of isomaltulose and resistant dextrin than those used in prior research. However, we observed significant  $-11.1\%$  and  $-1.92\%$  decreases of insulin and HOMA-IR, respectively, which could be due

**Table 3**  
Satiety assessment after each alcohol-free beer consumption.<sup>a</sup>

Questions	Alcohol-free beer with regular composition			Alcohol-free beer with modified composition			P <sup>c</sup>
	Intermediate visit N = 32	Final visit N = 32	Mean of both visits <sup>b</sup> N = 32	Intermediate visit N = 32	Final visit N = 32	Mean of both visits <sup>b</sup> N = 32	
How hungry do you feel?	31.3 ± 7.74	24.1 ± 7.93	26.9 ± 7.49	28.1 ± 9.32	20.4 ± 5.85	23.9 ± 7.10	0.059
How satisfied do you feel?	50.4 ± 8.78	52.8 ± 10.4	52.4 ± 9.71	51.7 ± 5.88	53.5 ± 8.32	52.7 ± 6.60	0.443
How full do you feel?	45.3 ± 6.70	49.4 ± 10.7	48.5 ± 8.55	52.6 ± 4.81	50.5 ± 7.02	51.4 ± 5.26	0.024
How much do you think you can eat?	38.6 ± 11.2	42.6 ± 15.4	40.5 ± 13.2	37.4 ± 8.94	35.2 ± 9.12	36.4 ± 6.97	0.108
How strong is your desire to eat something sweet?	59.6 ± 13.4	60.9 ± 12.6	60.7 ± 10.3	54.2 ± 15.0	63.1 ± 12.4	58.6 ± 12.3	0.477
How strong is your desire to eat something salty?	55.1 ± 13.4	60.8 ± 13.1	58.9 ± 12.6	56.6 ± 11.5	64.2 ± 6.89	60.5 ± 8.12	0.793
How strong is your desire to eat something tasty?	56.0 ± 13.8	61.1 ± 11.6	59.6 ± 11.6	55.5 ± 9.86	63.0 ± 9.22	59.8 ± 8.51	0.881
How strong is your desire to eat something fatty?	78.1 ± 8.98	70.5 ± 11.9	73.0 ± 10.6	69.3 ± 17.1	74.18 ± 6.97	71.6 ± 10.7	0.808

<sup>a</sup> Values are expressed as mean ± SD. Questionnaire values have been adjusted by time since last alcohol-free beer consumption and carbohydrates, fiber, proteins and fat intake in the last meal.

<sup>b</sup> Mean of both visits refers to the mean between intermediate and final visit values in that period.

<sup>c</sup> P refers to differences between the means in each alcohol-free beer period which is calculated by paired *t* test.

to a synergistic effect of both nutrients. The effects were lower than those previously reported in the studies above but that would be consistent with a dose-dependent effect of these components. Also, we advised the participants to take the alcohol-free beers with meals which could have played an essential role in findings by confirming the modulation of postprandial glycemia of both nutrients despite the low doses were used.

The participants reported higher satiety scores during the period of drinking the alcohol-free beer with isomaltulose and resistant dextrin than during the regular alcohol-free beer period. However, we did not find a differential effect of the two beers in weight loss. We observed a significant decrease in energy intake in the first 5 weeks that subjects consumed alcohol-free beer with modified composition but significance was lost at the end of that study period. Previous trials have reported that resistant dextrin increased satiety which was confirmed by key-appetite digestive hormones like ghrelin [39,40]. Despite previous research involving higher doses of both nutrients, their synergic effect could lead to a higher satiety effect. We hypothesized that we did not denote an enhanced-weight loss ability of modified alcohol-free beer because of an acute effect on satiety or because higher doses of both nutrients are needed. Anyway, the possible satiety enhance ability of the modified composition alcohol-free beer should be confirmed in future studies by including the assessment of more sensitive measurement of satiety and appetite biomarkers.

This study involved healthy lifestyle recommendations including slight energy intake restriction, a cardiovascular healthy dietary pattern (based on the Mediterranean diet) and an increase of physical activity. Subjects showed a  $-1.77\%$  mean weight loss after the phase of consuming a regular composition alcohol-free beer and  $-1.69\%$  after the period of consuming the experimental alcohol-free beer. Results demonstrated that inclusion of tasty and light foods does not prevent body weight reduction and could even be an incentive in weight loss management. Beyond calorie counting, a recent report proposed that high-glycemic-load carbohydrates produce hormonal changes that promote calorie deposition in adipose tissue, exacerbate hunger, and lower energy expenditure [41]. Thus, it is crucial to go in depth into approaches that ameliorate the negative influence of carbohydrates in commonly consumed foods.

Our study has some limitations worth mentioning. The mid-term length of intervention design could have influenced findings, although previous interventional studies that have explored the effect of isomaltulose and resistant dextrin have a shorter time frame. The relatively small sample size could have limited the significance of the effect of the intervention in some outcomes and the extrapolation of findings. Although satiety has been explored by VAS, which has been previously validated, an objective measurement of appetite and satiety such as ghrelin or neuropeptide Y assessment would be necessary to confirm our findings.

In conclusion, an alcohol-free beer including the substitution of regular carbohydrates by isomaltulose (16.5 g per day) and the addition of a resistant dextrin (5.28 g per day) within meals lead to an improvement of insulin resistance (insulin concentration and HOMA-IR) in subjects with T2DM and overweight or obesity. These effects were observed within a lifestyle intervention and regardless of weight loss, physical activity and other confounding factors. To our knowledge, this is the first study employing relatively low doses of isomaltulose and resistant dextrin that demonstrates that a synergic effect of these nutrients could modulate postprandial glycemia and improve glucose metabolism in subjects with T2DM. Improvement in carbohydrate quality in the diet is a cornerstone that merits further research based on its impact not only on glucose metabolism but in overall metabolism. The inclusion of this alcohol-free beer with modified carbohydrates composition could

be part of a healthy diet by improving glycemia management but also increasing the palatability of nutritional therapy.

### Sources of support

This study was supported by funding from Grupo Ágora - La Zaragoza S.A. It was also partially supported by a grant from the Carlos III Research Institute: CIBERCV (co-supported by the European Regional Development Fund (ERDF) which is allocated by the European Union; IIS16/0114).

### Conflict of interest

None declared.

### Acknowledgments

The authors thank the participants for their enthusiastic collaboration in the study and Brandi Reed and Cecilia Bennett for their English editorial assistance. Rocío Mateo-Gallego research activity is funded by Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), Itziar Lamiquiz-Moneo research activity is funded by Fundación Cuenca Villoro and Martín Laclaustra research activity is funded by Fundación Aragón Investigación y Desarrollo (ARAID).

Authors would like to state that A.F. and A.P.M. work for Grupo Ágora - La Zaragoza S.A., which has partially funded the study. They have provided help with logistics and research design but they did not interfere in blind analysis of results. Authors have no other relevant conflict of interest to disclose. Author contributions were as follows: R.M.G, conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, writing the manuscript; S.P.C, data curation, investigation, formal analysis; V.M.B, A.M.B, I.L.M, M.L and A.C, data curation, investigation; A.F. and A.P.M, conceptualization, methodology and funding acquisition; F.C, conceptualization, formal analysis, investigation, methodology, writing the manuscript. All authors have reviewed and approved the final manuscript.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.02.025>.

### References

- [1] Hu FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care* 2011;34:1249–57.
- [2] Ley SH, Hamdy O, Mohan V, Hu FB. Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies. *Lancet* 2014;383:1999–2007.
- [3] American Diabetes Association. Lifestyle management: standards of medical care in diabetes—2018. *Diabetes Care* 2018;41:538–50.
- [4] Ajala O, English P, Pinkney J. Systematic review and meta-analysis of different dietary approaches to the management of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2013;97:505–16.
- [5] Wheeler ML, Dunbar SA, Jaacks LM, Karmally W, Mayer-Davis EJ, Wylie-Rosett J, et al. Macronutrients, food groups, and eating patterns in the management of diabetes: a systematic review of the literature, 2010. *Diabetes Care* 2012;35:434–45.
- [6] van Wyk HJ, Davis RE, Davies JS. A critical review of low-carbohydrate diets in people with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2016;33:148–57.
- [7] Mozaffarian D. Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: a comprehensive review. *Circulation* 2016;133:187–225.
- [8] Thomas D, Elliott EJ. Low glycaemic index, or low glycaemic load, diets for diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* 2009 Jan 21;(1):CD006296. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006296.pub2>.
- [9] Meng H, Matthan NR, Ausman LM, Lichtenstein AH. Effect of macronutrients and fiber on postprandial glycemic responses and meal glycemic index and glycemic load value determinations. *Am J Clin Nutr* 2017;105:842–53.
- [10] Lina BAR, Jonker D, Kozianowski G. Isomaltulose (Palatinose): a review of biological and toxicological studies. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1375–81.

- [11] Maresch CC, Petry SF, Theis S, Bosity-Westphal A, Linn T. Low glycemic index prototype isomaltulose-update of clinical trials. *Nutrients* 2017;9.
- [12] Lefranc-Millot C. NUTRIOSE® 06: a useful soluble dietary fibre for added nutritional value. *Nutr Bull* 2008;33:234–9.
- [13] Aliasgharzadeh A, Dehghan P, Gargari BP, Asghari-Jafarabadi M. Resistant dextrin, as a prebiotic, improves insulin resistance and inflammation in women with type 2 diabetes: a randomised controlled clinical trial. *Br J Nutr* 2015;113:321–30.
- [14] Guerin-Deremaux L, Ringard F, Desailly F, Wils D. Effects of a soluble dietary fibre NUTRIOSE® on colonic fermentation and excretion rates in rats. *Nutr Res Pract* 2010;4:470–6.
- [15] [Internet] Dose-response impact of a soluble fiber, NUTRIOSE®, on energy intake, body weight and body fat in humans. ALS; 2013 [cited 2018 Jul 23]. Available from: <https://www.sprim-als.com/es/dose-response-impact-of-soluble-fiber-nutriose-energy-intake-body-weight-and-body-fat-humans/>.
- [16] de Gaetano G, Costanzo S, Di Castelnuovo A, Badimon L, Bejko D, Alkerwi A, et al. Effects of moderate beer consumption on health and disease: a consensus document. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD* 2016;26:443–67.
- [17] Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *Eur J Clin Nutr* 2010;64(Suppl 3):S112–20.
- [18] Costanzo S, Di Castelnuovo A, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 2011;26:833–50.
- [19] Chiva-Blanch G, Magraner E, Condines X, Valderas-Martínez P, Roth I, Arranz S, et al. Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: a randomized feeding trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2015;25:36–45.
- [20] Imhof A, Woodward M, Doering A, Helbecque N, Loewel H, Amouyel P, et al. Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). *Eur Heart J* 2004;25:2092–100.
- [21] Martínez Alvarez JR, Bellés VV, López-Jaén AB, Marín AV, Codoñer-Franch P. Effects of alcohol-free beer on lipid profile and parameters of oxidative stress and inflammation in elderly women. *Nutrition* 2009;25:182–7.
- [22] Inside my food. Available at: <http://www.insidemyfood.com/>. Accessed June 16, 2018.
- [23] Hagströmer M, Oja P, Sjöström M. The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ): a study of concurrent and construct validity. *Public Health Nutr* 2006;9:755–62.
- [24] Flint A, Raben A, Blundell JE, Astrup A. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. *Int J Obes* 2000;24:38–48.
- [25] Linares CL, Ciangura C, Bouillot J-L, Coupaye M, Declèves X, Poitou C, et al. Validity of leg-to-leg bioelectrical impedance analysis to estimate body fat in obesity. *Obes Surg* 2011;21:917–23.
- [26] König D, Theis S, Kozianowski G, Berg A. Postprandial substrate use in overweight subjects with the metabolic syndrome after isomaltulose (Palatinose™) ingestion. *Nutrition* 2012;28:651–6.
- [27] Takeda E, Yamanaka-Okumura H, Taketani Y, Inagaki N, Hosokawa M, Shide K, et al. Effect of nutritional counseling and long term isomaltulose based liquid formula (MHN-01) intake on metabolic syndrome. *J Clin Biochem Nutr* 2015;57:140–4.
- [28] van Can JGP, Ijzerman TH, van Loon LJC, Brouns F, Blaak EE. Reduced glycaemic and insulinaemic responses following isomaltulose ingestion: implications for postprandial substrate use. *Br J Nutr* 2009;102:1408–13.
- [29] Kahlhöfer J, Karschin J, Silberhorn-Bühler H, Breusing N, Bosity-Westphal A. Effect of low-glycemic-sugar-sweetened beverages on glucose metabolism and macronutrient oxidation in healthy men. *Int J Obes* 2016;40:990–7.
- [30] Brunner S, Holub I, Theis S, Gostner A, Melcher R, Wolf P, et al. Metabolic effects of replacing sucrose by isomaltulose in subjects with type 2 diabetes: a randomized double-blind trial. *Diabetes Care* 2012;35:1249–51.
- [31] Ang M, Linn T. Comparison of the effects of slowly and rapidly absorbed carbohydrates on postprandial glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus patients: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2014;100:1059–68.
- [32] Maeda A, Miyagawa J-I, Miuchi M, Nagai E, Konishi K, Matsuo T, et al. Effects of the naturally-occurring disaccharides, palatinose and sucrose, on incretin secretion in healthy non-obese subjects. *J Diabetes Investig* 2013;4:281–6.
- [33] Li S, Guerin-Deremaux L, Pochat M, Wils D, Reifer C, Miller LE. NUTRIOSE dietary fiber supplementation improves insulin resistance and determinants of metabolic syndrome in overweight men: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Appl Physiol Nutr Metab* 2010;35:773–82.
- [34] Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, Sohet FM, Pachikian BD, Naslain D, et al. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr* 2009;90:1236–43.
- [35] Gomes JMG, de Costa JA, de Alfenas RCG. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: a systematic review. *Metabolism* 2017;68:133–44.
- [36] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761–72.
- [37] Luche E, Cousin B, Garidou L, Serino M, Waget A, Barreau C, et al. Metabolic endotoxemia directly increases the proliferation of adipocyte precursors at the onset of metabolic diseases through a CD14-dependent mechanism. *Mol Metab* 2013;2:281–91.
- [38] Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1219–23.
- [39] Nazare J-A, Sauvinet V, Normand S, Guérin-Deremaux L, Gabert L, Désage M, et al. Impact of a resistant dextrin with a prolonged oxidation pattern on day-long ghrelin profile. *J Am Coll Nutr* 2011;30:63–72.
- [40] Guérin-Deremaux L, Pochat M, Reifer C, Wils D, Cho S, Miller LE. The soluble fiber NUTRIOSE induces a dose-dependent beneficial impact on satiety over time in humans. *Nutr Res* 2011;31:665–72.
- [41] Ludwig DS, Ebbeling CB. The carbohydrate-insulin model of obesity: beyond “calories in, calories out”. *JAMA Intern Med.* 2018 Aug 1;178(8):1098–103. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.2933>.



# Effect of the consumption of alcohol-free beers with different carbohydrate composition on postprandial metabolic response

Lamiquiz-Moneo I<sup>1,2\*</sup>, Pérez-Calahorra S<sup>3\*</sup>, Gracia-Rubio I<sup>1</sup>, Cebollada A<sup>4</sup>, Bea AM<sup>1</sup>, Fumanal A<sup>5</sup>, Ferrer-Mairal A<sup>6,7</sup>, Prieto-Martín A<sup>5</sup>, Sanz-Fernández ML<sup>8</sup>, Cenarro A<sup>1,9</sup>, Civeira F<sup>1,10</sup>, Mateo-Gallego R<sup>1,3</sup>

\*Both authors contributed equally to this work

- <sup>1</sup> Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), CIBERCV, Zaragoza, Spain
- <sup>2</sup> Departamento de Anatomía e Histologías Humanas, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain
- <sup>3</sup> Departamento de Fisiología y Enfermería, Facultad de Ciencias de la Salud y del Deporte, Universidad de Zaragoza, Huesca, Spain.
- <sup>4</sup> Unidad de Biocomputación. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS Aragón), Zaragoza
- <sup>5</sup> Grupo Ágora - La Zaragozana S.A., Zaragoza, Spain
- <sup>6</sup> Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2)
- <sup>7</sup> Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ciencias de la Salud y del Deporte, Universidad de Zaragoza, Huesca, Spain
- <sup>8</sup> Servicio de Urgencias, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain
- <sup>9</sup> Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS)
- <sup>10</sup> Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

\* Correspondence: Itziar Lamiquiz-Moneo, PhD, [itziarlamiquiz@unizar.es](mailto:itziarlamiquiz@unizar.es); Laboratorio de Investigación, Hospital Universitario Miguel Servet, Avenida Isabel La Católica, 1-3, 50009, Zaragoza, Spain; (34) 976765500 (EXT 142895).

**Abstract:** (1) Background: We investigated the postprandial effects of an alcohol-free beer with modified carbohydrates (CH) composition compared to regular alcohol-free beer; (2) Methods: Two randomized, cross-over studies were conducted. In the first study, 10 healthy volunteers received in four different periods 25 g of CH coming from: regular alcohol-free beer (RB), alcohol-free beer enriched with isomaltulose and a resistant maltodextrin (IMB), alcohol-free beer enriched with resistant maltodextrin (MB) and glucose-based beverage. In the second study, 20 healthy volunteers were provided with 50 g of CH from white bread (WB) plus water or with 14.3 g of CH coming from: RB, IMB, MB and extra WB. Blood was sampled after ingestion every 15 min for 2 hours. Glucose, insulin, incretin hormones, TG and NEFAs were determined in all samples; (3) Results: The increase of glucose, insulin and incretin hormones after the consumption of IMB and MB was significantly lower than after RB. The consumption of WB with IMB and MB showed significantly less increase in glucose levels than WB with water or WB with RB; (4) Conclusions: The consumption of an alcohol-free beer with modified CH composition led to a better postprandial response compared to a conventional alcohol-free beer.

**Keywords:** Alcohol-free beer; postprandial effect; glucose metabolism; insulin; incretin hormones

**Citation:** Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Nutrients* **2022**, *14*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Carbohydrates (CH) are the main source of metabolic energy in the body, having their quality an essential impact on several health problems [1–3]. A high consumption of poor-quality CH leads to the development of obesity, insulin resistance or type 2 diabetes mellitus (T2DM), among others [1,4–6]. The quality of CH is determined by fiber amount,

percentage of whole grain, processing and glycemic responses after absorption [7]. Many studies have demonstrated that high glycemic index (GI) diets are associated with a high risk of T2DM, cardiovascular disease and death [8,9].

Alcohol-free beer is a good source of B-complex vitamins (especially folate), and bioactive components, such as flavonoids and phenolic acids, and contains trace amounts of minerals such as potassium, silicon or magnesium [10]. However, this beverage has a relatively high GI, estimated in 80, because of its content in starch and oligosaccharides like maltose or maltotriose. Therefore, despite its valuable nutritional content, their consumption should be moderated, especially in those subjects with glucose intolerance or T2DM. Our group has recently demonstrated that the intake of an alcohol-free beer (including the substitution of regular CH by low doses of isomaltulose and the addition of a resistant maltodextrin) with meals led to an improvement of insulin resistance in subjects with T2DM and overweight or obesity [11]. Isomaltulose is a disaccharide composed of  $\alpha$ -1,6-linked glucose and fructose which is widely used as alternative sugar since it leads to a delayed digestion and absorption [12]. Resistant dextrin is a glucose polymer (rich in  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 linkages) derived from wheat or maize which is principally fermented in the colon [13]. Both have previously demonstrated beneficial effects in glycemic control and insulin resistance when provided in relatively high doses [12,14]. We hypothesized that the synergic effect of these components within alcohol-free beer could improve postprandial glycemia after main meals, which could have a beneficial impact in glucose metabolism in the mid-term. Other studies have demonstrated that consuming CH containing foods concurrently with other nutrients (such as protein) could improve the postprandial effect of that meal [15]. Thus, our objective was to investigate the postprandial effects (including glycemic and lipid metabolism and satiety response) produced after, fasting consumption and in combination with simple CH in form of white bread, of alcohol-free beers in which CH composition have been modified (by substituting conventional CH in beer by isomaltulose and a resistant dextrin), compared to regular alcohol-free beer

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Subjects

Eligible volunteers were healthy women and men aged 18-80, with a body mass index (BMI) between 18 - 27.5 kg/m<sup>2</sup> and steady weight ( $\leq 5\%$  of body weight) in the previous six months. Exclusion criteria included: a) presence of cardiometabolic disease, such as dyslipidemia (total cholesterol > 200 mg/dL, triglycerides > 150 mg/dL or lipid-lowering drugs treatment), prediabetes or T2DM (glucose  $\geq 100$  mg/dL and/or HbA1c  $\geq 5.7\%$  or hypoglycemic drugs) or hypertension; b) presence of other chronic diseases including cardiovascular disease, kidney disease (glomerular filtration rate < 45 mL/min), active liver disease, uncontrolled hypothyroidism and any other condition that could limit study's compliance; c) gluten intolerance and/or high alcohol intake (> 30 mL/day) on a regular basis; d) sterols or omega-3 fatty acids supplements; e) current weight loss medications treatment. Volunteers who were eligible according to the inclusion and exclusion criteria were scheduled for a pre-screening visit. Informed consent was obtained at the screening visit along with anthropometric, clinical and biochemical parameters, to confirm eligibility, before randomization.

The study protocol was approved by the local ethical committee institution (Comité de Ética e Investigación Clínica de Aragón). All procedures were in accordance with the ethical standards of that committee.

### 2.2. Study Design

#### 2.2.1 Study 1

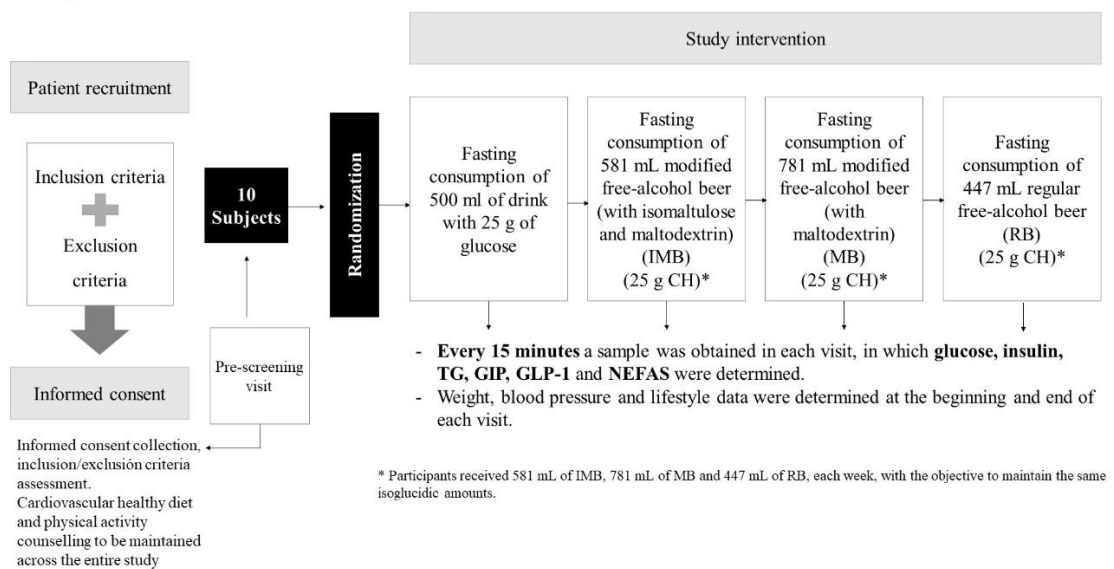
Study 1 is a randomized, controlled, double-blind with a cross-over design including four interventions with 1-week interval among them (Figure 1): a) intake of a drink containing 25 g of glucose; b) intake of 25 g of CH coming from 447 mL of regular alcohol-

free beer (RB), c) intake of 25 g of CH coming from 581 mL of alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with isomaltulose (2.5 g/100 mL) and a resistant maltodextrin (0.8 g/100 mL) (IMB), d) intake of 25 g of CH coming from 781 mL of alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with resistant maltodextrin (2.0 g/100 mL) (MB). Participants received different volume of each beer to maintain the isoglucidic amounts and they consumed the beverage in fasting conditions. The complete nutritional composition of alcohol-free beers is provided in Supplemental Table 1.

2.2.2 Study 2

The study 2 was a randomized, controlled, double-blind and cross-over design, lasting 5 weeks, with the following interventions (Figure 1): a) consumption of 50 g of CH from white bread and 330 mL of mineral water; b) consumption of 50 g of CH from white bread and 14.3 g of CH coming from RB (254 mL); c), consumption of 50 g of CH from white bread and 14.3 g of CH coming from MB (443 mL); d) consumption of 50 g of CH from white bread and 14.3 g of CH coming from IMB (330 mL); e) consumption of 64.3 g of CH coming from white bread and 330 mL of mineral water.

Study 1



Study 2

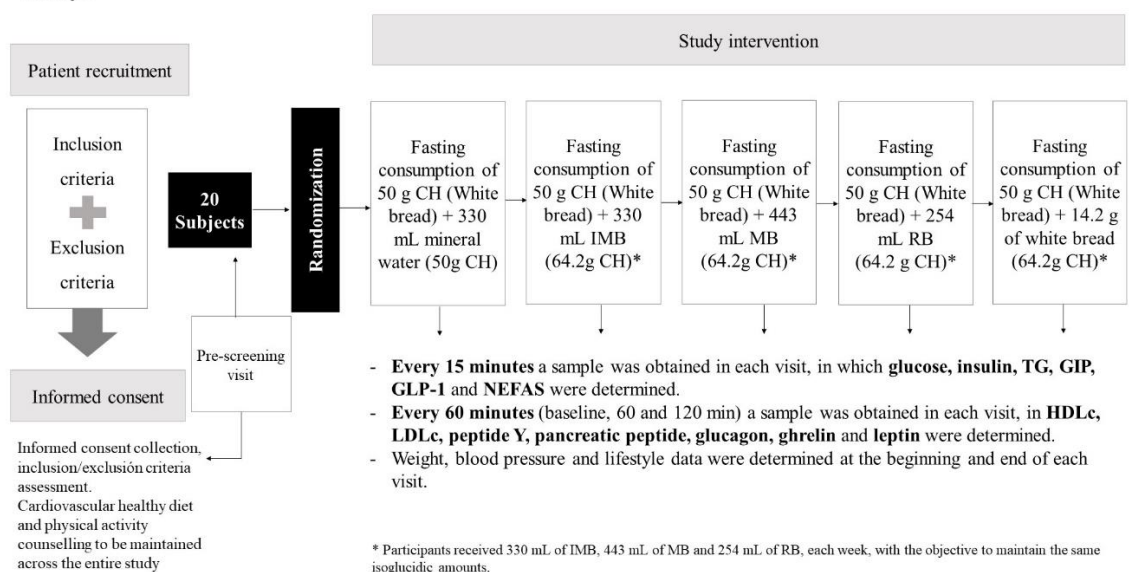


Figure 1. Study design description

As in the study 1, participants received different volume of each beer to maintain the isoglucidic amounts and they consumed the beverages and the bread in fasting conditions. The order of the interventions corresponding to week 2, 3, 4 and 5 was variable for each subject. In both studies, the participants were randomized to one or another sequence of intervention using a computerized system (Random.org). Volunteers and research staff were blinded to the type of beer that individuals were assigned to consume in each phase in both studies. Only the researcher who prepared the beverages was aware of the type of beers, but she was not involved in biochemical neither statistical analysis of the results. A local brewery prepared the beers in similar containers to maintain the blinding which was only revealed after the results were analysed.

### 2.3. Diet and physical activity

Eligible participants were urged to maintain their lifestyle as much stable as possible along both studies. Diet and physical activity were assessed across the study to monitor lifestyle factors that could interfere in the study findings. Participants were asked to complete a 24 h-weighed food record for 3 days before each visit. Dietary analysis was performed by EasyDiet® (Biocentury, S.L.U, Barcelona, Spain) which is based on Spanish food-composition tables [16]. The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), a brief validated exercise questionnaire, was completed by direct interview with participants [17]. Physical activity was assessed in each visit in both studies.

### 2.4. Anthropometric and clinical parameters

Clinical and anthropometric parameters were collected at the beginning of each visit in both studies. Body weight was measured in subjects without shoes to the nearest 0.1 kg with a calibrated scale (SECA 813, Hamburg, Deutschland). Height was assessed to the nearest 0.1 cm with a wall-mounted stadiometer (SECA 2017, Hamburg, Deutschland). BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Waist circumference was measured with anthropometric tape midway between the lowest rib and the iliac crest. Blood pressure was determined at the beginning and at the end of each visit in both studies with a validated semiautomatic oscillometer (Omron HEM-907-E, Hoofddorp, The Netherlands). All measurements were taken in accordance with the recommended guidelines: no food or drink 3 h prior to measurements, no exhausting exercise 12 h prior to measurements, and no alcohol or caffeine consumption 24 h prior to measurements.

### 2.5. Laboratory measurements

Blood samples were drawn by venipuncture after 10-12 hours fasting in the pre-screening visit and biochemical parameters for eligibility criteria assessment were analysed. Levels of total cholesterol, triglycerides (TG), HDL cholesterol, gamma-glutamyl transferase (GGT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) were measured with standard enzymatic methods. LDL cholesterol levels were calculated with the Friedewald's formula. Non-HDL cholesterol was calculated as total cholesterol minus HDL cholesterol. Blood glucose concentration was measured with the glucose-oxidase method. Insulin levels were measured by radioimmunoassay. HbA1c was determined by high-performance liquid chromatography. Thyroid-stimulating hormone (TSH) was determined by luminescent immunoassay TSH3-Dxi (Beckman).

In each study intervention, blood samples were collected by peripheral venous catheter at baseline (fasting status) and every 15 minutes for 120 minutes, after consumption of the drink and the bread, if applicable. Glucose, insulin, gastric inhibitory polypeptide (GIP), glucagon-like peptide 1 (GLP-1), TG and non-esterified fatty acids (NEFAs) were determined every 15 minutes in both studies. HDL and LDL cholesterol, leptin, ghrelin, peptide Y (PY), pancreatic polypeptide (PP), glucagon and peptide Y were determined every 60 minutes (baseline, 60 and 120 min) in the study 2.

GIP, GLP-1, leptin, ghrelin, glucagon, peptide Y (PY) and pancreatic polypeptide (PP) were determined in plasma using the Human Metabolic Hormone Magnetic Bead Panel protocols from the MILLIPLEX® MAP Kits (Cat. # HMHEMAG-34K, Merck) according to manufacturer's instructions. Plasma sample dilutions were done according to the detection range of each panel. Assay sensitivities were 0.6 pg/mL for GIP, 2.5 pg/mL for GLP-1, 13 pg/mL for glucagon, 41 pg/mL for leptin, 2 pg/mL for PP and 28 pg/mL for PYY. Intra-assay precision (mean of % CV) was <10% for all metabolites, while inter-assay precision (mean of % CV) was <15% for all of them. Accuracy was 103% of recovery in plasma samples for GIP and GLP-1, 101% of recovery in plasma samples for glucagon, 102% of recovery in plasma samples for leptin, 104% of recovery in plasma samples for PP and 107% of recovery in plasma samples for PY.

NEFAs were determined by colorimetric enzymatic assay using the MaxDiscovery™ NEFA assay kit from Bioo Scientific Corporation (Catalog # 5620-01) according to manufacturer's instructions. Briefly, we added 4 µL of each sample or standard, for duplicate, to the microplate wells, plus 225 µL of NEFA reagent A and 75 µL of NEFA reagent B to each well. Allow plate to stand for at 10 minutes at room temperature and we measured the absorbance of each well at 550 nm.

#### 2.6. White bread analysis

Available carbohydrates in the white bread used in the study 2 were analysed with the available carbohydrate and dietary fiber kit (K-ACHDF 06/18, Megazyme, Bray, Ireland). Briefly, available carbohydrates were determined on triplicate samples of dried ground bread. Samples were incubated at 80°C with heat stable  $\alpha$ -amylase and incubated at 60°C with protease and amyloglucosidase. An aliquot was removed, centrifuge and incubated with a mixture of sucrase/maltase plus  $\beta$ -galactosidase. D-glucose and D-fructose were determined spectrophotometrically using hexokinase plus glucose-6-phosphate dehydrogenase, followed by phosphoglucose isomerase. Results are given as available carbohydrates (g/100g) on as "as is" basis.

#### 2.7. Statistical analysis

Glucose variation after consumption of each beer was established as the main outcome and its variability in healthy subjects was estimated at 18.4 mg/dL. We expected a difference of glucose variation of 19.4 mg/dL after consumption of RB versus MB. A total sample size of 20 subjects in the study 2 was obtained by considering 90% power ( $Z\beta$  unilateral = 0.842) to detect a difference between treatment groups and a confidence interval (1- $\alpha$ ) of 95% ( $Z\alpha$  unilateral = 1.645). Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  SD or median (25th percentile - 75th percentile) as applicable and categorical (nominal) variables are reported as percentages of total sample. Differences between independent variables were calculated by t-test or Mann-Whitney test, as appropriate, while categorical variables were compared using the chi-squared test. Two-tailed t-tests or the Wilcoxon rank-sum test for paired samples, as appropriate, were used to compare changes in outcome variables in response to the consumption of each alcohol-free beer. Variations of glucose, insulin, GIP and GLP-1 throughout 120 minutes, after the ingestion of each drink and white bread, if applicable, were analyzed in both studies using ANOVA or Kruskal-Wallis tests, as appropriate. Differences in postprandial effect of each intervention were assessed by comparing the area under the concentration versus time curve (AUC) of each metabolite, after the consumption of each drink and white bread, if possible. The AUC and the comparison between them were calculated with the PK package, using the t method. All statistical analyses were performed with R version 3.5.0 and significance was set at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

### 3.1. Participants

A total of 31 participants were examined for study eligibility of whom 30 of them met all inclusion/exclusion criteria. Participants were mostly young-adults (31.5 (30.3–34.5) and 30.5 (24.8–33.0) years in study 1 and 2, respectively) with a median BMI of 23.4 (22.4–25.7) and 24.4 (20.6–26.0) kg/m<sup>2</sup>, in study 1 and 2, respectively, and there were more men than women in both studies. All subjects were healthy with normal values of glucose, TG and lipid profile, without any important previous disease, as cardiovascular disease, hypertension or T2DM, according to the inclusion and exclusion criteria selection (Table 1). Body weight, blood pressure, physical activity and dietary characteristics carry on stable, without significant differences throughout both studies. The length of consumption of MB was significantly higher than IMB, RB and glucose in the study 1 (Supplemental Table 2, Supplemental Table 3, Supplemental Table 4 and Supplemental Table 5). This was an expected finding since MB had the higher volume (781 mL) in comparison with RB (447 mL) and IMB (581 mL).

**Table 1.** Clinical, anthropometric and biochemical characteristics of all subjects included in both studies.

	Subjects included in the study 1 (N=10)	Subjects included in the study 2 (N=20)
Age, years	31.5 (30.3–34.5)	30.5 (24.8–33.0)
Men, n (%)	7 (70%)	14 (70%)
Body weight, kg	86.0 (80.8–87.8)	76.7 (61.4–84.7)
BMI, kg/m <sup>2</sup>	23.4 (22.4–25.7)	24.4 (20.6–26.0)
Alcohol consumption (g/day)	2.35 (0.47–5.81)	6.25 (1.22–15.2)
TSH, $\mu$ UI/L	2.11 $\pm$ 0.99	2.36 $\pm$ 1.28
Triglycerides, mg/dL	56.0 (51.0–63.3)	76.0 (47.5–89.0)
Total cholesterol, mg/dL	192 (183–198)	188 (168–199)
LDL cholesterol, mg/dL	113 (103–122)	112 (98.0–128)
HDL cholesterol, mg/dL	61.0 (53.5–69.3)	56.0 (50.5–60.8)
GGT, UI/L	13.0 (13.0–16.3)	18.5 (15.5–23.0)
GOT, UI/L	22.0 (21.0–25.5)	25.0 (21.0–28.3)
GPT, UI/L	18.0 (14.0–22.3)	17.5 (14.0–29.3)
Glucose, mg/dL	86.0 (80.8–87.8)	86.0 (82.3–95.0)

Quantitative variables are expressed as mean  $\pm$  standard deviations, except for variable not following normal distribution that are expressed as median (25th percentile–75th percentile). Qualitative variables are expressed as percentage. BMI stands for: Body Mass Index; GGT: Gamma glutamyl transferase; GOT: glutamic oxaloacetic transaminase; GPT: glutamic-pyruvic transaminase; TSH: Thyroid-stimulating hormone.

### 3.2. White bread composition

The white bread analysis reported that of the bread used in the study 2 had 53.45  $\pm$  1.73 g of available carbohydrate for each 100 g of total bread.

### 3.3. Glucose metabolism parameters

#### 3.3.1 Study 1

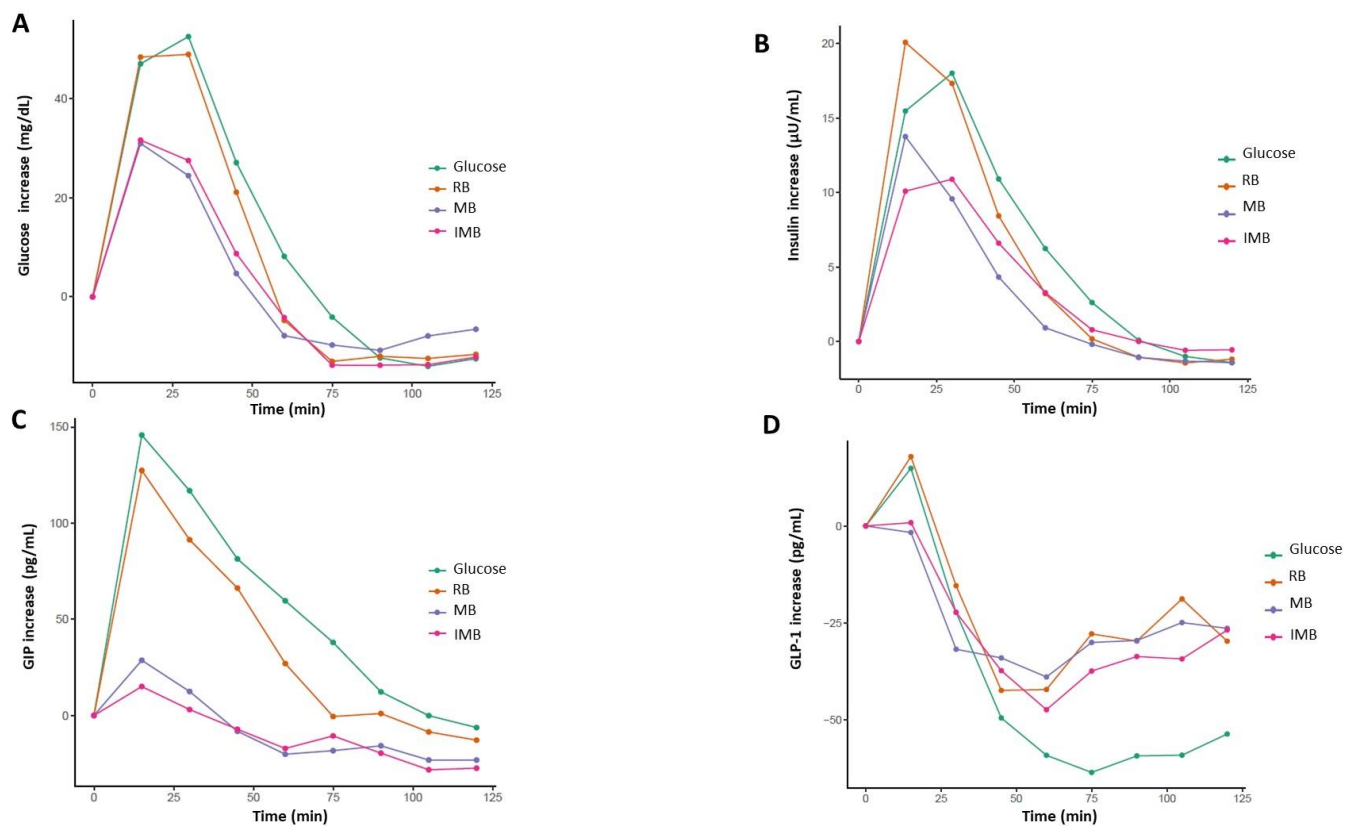
The AUC of blood glucose was significantly lower after the consumption of MB than that produced after consumption of RB ( $p = 0.016$ ), without significant differences between IMB and glucose-based beverage (Supplemental Table 6 and Supplemental Figure 1A). However, the increase in glucose, calculated as the difference between the basal value and the maximum peak obtained after the ingestion of each drink, was significantly different depending on the drink ingested ( $p = 0.005$ , Table 2). The results

showed that the increase in glucose was significantly lower after the consumption of IMB and MB than that produced after the consumption of glucose-based beverage or RB (Figure 2A).

The AUCs of insulin after the consumption of MB and IMB were significantly lower than those produced after the consumption of RB or glucose-based beverage ( $p=0.036$ ,  $p=0.024$ ,  $p<0.001$  and  $p<0.001$ , respectively) (Supplemental Table 6 and Supplemental Figure 1B). Besides, the increase of insulin was significantly different depending on the type of drink that was consumed ( $p=0.012$ , Table 2), indicating that the higher increase of insulin occurred after the consumption of RB and glucose-based beverage (Figure 2B).

The AUCs of GIP produced after the consumption of MB and IMB were remarkably much smaller than those produced after the consumption of RB and glucose-based beverage ( $p<0.001$  in all comparisons, Supplemental Table 6 and Supplemental Figure 1C). In the same line, increases of GIP were significantly lower after the ingestion of MB or IMB than after the consumption of glucose-based beverage or RB ( $p<0.001$ , Table 2 and Figure 2C).

Regarding to the AUCs of GLP-1, the consumption of glucose-based beverage produced significantly lower AUC than those produced after the consumption of the three alcohol-free beers ( $p<0.001$ , Supplemental Table 6 and Supplemental Figure 1D). However, increases of GLP-1 did not significantly differ among alcohol-free beers (Table 2 and Figure 2D).



**Figure 2.** Increase of Glucose (A), Insulin (B), GIP (C) and GLP-1 (D) over time depending on the type of drink consumed in study 1.

CH stands for carbohydrates; IMB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with isomaltulose (2.5 g/100 mL) and a resistant maltodextrin (0.8 g/100 mL); MB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with maltodextrin (2.0 g/100 mL); RB: regular alcohol-free beer; GIP: Gastric Inhibitory Polypeptide; GLP-1: Glucagon-Like Peptide 1.

### 3.3.2 Study 2

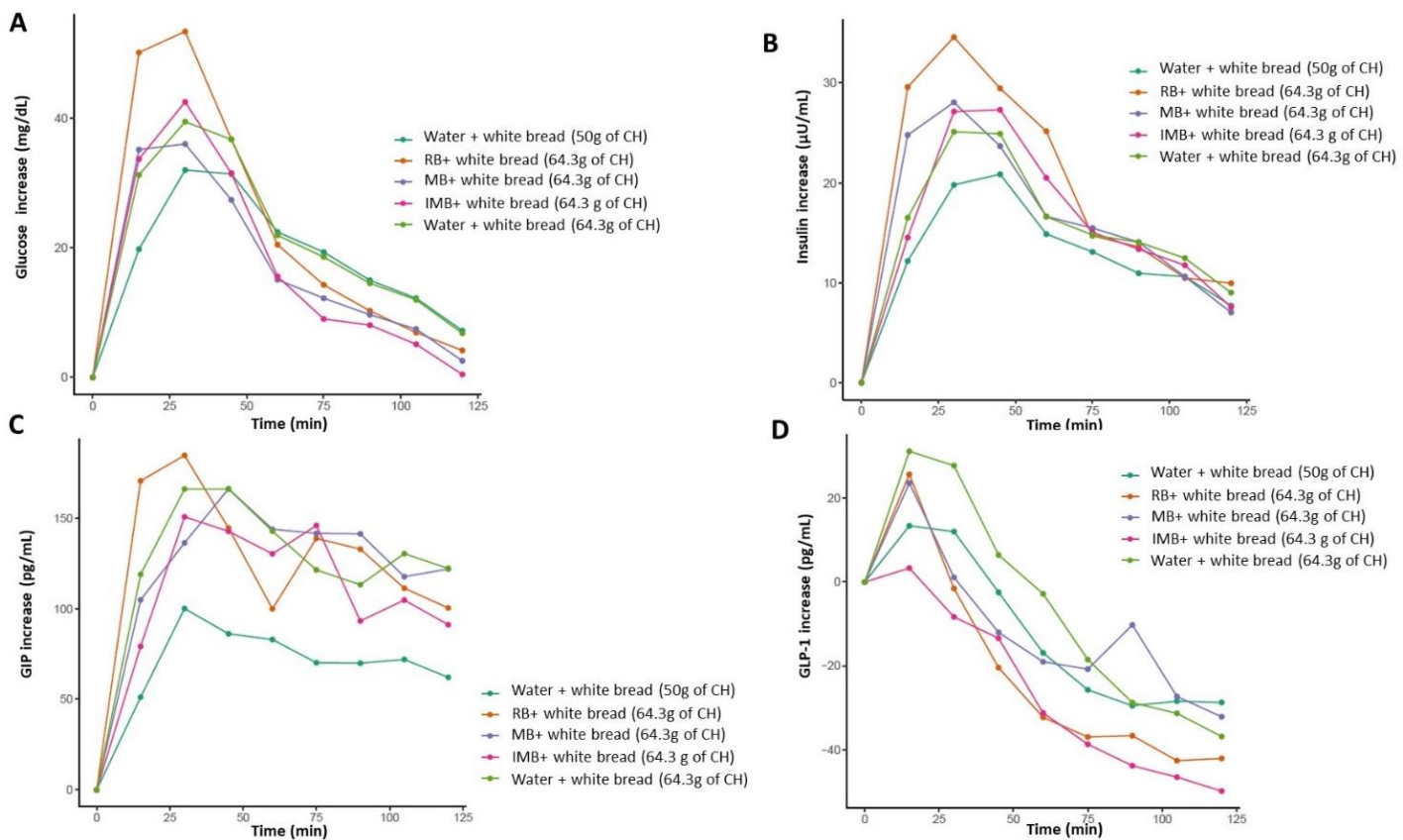
The lowest AUC of glucose concentration was produced after the consumption of MB with white bread. In fact, the consumption of 64.3g of carbohydrates, coming from MB plus white bread, generated significantly lower AUC of glucose than that produced after the consumption of the same amount of CH, all of them coming from white bread ( $p=0.012$ ). Besides, AUCs of glucose after the consumption of MB or IMB with white bread were significantly lower than that produced after consumption of RB plus white bread ( $p=0.006$  and  $p<0.001$  respectively, Supplemental Table 7 and Supplemental Figure 2A). Moreover, the increase in glucose after each meal intake, was significantly different depending on the drink that was consumed ( $p=0.002$ , Table 2). The highest increase in glucose concentration was produced after the consumption of RB with white bread (Figure 3A).

The AUCs of insulin produced after the consumption of RB plus white bread was significantly higher than that produced after the ingestion of the same amount of CH, coming all of them from white bread ( $p=0.043$ ). However, the consumption of MB or IMB with white bread did not lead to significant differences in the AUCs of insulin concentration compared to that produced after the ingestion of the same amount of CH, coming all of them from white bread ( $p=0.128$  and  $p=0.554$ , respectively). Besides, the consumption of MB plus white bread produced significantly lower AUC of insulin than that produced after the ingestion of RB combined with bread white ( $p=0.028$ , Supplemental Table 7 and Supplemental Figure 2B). The increase of insulin was not significantly different depending on the ingested drink ( $p=0.124$ , Table 2). Nevertheless, the highest increase of insulin was produced after the consumption of RB combined with white bread (Figure 3B).

The significantly lower AUC of GIP was observed after the ingestion of water with 50 g of CH coming from white bread. However, with the same amount of CH, only the RB combined with white bread produced significantly higher AUC of GIP than that produced after the consumption of white bread, without significant differences in the comparison with IMB or MB plus white bread ( $p=0.019$ ,  $p=0.857$  and  $p=0.540$ , respectively). The higher AUC of GIP was produced after the ingestion of RB combined with white bread. Besides, the AUC of GIP produced after the consumption of IMB with white bread was significantly lower than that produced after the ingestion of RB plus white bread ( $p=0.046$ , Supplemental Table 7 and Supplemental Figure 2C). The increase of GIP was significantly different depending on the drink ingested ( $p = 0.011$ , Table 2). The highest increase of GIP was produced after the consumption of RB combined with white bread, while the lower increase was produced after the ingestion of 50g of CH (Figure 3B).

The lowest AUC of GLP-1 was observed after the ingestion of water with 50g of CH coming from white bread. Among alcohol-free beers, significant differences were observed only between the consumption of IMB and white bread, which produced significantly lower AUC of GLP-1 than that produced after the intake of RB with white bread ( $p=0.028$ , Supplemental Table 7 and Supplemental Figure 2D). Although there was not significant difference in the increase of GLP-1 depending on the ingested drink ( $p=0.058$ ), the lowest increase of GLP-1 was produced after the ingestion of IMB with white bread, while the highest increase was produced after the ingestion of the same amount of CH, all of them coming from white bread (Table 2 and Figure 3D).





**Figure 3.** Increase of Glucose (A), Insulin (B), GIP (C) and GLP-1 (D) over time depending on the type of drink consumed in study 2.

CH stands for carbohydrates; IMB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with isomaltulose (2.5 g/100 mL) and a resistant maltodextrin (0.8 g/100 mL); MB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with maltodextrin (2.0 g/100 mL); RB: regular alcohol-free beer; GIP: Gastric Inhibitory Polypeptide; GLP-1: Glucagon-Like Peptide 1.

322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329

**Table 2.** Maximum increase of glucose, insulin, GIP and GLP-1 produced after the consumption of each drink/meal in both studies.

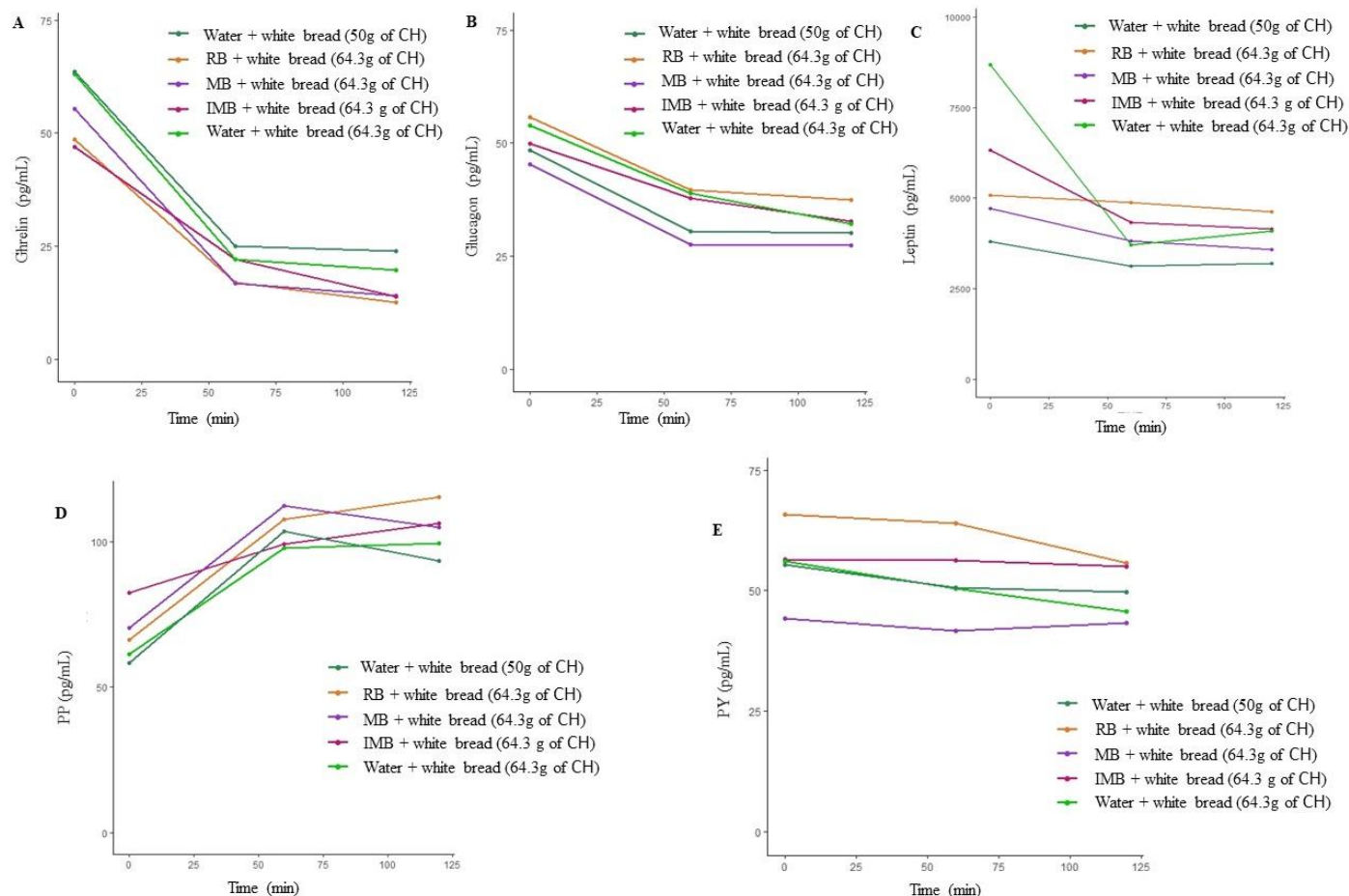
	Study 1				<i>p</i>	Study 2					<i>p</i>
	Regular alcohol-free beer (RB) (25g of CH)	Alcohol-free beer with isomaltulose and resistant maltodextrin (IMB) (25g of CH)	Alcohol-free beer with resistant maltodextrin (MB) (25g of CH)	Glucose solution (25g of CH)		RB + 50g of CH from white bread (64.3g of CH)	IMB + 50g of CH from white bread (64.3g of CH)	MB + 50g of CH from white bread (64.3g of CH)	Water+ 50g of CH from white bread (50g of CH)	Water + 64.3 g of CH from white bread (64.3g of CH)	
Glucose variation, mg/dL	60.4 ± 24.1	33.7 ± 14.2*	34.7 ± 19.1*	58.0 ± 20.0	<b>0.005</b>	58.3 ± 14.9	44.7 ± 9.83*	41.1 ± 10.8*	41.2 ± 13.2	48.1 ± 14.8	<b>0.002</b>
Insulin variation, mg/dL	22.2 ± 12.2	12.1 ± 4.31*	14.8 ± 8.6 <sup>+</sup>	18.8 ± 7.48	<b>0.012</b>	40.1 ± 17.8	31.1 ± 11.7 <sup>+</sup>	35.9 ± 19.4	27.7 ± 14.9	30.5 ± 11.4	0.124
GIP variation, pg/mL	128 ± 62.3	18.9 ± 23.8*	34.6 ± 22.1*	168 ± 112	<b>&lt;0.001</b>	229 ± 134	240 ± 189	229 ± 194	126 ± 41.4	216 ± 185	<b>0.011</b>
GLP1 variation, pg/mL	17.9 ± 23.7	3.27 ± 33.0	1.67 ± 33.7	13.9 ± 35.0	0.529	27.0 ± 47.3	13.3 ± 33.7	28.8 ± 29.0	21.3 ± 30.9	46.6 ± 45.1	0.058

<sup>1</sup>Maximum increase of each analyte was calculated as the difference between the maximum value reached over 120 minutes and the baseline value. Quantitative variables were expressed as mean ± standard deviation. CH stands for carbohydrates; IMB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with isomaltulose (2.5 g/100 mL) and a resistant maltodextrin (0.8 g/100 mL); MB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with maltodextrin (2.0 g/100 mL); RB: regular alcohol-free beer.

<sup>2</sup>The *p*-value was calculated by Kruskal-Wallis test. \* Denotes *p*<0.05 and <sup>+</sup>denotes *p*<0.090 comparing IMB vs. RB or MB vs RB, as applicable, calculated by t-test.

3.4. Hormones related to appetite and satiety

Glucagon, leptin, ghrelin, PY and PP were analyzed only in the second study at baseline, 60 and 120 minutes. These metabolites did not show significant differences after the consumption of each drink combined with white bread ( $p=0.988$ ,  $p=0.723$ ,  $p=0.924$ ,  $p=0.992$  and  $p=0.982$ , respectively). Interestingly, there were not significant differences in these hormones related to appetite and satiety despite the different CH consumption (Table 3 and Figure 4).



**Figure 4.** Ghrelin, glucagon, Leptin, PP and PY over time depending on the type of drink consumed in study 2.

CH stands for carbohydrates; IMB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with isomaltulose (2.5 g/100 mL) and a resistant maltodextrin (0.8 g/100 mL); MB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with maltodextrin (2.0 g/100 mL); RB: regular alcohol-free beer; PY: peptide Y; PP: pancreatic polypeptide.

3.5. Hormones related to appetite and satiety

3.5.1 Study 1

The AUC and the increase of TG concentration after the intake of different alcohol-free beers and glucose-based beverage did not significantly differ ( $p=0.436$ , Supplemental Figure 3A). In the same line, NEFAs concentration did not show significant differences after the ingestion of each drink, showing similar AUCs and increases from baseline (Supplemental Figure 3B).

## 3.5.2 Study 2

23

Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, TG and NEFAs concentrations did not significantly change after the consumption of different drinks with white bread.

24

25

Besides, the increase in TG did not significantly differ after the intake of each drink combined with white bread ( $p=0.812$ , Supplemental Figure 4).

26

27

**Table 3.** Maximum increase of ghrelin, glucagon, leptin, PP and PY produced after the consumption of each drink/meal in study 2.

28

29

<b>GHRELIN</b>	<b>Baseline</b>	<b>60 minutes</b>	<b>120 minutes</b>	<b><math>p^2</math></b>
RB + white bread (64.3g of CH)	49.3 (16.2 – 64.3)	11.8 (10.4 – 18.4)	11.6 (10.6 – 13.0)	
IMB + white bread (64.3g of CH)	48.8 (31.3 – 84.3)	13.0 (12.1– 17.3)	13.0 (10.6 – 13.8)	
MB + white bread (64.3g of CH)	36.6 (23.9 – 65.3)	13.7 (11.8 – 27.3)	13.0 (11.5 – 16.4)	0.942
Water + white bread (64.3g of CH)	57.8 (19.2 – 90.3)	12.6 (10.6 – 17.9)	13.0 (10.6 – 17.2)	
Water+ white bread (50g of CH)	51.4 (20.6 – 74.7)	17.9 (12.9 – 34.0)	13.0 (11.0 – 33.3)	
<b>GLUCAGON</b>	<b>Baseline</b>	<b>60 minutes</b>	<b>120 minutes</b>	<b><math>p^2</math></b>
RB + white bread (64.3g of CH)	53.0 (44.1 – 60.0)	37.5 (24.4 – 53.2)	33.4 (19.6 – 47.2)	
IMB + white bread (64.3g of CH)	43.9 (36.1 – 57.8)	23.0 (16.8 – 35.7)	24.9 (15.0 – 37.4)	
MB + white bread (64.3g of CH)	47.6 (38.2 – 62.5)	34.0 (27.1 – 47.5)	33.6 (18.1 – 40.3)	0.988
Water + white bread (64.3g of CH)	46.9 (36.9 – 61.5)	31.5 (23.4 – 53.4)	30.3 (20.6 – 39.2)	
Water+ white bread (50g of CH)	45.9 (36.4 – 54.5)	28.4 (19.1 – 42.9)	29.7 (15.0 – 39.5)	
<b>LEPTIN</b>	<b>Baseline</b>	<b>60 minutes</b>	<b>120 minutes</b>	<b><math>p^2</math></b>
RB + white bread (64.3g of CH)	3684 (1386 – 6801)	2714 (1243 – 6057)	3079 (1145 – 5408)	
IMB + white bread (64.3g of CH)	2732 (980 – 5038)	2195 (824 – 4047)	2066 (819– 3804)	
MB + white bread (64.3g of CH)	3101 (1150 – 6119)	2450 (1178 – 4567)	2414 (1056 – 4389)	0.723
Water + white bread (64.3g of CH)	2576 (1372 – 7047)	2030 (1087 – 5380)	2281 (1033 – 6204)	
Water+ white bread (50g of CH)	2030 (1374 – 4289)	1977 (1177 – 3609)	1861 (1056 – 3533)	
<b>PP</b>	<b>Baseline</b>	<b>60 minutes</b>	<b>120 minutes</b>	<b><math>p^2</math></b>
RB + white bread (64.3g of CH)	47.1 (31.4 – 65.7)	79.9 (65.7 – 105)	83.8 (57.4 – 132)	
IMB + white bread (64.3g of CH)	47.2 (23.5 – 56.7)	82.0 (52.8 – 122)	71.0 (39.2 – 120)	
MB + white bread (64.3g of CH)	49.5 (37.1 – 88.6)	76.8 (46.3 – 127)	94.7 (47.4 – 114)	
Water + white bread (64.3g of CH)	43.8 (35.5 – 58.7)	70.2 (47.8 – 110)	78.3 (63.4 – 112)	
Water+ white bread (50g of CH)	36.0 (30.2 – 55.3)	84.3 (41.7 – 117)	65.6 (38.4 – 99.5)	
<b>PY</b>	<b>Baseline</b>	<b>60 minutes</b>	<b>120 minutes</b>	<b><math>p^2</math></b>
RB + white bread (64.3g of CH)	13.0 (13.0 – 93.2)	30.0 (13.0 – 85.5)	13.0 (13.0 – 78.9)	

IMB + white bread (64.3g of CH)	13.0 (13.0 – 58.9)	13.0 (13.0 – 51.1)	13.0 (13.0 – 58.4)
MB + white bread (64.3g of CH)	13.0 (13.0 – 97.2)	13.0 (13.0 – 106)	13.0 (13.0 – 101)
Water + white bread (64.3g of CH)	13.0 (13.0 – 97.8)	20.5 (13.0 – 69.8)	13.0 (13.0 – 62.5)
Water+ white bread (50g of CH)	26.8 (13.0 – 99.3)	13.0 (13.0 – 102)	13.0 (13.0 – 88.3)

Maximum increase of each analyte was calculated as the difference between the maximum value reached over 120 minutes and the baseline value. Quantitative variables are expressed as median (25th percentile - 75th percentile). CH stands for carbohydrates; IMB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with isomaltulose (2.5 g/100 mL) and a resistant maltodextrin (0.8 g/100 mL); MB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with maltodextrin (2.0 g/100 mL); RB: regular alcohol-free beer; PY: peptide Y; PP: pancreatic polypeptide.

<sup>‡</sup>The p-value was calculated by Kruskal-Wallis test.

#### 4. Discussion

The main findings of the study 1 include: a) the consumption of an alcohol free-beer in which regular CH have been almost completely fermented and enriched with isomaltulose and a resistant maltodextrin induced lower glucose and insulin peak than a regular alcohol-free beer; b) this effect was analogous after consumption of a similar alcohol-free beer containing the double dose of the resistant maltodextrin but not isomaltulose; c) these effects were also observed in GIP variation. The study 2 findings showed: a) consuming 50 g of CH coming from white bread and an alcohol-free beer in which regular CH have been almost completely fermented and enriched with isomaltulose and a resistant maltodextrin induced the same glucose and insulin peak than the intake of 50 g of CH coming from white bread plus water b) this effect was analogous after the consumption of a similar alcohol-free beer containing the double dose of the resistant maltodextrin but not isomaltulose and white bread; c) both modified alcohol-free beers produced lower glucose, insulin and GIP rises that the intake of regular alcohol-free beer. Thus, the consumption of an alcohol-free beer -including regular CH fermentation and adding isomaltulose and a resistant maltodextrin- can effectively impact and improve the postprandial effect of a meal. This effect would be one of the main mechanisms responsible for the findings of a previous research in which the intake of this alcohol-free beer with meals demonstrated to improve insulin resistance in subjects with T2DM and overweight or obesity. Therefore, this research could add evidence to the fact that small changes in dietary composition can modify postprandial response and potential clinical benefit.

Different studies have reported that isomaltulose has positive effects on glucose metabolism, decreasing glucose and insulin levels in overweight, obese and subjects with TD2M [18–22]. Henry et al [23] reported, in one randomized double-blind, controlled and cross-over design including 20 men, that the consumption of a controlled diet combined with isomaltulose reduced the glycemic response and variability versus the combination of the same controlled diet with sucrose. In the same way, Okuno et al [24] showed in 50 sedentary adults that the supplementation with 40 g/day of isomaltulose got significant reduction of insulin resistance after 12 weeks. Nevertheless, the effect of this CH in subjects with TD2M has been less studied and the results are contradictory. For example, Brunner et al [25] showed in T2DM subjects that the supplementation with 50g/day of isomaltulose did not produce significant changes in HbA1c after 12 weeks-intervention. In contrast, another study including 11 participants with TD2M showed that the ingestion of 1 g/kg-isomaltulose attenuated postprandial hyperglycemia, reducing the mean plasma concentrations of insulin, C-peptide, glucagon, and glucose-dependent insulinotropic peptide by 10-23% in comparison with sucrose [26]. The mechanisms underlying the benefit of isomaltulose on insulin sensitivity are not completely elucidated. Kawaguchi et al demonstrated that the consumption of 20 g of isomaltulose improved insulin resistance in

5 patients with non-alcoholic fatty liver disease. They also reported that this benefit was directly associated with metabolomic changes in bile acid, fatty acid, glycine/serine, and alterations in L-arginine and L-ornithine concentrations [27]. All these factors have been previously linked to insulin signaling pathways. To our knowledge, our study is the first one exploring the postprandial effects of relatively low doses of isomaltulose and the results show that this disaccharide leads to a better postprandial glycemia than the conventional CH usually contained in beer, mainly starch and oligosaccharides like maltose or maltotriose. A synergistic effect of isomaltulose with the resistant dextrin should be considered when interpreting the better glycemic response after the consumption of the modified alcohol-free beer.

Different randomized controlled trials have demonstrated that resistant dextrin supplementation can modulate inflammation, improve insulin resistance and have beneficial effects on mental health, and immune system response in women with T2DM [14,28]. In this sense, Li et al [22] demonstrated that the ingestion of 17g of resistant dextrin lead to a 18% decrease in insulin concentration in healthy subjects, which was statistically significant when comparing to control group. In the same way, other study reported a significant 22.8% decrease in insulin, 24.9% in HOMA-IR, 0.6% in glucose and 9.6% in HbA1c concentrations in 55 women with T2DM who consumed 10 g of resistant dextrin for 8 weeks [14]. Although the mechanisms responsible for these potential benefits for this dietary fiber are not entirely known, our group has previously demonstrated that the consumption of the alcohol-free beer with almost complete fermentation of CH and the addition of isomaltulose and a resistant dextrin significantly impacted gut microbiota in diabetic subjects with overweight or obesity, producing a significant decrease of the genus *Parabacteroides* [29]. This bacterial genus is found in lower prevalence in patients with obesity and different metabolic diseases and has been demonstrated to increase with Mediterranean diet [30]. Other researchers speculate that the prebiotic supplementation favors the differentiation of L-cells, which promote secretion of digestive hormones like GLP-1, PY or GIP, among others [31].

GIP and GLP-1 are incretin hormones secreted from intestinal K-cells and intestinal endocrine L-cells, respectively, after the ingestion of rich-fat and high-CH diet. Secretion of GLP-1 and GIP have actions in different organs, such as, pancreas, stomach, heart, brain and liver, among others. In the pancreas, GLP-1 and GIP have analogous actions, producing an increase of insulin biosynthesis and secretion, and decreasing apoptosis of  $\beta$ -cell [32]. As we hypothesized, the study 1 showed that the consumption of modified alcohol-free beers, enriched in isomaltulose and resistant dextrin, produced a lower carbohydrate overload, which in response produced a lower peak of insulin and incretin hormones compared to standard alcohol-free beer. In the same way, the study 2 demonstrated that the consumption of IMB with white bread produced lower peak of glucose, and consequently lower increases of insulin, GIP and GLP-1 than the consumption of white bread with standard alcohol-free beer. As previously stated by other research, it seems that delaying the absorption rate of CH will influence GLP-1 and GIP release. These results are in agreement with that of Keyhani-Nejah et al [33], who reported in a randomized crossover study with 35 subjects (15 healthy, 10 prediabetic and 10 T2DM), that the ingestion of 50 g of CH coming from isomaltulose produced significantly lower peak of glucose, insulin and lower AUC of GIP. Another randomized controlled trial included 16 subjects with TD2M, who ingested 25g of CH coming from three different solutions: a standard solution, a; solution with resistant maltodextrin and sucromalt and another one with lactose, isomaltulose, and resistant starch). Authors reported that the consumption of the solution containing isomaltulose produced lower peak of GLP-1[34]. These authors reported that higher increase of GIP was produced after the consumption of standard solution and the solution with isomaltulose. Nevertheless, it is important to highlight that the solution containing isomaltulose also had lactose, although the percentage of each CH contained in the solution was not reported.

None of the assessed interventions altered serum postprandial ghrelin, leptin, glucagon, pancreatic polypeptide, peptide Y, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, TG, or NEFAs concentrations during the 2-h study period. These findings are not in agreement with our previous study, in which participants reported higher satiety scores during the period of drinking the alcohol-free beer with CH modified composition, when compared to regular alcohol-free beer period [11]. The lack of a postprandial acute effect of these alcohol-free beers consumption in satiety hormones would not completely dismiss a mid-term effect. It is well established that gut microbiome has an essential role in satiety and appetite regulation [35]. If the effect of the resistant dextrin on gut microbiome could influence the satiety regulation should be explored in the future to elucidate this issue. It is also important to note that in our previous study, the satiety assessment was performed by visual analogic scales which are a subjective tool. The absence of lipids concentration change is consistent with previously reported findings [36,37].

Our study has some limitations worth mentioning. The relatively small sample size could have limited the significance of the acute effect of each type of alcohol-free beer in some outcomes and the extrapolation of findings. However, the sample size was calculated based on previous studies involving isomaltulose and resistant dextrin supplementation, having similar or even smaller sample size [34].

## 5. Conclusions

Two major conclusions could be extrapolated from this study. Firstly, the consumption of alcohol-free beers with almost complete fermentation of regular CH and enriched with isomaltulose (2.5 g/100 mL) and resistant maltodextrin (0.8g/100 mL) or enriched exclusively with resistant maltodextrin (2.0g/100 mL) produced a lower peak of glucose, insulin and incretin hormones than the consumption of regular alcohol-free beer. Secondly, the consumption of the modified alcohol-free beer enriched with isomaltulose and resistant dextrin together with white bread, generates a lower glucose peak than the consumption of the same quantity of CH, coming entirely from white bread. This would demonstrate that this modified alcohol-free beer could sustainably influence and improve glycemic postprandial effect of a meal. This could turn in a clinical benefit in glycemic metabolism in subjects with T2DM, as previously demonstrated by our group, by increasing the evidence that small changes in nutritional composition are a cornerstone when improving glycemic disorders management or its prevention.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Figure S1: Glucose, insulin, GIP and GLP-1 over time depending on the type of drink consumed in study 1. CH stands for carbohydrates; IMB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with isomaltulose (2.5 g/100 mL) and a resistant maltodextrin (0.8 g/100 mL); MB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with maltodextrin (2.0 g/100 mL); RB: regular alcohol-free beer; GIP: Gastric Inhibitory Polypeptide; GLP-1: Glucagon-Like Peptide 1; Figure S2: Glucose, insulin, GIP and GLP-1 over time depending on the type of drink consumed in study 2. CH stands for carbohydrates; IMB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with isomaltulose (2.5 g/100 mL) and a resistant maltodextrin (0.8 g/100 mL); MB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with maltodextrin (2.0 g/100 mL); Figure S3: Lipid metabolism parameters determined in the study 1. IMB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with isomaltulose (2.5 g/100 mL) and a resistant maltodextrin (0.8 g/100 mL); MB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with maltodextrin (2.0 g/100 mL); RB: regular alcohol-free beer; NEFAs: non-esterified fatty acids RB: regular alcohol-free beer; GIP: Gastric Inhibitory Polypeptide; GLP-1: Glucagon-Like Peptide 1; Figure S4: Lipid metabolism parameters determined in the study 2. CH stands for carbohydrates; IMB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with isomaltulose (2.5 g/100 mL) and a resistant maltodextrin (0.8 g/100 mL); MB: alcohol-free beer with almost complete fermentation of regular CH and enriched with maltodextrin (2.0 g/100 mL); RB: regular alcohol-free beer; NEFAs: non-esterified fatty acids. Table S1: Nutritional composition of alcohol-free beers used in the study; Table S2: Variation of clinical and anthropometric characteristics of subjects included in study 1; Table S3: Variation of clinical and anthropometric characteristics of subjects included in study 2. Table S4: Dietary characteristics of the three days prior to the consumption of each type of beer in the study 1; Table S5:

Dietary characteristics of the three days prior to the consumption of each type of the intervention in the study 2; Table S6: AUCs of glucose, insulin, GIP and GLP-1 produced after the consumption of each drink in the study 1; Table S7: AUCs of glucose, insulin, GIP and GLP-1 produced after the consumption of each drink/mean in the study 2.

**Author Contributions:** Conceptualization, RMG and ILM.; methodology, IGR, AMB and AFM.; software, ILM, SPC and IGR.; validation, ILM and FC.; formal analysis, SPC, RMG and ILM.; investigation, IGR and ILM.; resources, RMG, AF and APM.; data curation, ILM, SPC, RMG and SFML.; writing—original draft preparation, ILM, RMG and SPC.; writing—review and editing, FC, AF, APM, AFM, IGR AC and AMB.; visualization, AC, FC, AMB and IGR.; supervision, RMG and FC.; project administration, RMG.; funding acquisition, AF and APM. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Grupo Agora - La Zaragozana S.A. It was also partially supported by a grant from the Carlos III Research Institute: CIBERCV (co-supported by the European Regional Development Fund (ERDF), which is allocated by the European Union; IIS16/0114) and Gobierno de Aragón B-14.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Comité de Ética e Investigación Clínica de Aragón (protocol code XXX and date of approval). The study was registered in the Clinical Trial with the number NTC04790877.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

**Data Availability Statement:** The database generated as a result of the systematic review carried out will be fully available to replicate the results that are necessary at the request of the reviewers or editors.

**Acknowledgments:** Authors thank volunteers participating in the both studies)

**Conflicts of Interest:** Authors would like to state that A.F. and A.P.M. work for Grupo Agora - La Zaragozana S.A., which has partially funded the study. They have provided help with logistics and research design but they did not interfere in blind analysis of results.

## References

- Barazzoni, R.; Deutz, N.E.P.; Biolo, G.; Bischoff, S.; Boirie, Y.; Cederholm, T.; Cuerda, C.; Delzenne, N.; Leon Sanz, M.; Ljungqvist, O.; et al. Carbohydrates and Insulin Resistance in Clinical Nutrition: Recommendations from the ESPEN Expert Group. *Clin Nutr* 2017, 36, 355–363, doi:10.1016/j.clnu.2016.09.010.
- Ludwig, D.S.; Hu, F.B.; Tappy, L.; Brand-Miller, J. Dietary Carbohydrates: Role of Quality and Quantity in Chronic Disease. *BMJ* 2018, 361, k2340, doi:10.1136/bmj.k2340.
- Kelly, R.K.; Watling, C.Z.; Tong, T.Y.N.; Piernas, C.; Carter, J.L.; Papier, K.; Key, T.J.; Perez-Cornago, A. Associations Between Macronutrients From Different Dietary Sources and Serum Lipids in 24 639 UK Biobank Study Participants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021, ATVBAHA120315628, doi:10.1161/ATVBAHA.120.315628.
- Hruby, A.; Guasch-Ferré, M.; Bhupathiraju, S.N.; Manson, J.E.; Willett, W.C.; McKeown, N.M.; Hu, F.B. Magnesium Intake, Quality of Carbohydrates, and Risk of Type 2 Diabetes: Results From Three U.S. Cohorts. *Diabetes Care* 2017, 40, 1695–1702, doi:10.2337/dc17-1143.
- Ludwig, D.S. The Glycemic Index: Physiological Mechanisms Relating to Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Disease. *JAMA* 2002, 287, 2414–2423, doi:10.1001/jama.287.18.2414.
- Xu, B.; Fu, J.; Qiao, Y.; Cao, J.; Deehan, E.C.; Li, Z.; Jin, M.; Wang, X.; Wang, Y. Higher Intake of Microbiota-Accessible Carbohydrates and Improved Cardiometabolic Risk Factors: A Meta-Analysis and Umbrella Review of Dietary Management in Patients with Type 2 Diabetes. *Am J Clin Nutr* 2021, 113, 1515–1530, doi:10.1093/ajcn/nqaa435.
- Mozaffarian, D. Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity: A Comprehensive Review. *Circulation* 2016, 133, 187–225, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018585.
- Jenkins, D.J.A.; Dehghan, M.; Mente, A.; Bangdiwala, S.I.; Rangarajan, S.; Srichaikul, K.; Mohan, V.; Avezum, A.; Díaz, R.; Rosengren, A.; et al. Glycemic Index, Glycemic Load, and Cardiovascular Disease and Mortality. *New England Journal of Medicine* 2021, 384, 1312–1322, doi:10.1056/NEJMoa2007123.
- Zafar, M.I.; Mills, K.E.; Zheng, J.; Regmi, A.; Hu, S.Q.; Gou, L.; Chen, L.-L. Low-Glycemic Index Diets as an Intervention for Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Clin Nutr* 2019, 110, 891–902, doi:10.1093/ajcn/nqz149.



10. de Gaetano, G.; Costanzo, S.; Di Castelnuovo, A.; Badimon, L.; Bejko, D.; Alkerwi, A.; Chiva-Blanch, G.; Estruch, R.; La Vecchia, C.; Panico, S.; et al. Effects of Moderate Beer Consumption on Health and Disease: A Consensus Document. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2016, 26, 443–467, doi:10.1016/j.numecd.2016.03.007. 237–239
11. Mateo-Gallego, R.; Pérez-Calahorra, S.; Lamiquiz-Moneo, I.; Marco-Benedí, V.; Bea, A.M.; Fumanal, A.J.; Prieto-Martín, A.; Laclaustra, M.; Cenarro, A.; Civeira, F. Effect of an Alcohol-Free Beer Enriched with Isomaltulose and a Resistant Dextrin on Insulin Resistance in Diabetic Patients with Overweight or Obesity. *Clin Nutr* 2019, doi:10.1016/j.clnu.2019.02.025. 240–242
12. Maresch, C.C.; Petry, S.F.; Theis, S.; Bosy-Westphal, A.; Linn, T. Low Glycemic Index Prototype Isomaltulose-Update of Clinical Trials. *Nutrients* 2017, 9, doi:10.3390/nu9040381. 243–244
13. Li, S.; Guerin-Deremaux, L.; Pochat, M.; Wils, D.; Reifer, C.; Miller, L.E. NUTRIOSE Dietary Fiber Supplementation Improves Insulin Resistance and Determinants of Metabolic Syndrome in Overweight Men: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Appl Physiol Nutr Metab* 2010, 35, 773–782, doi:10.1139/H10-074. 245–247
14. Aliasgharzadeh, A.; Dehghan, P.; Gargari, B.P.; Asghari-Jafarabadi, M. Resistant Dextrin, as a Prebiotic, Improves Insulin Resistance and Inflammation in Women with Type 2 Diabetes: A Randomised Controlled Clinical Trial. *Br. J. Nutr.* 2015, 113, 321–330, doi:10.1017/S0007114514003675. 248–250
15. Meng, H.; Matthan, N.R.; Ausman, L.M.; Lichtenstein, A.H. Effect of Macronutrients and Fiber on Postprandial Glycemic Responses and Meal Glycemic Index and Glycemic Load Value Determinations. *Am. J. Clin. Nutr.* 2017, 105, 842–853, doi:10.3945/ajcn.116.144162. 251–253
16. Inside My Food | Porque somos lo que comemos. 254
17. Hagströmer, M.; Oja, P.; Sjöström, M. The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ): A Study of Concurrent and Construct Validity. *Public Health Nutr* 2006, 9, 755–762, doi:10.1079/phn2005898. 255–256
18. König, D.; Theis, S.; Kozianowski, G.; Berg, A. Postprandial Substrate Use in Overweight Subjects with the Metabolic Syndrome after Isomaltulose (Palatinose™) Ingestion. *Nutrition* 2012, 28, 651–656, doi:10.1016/j.nut.2011.09.019. 257–258
19. Takeda, E.; Yamanaka-Okumura, H.; Taketani, Y.; Inagaki, N.; Hosokawa, M.; Shide, K.; Maegawa, H.; Kondo, K.; Kawasaki, E.; Shinozaki, S.; et al. Effect of Nutritional Counseling and Long Term Isomaltulose Based Liquid Formula (MHN-01) Intake on Metabolic Syndrome. *J Clin Biochem Nutr* 2015, 57, 140–144, doi:10.3164/jcfn.14-132. 259–261
20. Khera, A.V.; Won, H.-H.; Peloso, G.M.; Lawson, K.S.; Bartz, T.M.; Deng, X.; van Leeuwen, E.M.; Natarajan, P.; Emdin, C.A.; Bick, A.G.; et al. Diagnostic Yield and Clinical Utility of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients With Severe Hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016, 67, 2578–2589, doi:10.1016/j.jacc.2016.03.520. 262–264
21. van Can, J.G.P.; Ijzerman, T.H.; van Loon, L.J.C.; Brouns, F.; Blaak, E.E. Reduced Glycaemic and Insulinaemic Responses Following Isomaltulose Ingestion: Implications for Postprandial Substrate Use. *Br J Nutr* 2009, 102, 1408–1413, doi:10.1017/S0007114509990687. 265–267
22. Li, S.; Guerin-Deremaux, L.; Pochat, M.; Wils, D.; Reifer, C.; Miller, L.E. NUTRIOSE Dietary Fiber Supplementation Improves Insulin Resistance and Determinants of Metabolic Syndrome in Overweight Men: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Appl Physiol Nutr Metab* 2010, 35, 773–782, doi:10.1139/H10-074. 268–270
23. Henry, C.J.; Kaur, B.; Quek, R.Y.C.; Camps, S.G. A Low Glycaemic Index Diet Incorporating Isomaltulose Is Associated with Lower Glycaemic Response and Variability, and Promotes Fat Oxidation in Asians. *Nutrients* 2017, 9, E473, doi:10.3390/nu9050473. 271–273
24. Okuno, M.; Kim, M.-K.; Mizu, M.; Mori, M.; Mori, H.; Yamori, Y. Palatinose-Blended Sugar Compared with Sucrose: Different Effects on Insulin Sensitivity after 12 Weeks Supplementation in Sedentary Adults. *Int J Food Sci Nutr* 2010, 61, 643–651, doi:10.3109/09637481003694576. 274–276
25. Brunner, S.; Holub, I.; Theis, S.; Gostner, A.; Melcher, R.; Wolf, P.; Amann-Gassner, U.; Scheppach, W.; Hauner, H. Metabolic Effects of Replacing Sucrose by Isomaltulose in Subjects with Type 2 Diabetes: A Randomized Double-Blind Trial. *Diabetes Care* 2012, 35, 1249–1251, doi:10.2337/dc11-1485. 277–279
26. Ang, M.; Linn, T. Comparison of the Effects of Slowly and Rapidly Absorbed Carbohydrates on Postprandial Glucose Metabolism in Type 2 Diabetes Mellitus Patients: A Randomized Trial. *Am J Clin Nutr* 2014, 100, 1059–1068, doi:10.3945/ajcn.113.076638. 280–282
27. Kawaguchi, T.; Nakano, D.; Oriishi, T.; Torimura, T. Effects of Isomaltulose on Insulin Resistance and Metabolites in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Metabolomic Analysis. *Mol Med Rep* 2018, 18, 2033–2042, doi:10.3892/mmr.2018.9223. 283–285
28. Farhangi, M.A.; Javid, A.Z.; Sarmadi, B.; Karimi, P.; Dehghan, P. A Randomized Controlled Trial on the Efficacy of Resistant Dextrin, as Functional Food, in Women with Type 2 Diabetes: Targeting the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Immune System. *Clin Nutr* 2018, 37, 1216–1223, doi:10.1016/j.clnu.2017.06.005. 286–288
29. Mateo-Gallego, R.; Moreno-Indias, I.; Bea, A.M.; Sánchez-Alcoholado, L.; Fumanal, A.J.; Quesada-Molina, M.; Prieto-Martín, A.; Gutiérrez-Repiso, C.; Civeira, F.; Tinahones, F.J. An Alcohol-Free Beer Enriched with Isomaltulose and a Resistant Dextrin Modulates Gut Microbiome in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus and Overweight or Obesity: A Pilot Study. *Food Funct* 2021, 12, 3635–3646, doi:10.1039/d0fo03160g. 289–292
30. Haro, C.; Garcia-Carpintero, S.; Alcalá-Díaz, J.F.; Gomez-Delgado, F.; Delgado-Lista, J.; Perez-Martinez, P.; Rangel Zuñiga, O.A.; Quintana-Navarro, G.M.; Landa, B.B.; Clemente, J.C.; et al. The Gut Microbial Community in Metabolic Syndrome Patients Is Modified by Diet. *J Nutr Biochem* 2016, 27, 27–31, doi:10.1016/j.jnutbio.2015.08.011. 293–295

31. Cani, P.D.; Lecourt, E.; Dewulf, E.M.; Sohet, F.M.; Pachikian, B.D.; Naslain, D.; De Backer, F.; Neyrinck, A.M.; Delzenne, N.M. Gut Microbiota Fermentation of Prebiotics Increases Satiety and Incretin Gut Peptide Production with Consequences for Appetite Sensation and Glucose Response after a Meal. *Am J Clin Nutr* 2009, 90, 1236–1243, doi:10.3945/ajcn.2009.28095. 296  
297  
298  
299
32. Baggio, L.L.; Drucker, D.J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007, 132, 2131–2157, doi:10.1053/j.gastro.2007.03.054. 300  
301
33. Keyhani-Nejad, F.; Barbosa Yanez, R.L.; Kemper, M.; Schueler, R.; Pivovarova-Ramich, O.; Rudovich, N.; Pfeiffer, A.F.H. Endogenously Released GIP Reduces and GLP-1 Increases Hepatic Insulin Extraction. *Peptides* 2020, 125, 170231, doi:10.1016/j.peptides.2019.170231. 302  
303  
304
34. Angarita Dávila, L.; Bermúdez, V.; Aparicio, D.; Céspedes, V.; Escobar, M.C.; Durán-Agüero, S.; Cisternas, S.; de Assis Costa, J.; Rojas-Gómez, D.; Reyna, N.; et al. Effect of Oral Nutritional Supplements with Sucromalt and Isomaltulose versus Standard Formula on Glycaemic Index, Entero-Insular Axis Peptides and Subjective Appetite in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomised Cross-Over Study. *Nutrients* 2019, 11, E1477, doi:10.3390/nu11071477. 305  
306  
307  
308
35. Torres-Fuentes, C.; Schellekens, H.; Dinan, T.G.; Cryan, J.F. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Obesity. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017, 2, 747–756, doi:10.1016/S2468-1253(17)30147-4. 309  
310
36. Vega-López, S.; Ausman, L.M.; Matthan, N.R.; Lichtenstein, A.H. Postprandial Lipid Responses to Standard Carbohydrates Used to Determine Glycaemic Index Values. *Br J Nutr* 2013, 110, 1782–1788, doi:10.1017/S000711451300130X. 311  
312
37. Turner, K.M.; Keogh, J.B.; Clifton, P.M. Acute Effect of Red Meat and Dairy on Glucose and Insulin: A Randomized Cross-over Study. *Am J Clin Nutr* 2016, 103, 71–76, doi:10.3945/ajcn.115.123505. 313  
314

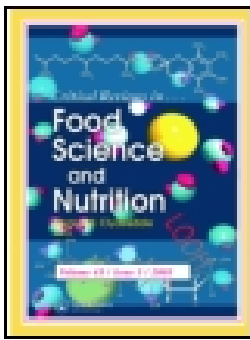
# **ARTÍCULOS COMPLEMENTARIOS**



**Publicaciones complementarias durante el periodo de tesis**

Los siguientes trabajos complementarios se engloban en el área temática de la tesis y contribuyen al trabajo durante el periodo de la misma.

	<b>Referencia Bibliográfica</b>	<b>Área Temática</b>	<b>Factor de Impacto</b>	<b>Aportación del doctorado</b>
<b>Artículo 1</b>	Lamiquiz-Moneo I, Giné-González J, Alisente S, Bea AM, <b><u>Pérez-Calahorra S</u></b> , Marco-Benedí V, Baila-Rueda L, Jarauta E, Cenarro A, Civeira F, Mateo-Gallego R. Effect of bergamot on lipid profile in humans: A systematic review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2020;60(18):3133-3143. doi: 10.1080/10408398.2019.1677554.	Dislipemias; Alimentos funcionales; Nutrición y Dietética	<b>11,176</b>	Elaboración diseño estudio; Recogida de datos; Análisis de resultados; Colaboración en la elaboración de manuscrito
<b>Artículo 2</b>	Marco-Benedí V, <b><u>Pérez-Calahorra S</u></b> , Bea AM, Lamiquiz-Moneo I, Baila-Rueda L, Cenarro A, Civeira F, Mateo-Gallego R. High-protein energy-restricted diets induce greater improvement in glucose homeostasis but not in adipokines comparing to standard-protein diets in early-onset diabetic adults with overweight or obesity. Clin Nutr. 2020 May;39(5):1354-1363. doi: 10.1016/j.clnu.2019.06.005.	Nutrición y Dietética, Obesidad; Diabetes Mellitus tipo 2	<b>7,324</b>	Elaboración diseño estudio; Recogida de datos; Análisis de resultados; Colaboración en la elaboración de manuscrito
<b>Artículo 3</b>	<b><u>Perez-Calahorra S</u></b> , Civeira F, Guallar-Castillón P, Pinto X, Banegas JR, Pedro-Botet J, Suarez-Tembra M, Mauri M, Soler C, Rodriguez-Artalejo F, Laclaustra M. Behavioural cardiovascular risk factors and prevalence of diabetes in subjects with familial hypercholesterolaemia. Eur J Prev Cardiol. 2020 Oct;27(15):1649-1660. doi: 10.1177/2047487319896138.	Enfermedad cardiovascular, Diabetes Mellitus tipo 2; Dislipemias	<b>7,804</b>	Elaboración diseño estudio; Recogida de datos; Análisis de resultados; Elaboración de manuscrito



## Effect of bergamot on lipid profile in humans: A systematic review

Itziar Lamiquiz-Moneo, Jaume Giné-González, Sonsoles Alisente, Ana M. Bea, Sofía Pérez-Calahorra, Victoria Marco-Benedí, Lucía Baila-Rueda, Estíbaliz Jarauta, Ana Cenarro, Fernando Civeira & Rocío Mateo-Gallego

To cite this article: Itziar Lamiquiz-Moneo, Jaume Giné-González, Sonsoles Alisente, Ana M. Bea, Sofía Pérez-Calahorra, Victoria Marco-Benedí, Lucía Baila-Rueda, Estíbaliz Jarauta, Ana Cenarro, Fernando Civeira & Rocío Mateo-Gallego (2019): Effect of bergamot on lipid profile in humans: A systematic review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: [10.1080/10408398.2019.1677554](https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1677554)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1677554>



© 2019 The Author(s). Published with license by Taylor and Francis Group, LLC



Published online: 31 Oct 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 1698



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

## Effect of bergamot on lipid profile in humans: A systematic review

Itziar Lamiquiz-Moneo<sup>a</sup>, Jaume Giné-González<sup>a</sup>, Sonsoles Alisente, Ana M. Bea<sup>a</sup>, Sofía Pérez-Calahorra<sup>a</sup>, Victoria Marco-Benedí<sup>a</sup>, Lucía Baila-Rueda<sup>a</sup>, Estibaliz Jarauta<sup>a</sup>, Ana Cenarro<sup>a</sup>, Fernando Civeira<sup>a,b</sup>, and Rocío Mateo-Gallego<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), CIBERCV, Zaragoza, Spain; <sup>b</sup>Medicina, psiquiatría y dermatología, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain; <sup>c</sup>Fisiatría y Enfermería, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

### ABSTRACT

Dyslipidemia is a well-established modifiable cardiovascular risk. Although statins can reduce LDLc by 50–60%, less than 20% of patients with high risk of CVD achieve LDL targets. The aim of this systematic review is to evaluate the effect of the nutraceutical, bergamot (*Citrus bergamia*), on lipid parameters in humans. PubMed, Embase, Cochrane Library, and Google Scholar databases were searched for interventional and observational studies investigating the effect of bergamot on lipid profile in humans. This systematic review retrieved a total of 442 studies of which 12 articles fulfilled the eligibility criteria and were included in the qualitative synthesis. Based on data, 75% of studies showed a significant decrease in total cholesterol, triglycerides and LDLc. The decrease in total cholesterol varied from 12.3% to 31.3%, from 7.6% to 40.8% in LDLc and from 11.5% to 39.5% in triglycerides. Eight trials reported HDLc increase after intervention with bergamot. Overall, a dose-dependent and possible synergistic effect when administering with statins can be deducted from these trials. It is essential to point out that studies had heterogeneous designs and scientific quality of studies was quite limited. Promising findings reveal an alternative therapeutic option in dyslipidemia management with bergamot supplementation, especially in subjects with statins intolerance.

### KEYWORDS



Bergamot; *Citrus bergamia*; LDL cholesterol; total cholesterol; triglycerides

### Introduction

Dyslipidemia is a well-established modifiable cardiovascular risk factor and its treatment is an essential aim in the prevention of cardiovascular diseases (CVD), which represent the leading cause of death and use of health service in developed countries (Bea et al. 2017). Current guidelines highlights lifestyle intervention as a key issue in the management of patients with hyperlipidemia, but it is often scarce to control the lipid profile (Grundy et al. 2018). Current lipid-lowering therapies, mainly statins with or without ezetimibe, can reduce LDL cholesterol by 50–60% and they are proven to reduce primary and secondary cardiovascular endpoints (Masana et al. 2017). However, less than 20% of patients with high risk of CVD achieve LDL targets and up to 60% of patients refer to some statin intolerance or side effects related to this treatment (Masana et al. 2017; Zhang et al. 2013). This constitutes the main reason for statin discontinuation and poor adherence to treatment that remains a significant problem in dyslipidemia management (Banach et al. 2016). The increasing need to find a nonpharmacological alternative, in particular for patients with moderate hypercholesterolemia, low cardiovascular risk or intolerance to traditional pharmacological treatment, has led to test many phytochemicals as nutraceuticals that have shown

lipid-lowering properties (Johnston et al. 2017). Nutraceuticals are food components that may be used as therapeutic agents due to their beneficial effects on health (Kalra 2003).

Recent studies have shown that Bergamot (*Citrus bergamia*) juice and its flavonoids were able to reduce serum levels of lipids, even improving atherosclerosis through modulating enzymatic activities, antioxidation, antiinflammatory mechanisms and inhibition of monocyte activation and proliferation (Ferlazzo et al. 2016; Benavente-García and Castillo 2008; Ferlazzo et al. 2015; Li et al. 2016). Bergamot is an endemic plant growing in the Calabrian region of Southern Italy with a unique profile of flavonoids and glycosides present in its juice and albedo, such as neoeriocitrin, neohesperidin, naringin, rutin, nobiletin, rhoifolin and poncirin (Gliozzi et al. 2013). Bergamot differs from other citrus fruits, not only for the nutritional composition, but also for the particularly high content of flavonoids (Nogata et al. 2006; Dugo et al. 2005). Some of these flavonoids, such as naringin and its aglycone naringenin, have already been shown to have an antiatherogenic effect on animal models, while neoeriocitrin and rutin have been found to inhibit LDL oxidation (Yu et al. 2005). Besides, bergamot juice is rich in 3-hidroxy-3-methylglutaryl neohesperidosides

**CONTACT** Itziar Lamiquiz Moneo  itziarlamiquiz@gmail.com  Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Avenida Isabel La Católica, 1-3, 50009 Zaragoza, Spain.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at [www.tandfonline.com/bfsn](http://www.tandfonline.com/bfsn).

© 2019 The Author(s). Published with license by Taylor and Francis Group, LLC

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

of hesperetin (brutieridine) and naringenin (melitidine) with the ability to inhibit HMG-CoA reductase (Di Donna et al. 2009). These compounds are likely to contribute to the substantial hypolipidemic effects that bergamot juice has demonstrated in several animal studies (Mollace et al. 2008; Miceli et al. 2007). However, to date, there are few human studies that have evaluated the effect of bergamot in adults with dyslipidemia. Thus, the aim of this systematic review is to evaluate the effect of bergamot, as isolated component or as part of a nutraceutical product, in lipid profile (total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, and HDL cholesterol) in humans.

## Methods

This systematic review was conducted according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews (Liberati et al. 2009). Prisma checklist is available in [Supplemental Table 1](#).

### Search strategy and study selection

A systematic search of the relevant literature was performed with the use of PubMed, Embase, Cochrane Library, and Google Scholar in order to identify interventional studies investigating the effect of bergamot on lipid profile in humans. If available, we also included systematic reviews, meta-analysis and clinical guidelines. References of included studies and reviews were manually checked for additional studies. The structured search strategies used the combination of bergamot and different outcomes related to lipid profile: [Bergamot OR Citrus bergamia OR Nutraceuticals] AND [Cholesterol OR Dyslipidemia OR Hyperlipidemia OR Cardiovascular disease OR Cardiovascular risk OR Lipids OR Lipoprotein OR Low-density lipoprotein OR High-density lipoprotein OR Lipid-lowering drugs OR Triglycerides]. Articles retrieved were then included or excluded based on the following criteria. Inclusion criteria included: (a) articles published in a peer-reviewed journal; (b) cross-sectional, cohort, and interventional studies; (c) studies conducted in both children and adults; (d) studies conducted in healthy humans, or those with metabolic impairment (overweight, obese, hypercholesterolemic, prehypertensive, hypertensive, or with type 2 diabetes) or any other disease. Exclusion criteria involved: (a) case studies; (b) letters, commentaries, conference papers, narrative reviews; (c) studies not conducted in humans. The search was limited to literature presented in English.

### Outcome measures

Outcomes of interest were changes in total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, and triglycerides.

### Quality measures

The quality of each included trial was assessed based on the previously validated methodology developed by Kmet et al. (2004). The methodology was derived from a checklist for assessing the quality of quantitative studies, which included

the following criteria: (1) Question, objective sufficiently described?; (2) Study design evident and appropriate?; (3) Method of subject, comparison group selection or source of information, input variables described and appropriate?; (4) Subject and comparison group (if applicable) characteristics sufficiently described?; (5) If interventional and random allocation was possible, was it reported?; (6) If interventional and blinding of investigators was possible, was it reported?; (7) If interventional and blinding of subjects was possible, was it reported?; (8) Outcome and (if applicable) exposure measure(s) well defined and robust to measurement, misclassification bias? Means of assessment reported?; (9) Sample size appropriate?; (10) Analytic methods described, justified and appropriate?; (11) Some estimate of variance is reported for the main results?; (12) Controlling for confounding?; (13) Results reported in sufficient detail?; (14) Conclusion supported by the results?. Each question can be answered with “yes,” “partial,” “no,” or “not applicable.” Scoring process was done according to the following formula:  $((\text{number of “yes”} \times 2) + (\text{number of “partial”} \times 1)) / (\text{total possible sum (28)} - (\text{number of “not applicable”} \times 2))$ . The score ranged from 0 to 1; thus, the closer the value is to 1, the higher is the quality of the trial. Quality assessment of each trial was performed by three different researchers (ILM, JGG and RMG). Two researchers performed the quality checklist of each trial; if a discordance was found (difference mean score more than 0.1 points), a third review by the remaining researcher was performed.

## Results

### Study selection

The systematic search retrieved a total of 442 studies of which 361 were identified in PubMed and 61 in Cochrane, Google Scholar and Embase. After removing 18 duplicated articles, we screened 404 manuscripts of which 293 were excluded because of they did not meet the requirement of eligibility criteria. We made full-text review of 118, excluding 106 articles for different reasons: most excluded articles did not include bergamot as active principle within the intervention, they were *in vitro* studies or developed in animal models ( $n=90$ ), they were reviews ( $n=15$ ) and we were unable to access to one full-text manuscript ( $n=1$ ). Finally, 12 articles (10 intervention studies and 2 observational studies) fulfilled the eligibility criteria and were included in qualitative synthesis ([Figure 1](#)).

### Participants and main study characteristics

A detailed description of the included studies can be found in [Table 1](#). The 12 studies included a total of 870 adults' participants (aged 27–77 years). There was quite heterogeneity in clinical characteristics of populations. In summary, two trials recruited subjects with overweight or obesity and other cardiovascular risk factors (Dahlberg et al. 2017) or metabolic syndrome (Di Folco et al. 2018), four trials included subjects with mixed hyperlipidemia (Gliozzi et al.



Table 1. Summary of trials.

First author, year of publication (reference)	N	Participants	Male, n (%)	Age, years	Study design	Intervention dose, mg/day (number of subjects)	Duration (days)	Total cholesterol, (mg/dL)		LDL cholesterol, (mg/dL)		Triglycerides, (mg/dL)		Quality checklist score <sup>b</sup>
								Baseline	Final	Baseline	Final	Baseline	Final	
Bruno A, 2017 (Bruno, Pandolfo, Crucitti, Cacciola, et al. 2017)	28	Subjects in treatment with SGAs (clozapine, olanzapine, quetiapine, risperidone and paliperidone)	15 (53.5%)	45.8 ± 11.7	Prospective, single-arm, open-label, randomization not applicable	BPF 500 mg	60	203 ± 33.0	206 ± 23.8	125 ± 26.9	126 ± 20.1	109 ± 51.9	121 ± 64.8	0.74
Bruno A, 2017 (Bruno, Pandolfo, Crucitti, Maisano, et al. 2017)	15	Subjects in treatment with SGAs (clozapine, olanzapine, quetiapine, risperidone and paliperidone)	9 (60.0%)	44.5 ± 9.1	Prospective, single-arm, open-label, randomization not applicable	BPF 1000 mg	30	204 ± 31.9	204 ± 38.4	121 ± 26.8	125 ± 24.8	199 ± 90.6	183 ± 59.6	0.47
Dahlberg et al. (2017)	32	Subjects with overweight or obesity and at least two cardiovascular risk factors (waist circumference 89–156 cm in women and > 102 cm in men; LDLc > 130 mg/dL; triglycerides > 150 mg/dL; HDLc 29–81 mg/dL in women and 26–49 mg/dL in men; glucose > 100 mg/dL; Hb1Ac 4.8–7%; HOMA-IR: 0.5–5.8)	10 (31.3%)	27–64	Prospective, two-arm, open-label, randomized	Low glycemic load Mediterranean diet (17) Mediterranean diet (17) Low glycemic load Mediterranean diet + nutraceutical supplementation including soy, pea, whey proteins, phytosterols, antioxidants, probiotics, fish oil, berberine and bergamot fruit extract (500 mg) (15)	91	215 (186–277) 220 (147–340)	198 (172–256)* 182 (121–281)*	142 (107–195) 149 (71–239)	128 (96.0–175)* 121 (57.8–220)*	162 (77–284) 184 (96–332)	112 (53.4–197)* 90.5 (47.2–163)*	0.83
Cai et al. (2017)	98	Subjects with mixed hyperlipidemia (LDLc > 175 mg/dL, triglycerides > 149 mg/dL, total cholesterol > 220 mg/dL)	28 (28.6%)	65.2 ± 9.1	Prospective, two-arm, double-blind, randomized	Placebo (50) Bergamot extract (500 mg), plant esters and orange oil (820 mg), vitamin C (50mg), vitamin B (20 mg), vitamin B12 (2000 mcg) and folic acid (800 mcg) (48) diet (40) Low-calorie Mediterranean diet + 200 mg bergamot juice dry extract, 120 mg phytosterols, 80 mg artichoke leaf extract and 20 mg vitamin C (40)	84	218 ± 29 211 ± 38.3	210 ± 29.8 199 ± 37.9	134 ± 28 131 ± 35.2	132 ± 24.0 121 ± 29**	168 ± 47 190 ± 70.9	170 ± 117 160 ± 80.5	0.94
Di Folco et al. (2018)	80	Subjects with overweight and metabolic syndrome	37 (46.3%)	45 ± 5	Prospective, two-arm, open-label, randomized	Low-calorie Mediterranean diet + 200 mg bergamot juice dry extract, 120 mg phytosterols, 80 mg artichoke leaf extract and 20 mg vitamin C (40)	180	228 ± 14 224 ± 33	221 ± 15 190 ± 30*	141 ± 12 145 ± 35	138 ± 10 113 ± 26*	189 ± 9 195 ± 63	179 ± 10 149 ± 45*	0.64
Izzo et al. (2017)	41	Women with breast cancer under aromatase inhibitors treatment	0 (0%)	59 ± 12	Prospective, single-arm, open-label, randomized	Nutraceutical composed of bergamot, phytosterols, artichoke and vitamin C (not specified dose) (41)	180	247 ± 6.1	210 ± 5.3*	164 ± 6.4	116 ± 5.0*	183 ± 7.3	162 ± 6.8*	0.27
Babish et al. (2016)	11	Subjects with moderate dyslipidemia (LDLc between 150 and 350 mg/dL,	3 (27.3%)	38–65	Prospective, single-arm, open-label, randomized	BFE 500 mg and 200 mg phytoextract blend (11)	84	260 (213–271) 245 (191–286)	228 (197–266)* 218 (187–268)*	169 (141–198) 162 (123–220)	143 (112–199)* 141 (112–199)*	180 (127–359) 187 (118–473)	207 (86–260) 144 (86–260)*	0.36

(continued)

Table 1. Continued.

First author, year of publication (reference)	N	Participants	Male, n (%)	Age, years	Study design	Intervention dose, mg/day (number of subjects) or elevated triglycerides (8)	Duration (days)	Total cholesterol, (mg/dL)		LDL cholesterol, (mg/dL)		Triglycerides, (mg/dL)		Quality checklist score <sup>b</sup>
								Baseline	Final	Baseline	Final	Baseline	Final	
Campolongo et al. (2016)	64	Subjects with triglycerides between 150 and 400 mg/dL Subjects with previous ischemic heart disease	37 (57.8%)	63 ± 13.5	Prospective, two-arm, single-blind, randomized	Simvastatin 40 mg (32) Simvastatin 20 mg + nutraceutical composed of bergamot (400 mg), phytosterols, artichoke and vitamin C (32)	90	17717 172 ± 21	162 ± 13* 151 ± 16*	107 ± 9 103 ± 7	92 ± 5* 85 ± 5*	131 ± 10 139 ± 13	118 ± 8* 122 ± 9*	0.63
Toth et al. (2015)	80	Subjects with hypercholesterolemia (LDLc between 160 and 190 mg/dL)	42 (52.5%)	55 ± 13	Prospective, single-arm, open-label, randomized	Bergamot-derived extract (Bergamit®) 150 mg of flavonoids (80)	180	257 ± 15	223 ± 41*	176 ± 8.00	144 ± 37*	162 ± 54.0	136 ± 79*	0.64
Giozzi et al. (2014)	107	Subjects with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome	64 (59.8%)	56 ± 12	Prospective, single-arm, open-label, randomized <sup>a</sup>	BPF 1300 mg (64)	120	245 ± 6.3	182 ± 7.1*	162 ± 4.3	101 ± 1.8*	232 ± 5.1	160 ± 4.8*	0.46
Giozzi et al. (2013)	77	Subjects with mixed hypercholesterolemia (LDLc > 160 mg/dL and triglycerides levels > 225 mg/dL)	-	-	Prospective, multiple-arm, open-label, randomized	Placebo (15) Rosuvastatin 10 mg (16) Rosuvastatin 20 mg (16) BPF 1000 mg (15) BPF 1000 mg + rosuvastatin 10 (15)	30	278 ± 4 278 ± 4	275 ± 4 195 ± 3**	191 ± 3 191 ± 3	190 ± 2 115 ± 4**	238 ± 5 238 ± 5	235 ± 5 200 ± 4**	0.54
Mollace et al. (2011)	237	Subjects with mixed hyperlipidemia	-	-	Prospective, multiple-arm, double-blind, randomized.	Placebo (60) BPF 1500 mg + 1600 kcal/day diet (32)	60	-21.8 ± 1.40** -29.4 ± 1.30 -0.10 ± 0.30 -25.0 ± 1.60**	-24.1 ± 1.5** -36.0 ± 1.4*** -1.1 ± 0.5 -27.6 ± 0.5**	-30.5 ± 3.2** -39.5 ± 3.0 0.05 ± 0.55 Not described	-30.5 ± 3.2** -39.5 ± 3.0 0.05 ± 0.55 Not described	-30.5 ± 3.2** -39.5 ± 3.0 0.05 ± 0.55 Not described	0.44	

BPF denotes: Bergamot-derived polyphenolic fraction; BFE: Bergamot orange fruit extract; HbA1c: Glycated hemoglobin; HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance; SGAs: Second-generation antipsychotics.

<sup>a</sup>Giozzi et al. randomized 107 patients in two groups: one receiving placebo and second receiving BPF 1300 mg/day, however they did not show any results of control group and they did not compare any parameter between placebo and intervention group.

<sup>b</sup>The Quality checklist score was calculated according to the following formula: ((number of "yes" x2) + (number of "partial" x1))/(total possible sum (28) - (number of "not applicable" x2)).

\*Significance with  $p < 0.05$  comparing baseline and final values within each treatment group.

\*\*Significance with  $p < 0.05$  comparing placebo and BPF group after intervention.

\*\*\*Significance with  $p < 0.05$  between BPF 500 mg and BPF 1000 mg group after intervention.

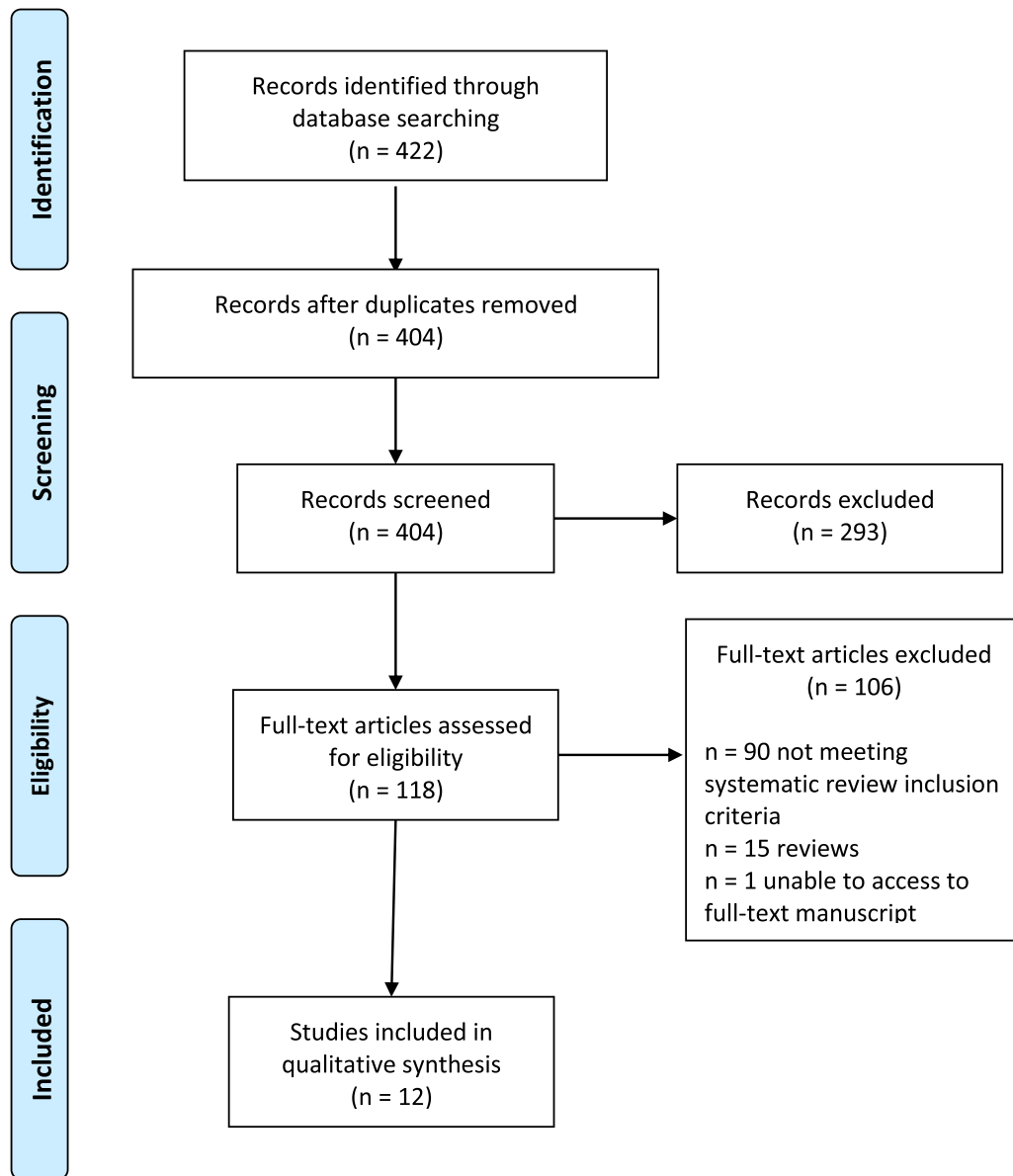


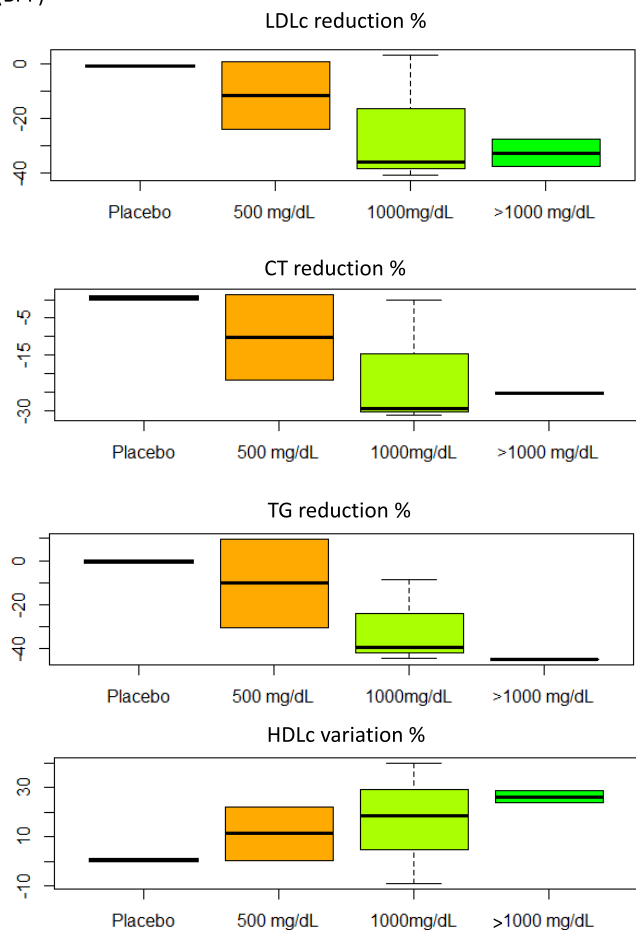
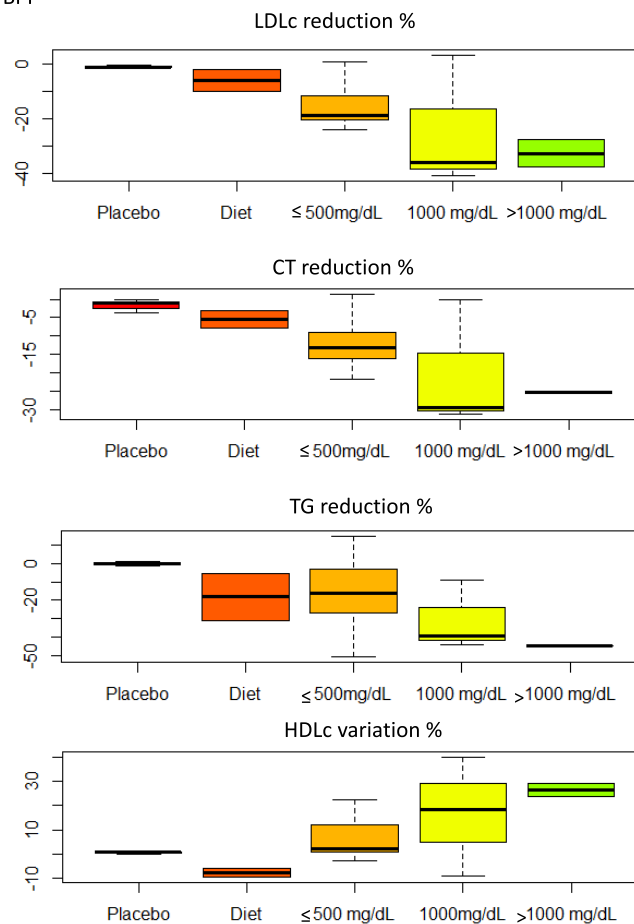
Figure 1. Flow chart of the study selection.

2013; Mollace et al. 2011; Cai et al. 2017; Babish et al. 2016), one trial involved subjects with isolated hypercholesterolemia (Toth et al. 2015), one trial recruited participants with previous ischemic heart disease (Campolongo et al. 2016), two similar trials recruited subjects under second-generation antipsychotics (SGA) treatment (Bruno, Pandolfo, Crucitti, Cacciola, et al. 2017; Bruno, Pandolfo, Crucitti, Maisano, et al. 2017), and one trial included women with breast cancer and receiving aromatase inhibitors treatment (Izzo et al. 2017). Five studies had a single-arm intervention, while six of them showed double or multiple-arm designs by comparing different doses of bergamot, using a placebo or statin group as comparison arm. It is important to point out that one trial referred to have a randomized clinical trial design by comparing bergamot effect with placebo; however, authors did not report placebo group results and they only reached conclusions using changes in lipid profile after the intake of bergamot supplements (Gliozzi et al. 2014). Dietary intervention duration ranged from 1 month to

6 months and bergamot doses used in the different studies ranged from 150 mg/day in the study by Toth et al. (2015) to 1500 mg as the maximum dose in the study carried out by Mollace et al. (2011)

### Quality of the studies

The overall quality score of the included studies is summarized in Table 1 and ranged from 0.27 to 0.96, with a mean score of 0.55. Detailed description of each issue assessment for each study is included in Supplemental Table 1. The greatest concerning issues were randomization of descriptions, blinding of investigators and subjects, sample size calculation, appropriate analytic methodology, and controlling for confounding factors. Among six studies including a randomized clinical trial design, only two described randomization process and carried out a blinded intervention. Among 12 included trials, only one included a sample size calculation and two of them partially described it. In

**A** Bergamot administered as Bergamot-derived polyphenolic fraction (BPF)**B** Bergamot administered as any component of bergamot including BPF

**Figure 2.** The effect of bergamot on lipid profile according to the type of bergamot component that was administered.

addition, eight of them did not use an appropriate statistical analysis or it was partially suitable and only one study made a statistical analysis taking into account the confounding factors; this is one of the main reasons why conclusions of most of the studies have been considered as partially or completely not supported by the results.

### Change on lipid profile

Among five studies that administrated 500 mg of bergamot, four of them used bergamot as an isolated component and one of them used bergamot as part of a complex nutraceutical including soy, phytosterols or berberine, among others. Four out of five studies found a significant effect of bergamot on lipid profile while one of them did not describe significant differences after the intervention. This study was carried out by Bruno, Pandolfo, Crucitti, Cacciola, et al. (2017) who recruited 28 subjects under SGAs treatment receiving 500 mg/day of Bergamot-derived polyphenolic fraction (BPF) during 30 days. In contrast, Mollace et al. (2011) randomized 237 participants with combined hyperlipidemia to 500, 1000 mg/day of bergamot or placebo during 30 days, 69 subjects taking 500 mg/day of BPF obtained significant reductions of total cholesterol, LDL cholesterol and

triglycerides with respect to the placebo group ( $-21.8 \pm 1.40\%$ ,  $-24.1 \pm 1.5\%$ ,  $-30.5 \pm 3.2\%$ , respectively). On the other hand, Dahlberg et al. (2017) randomized 32 subjects with overweight or obesity and at least two cardiovascular risk factors in two groups: a low glycemic load Mediterranean diet and the same intervention plus a nutraceutical including 500 mg/day of bergamot fruit extract, soy, berberine, and phytosterols, among other components. Authors found significant differences between baseline and final values in lipid profile in both study groups, although the change was greater in participants receiving the nutraceutical, who showed decreases of 17.3%, 18.8%, and 50.8% in total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides, respectively (Dahlberg et al. 2017). Cai et al. (2017) randomized 98 subjects with mixed hyperlipidemia to receive either a nutraceutical supplementation including 500 mg/day of bergamot extract, among others, or placebo for 84 days. They just found significant decreases in LDL cholesterol (7.63%) what was statistically significant compared to the placebo group ( $p = 0.032$ ). Finally, Babish et al. (2016) recruited 11 subjects with moderate hypercholesterolemia who were supplemented with 500 mg of BPF and 200 mg of phytocomplex mixture each day. Participants showed significant decreases in total cholesterol (12.3%) and LDL cholesterol (15.4%) but not in triglycerides concentration. Subjects

with a baseline concentration of glycated hemoglobin (HbA1c) > 5.4%, HOMA-IR score > 2 or elevated triglycerides showed greater reductions in their lipid profile, especially in their triglyceride levels (Table 1).

Three studies used doses below 500 mg of bergamot extract, of which two used bergamot as part of a complex nutraceutical and one of them used bergamot as isolated active principle. All of them found statistically significant decreases both in total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides. Di Folco et al. (2018) recruited 80 subjects with overweight and metabolic syndrome, who were randomized to a low-calorie Mediterranean diet (control group) or the same intervention plus 200 mg/day of a dry extract of bergamot juice with 120 mg of phytosterols. Only the intervention group (supplemented with 200 mg/day of bergamot) showed significant reductions in total cholesterol (15.2%), LDL cholesterol (22.1%) and triglycerides (11.5%) concentration with respect to the baseline. Campolongo et al. (2016) randomized 64 subjects with previous ischemic heart disease in two groups: one of them was treated with 40 mg of simvastatin, and another group was treated with 20 mg of simvastatin plus nutraceutical including 400 mg/day of bergamot, phytosterols, artichoke and vitamin C. Both groups showed significant reductions in lipid profile suggesting an additive effect when adding the nutraceutical to lower doses of simvastatin. Finally, in a study conducted by Toth et al. (2015), 80 patients with hypercholesterolemia received 150 mg/day of flavonoids coming from bergamot during 180 days. Authors described similar reductions in total cholesterol (13.2%), LDL cholesterol (18.2%) and triglycerides (16.5%) than those reported by Di Folco et al. (2018) and Campolongo et al. (2016).

Three studies administered 1000 mg of bergamot as isolated principle active. Two of them found statistically significant improvement in lipid profile while one of them did not. This study was carried out by Bruno, Pandolfo, Crucitti, Maisano, et al. (2017) who prescribed 1000 mg/day of BPF for 30 days to 15 subjects under SGA treatment. In contrast, Gliozzi et al. (2013) showed that subjects with mixed hyperlipidemia receiving 1000 mg/day of BPF had similar reductions in total cholesterol (31.3%), LDL cholesterol (40.8%), and triglycerides (30.7%) than subjects under treatment with 10 mg/day of rosuvastatin. They also proved that participants treated with 1000 mg/day of BPF plus 10 mg of rosuvastatin showed the same improvement in lipid profile than subjects receiving 20 mg/day of rosuvastatin. This synergistic or additive effect was also described by Campolongo et al. who described a similar decrease in total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides in those participants receiving simvastatin 20 mg plus 400 mg/day (as part of a complex nutraceutical) than those taking simvastatin 40 mg. Finally, in previously described study carried out by Mollace et al. (2011), dyslipidemic participants taking 1000 mg/day of BPF had greater significant reductions in LDL cholesterol than those receiving 500 mg/day ( $-36.0 \pm 1.4\%$  vs.  $-24.1 \pm 1.5\%$ , respectively) or placebo group.

Only two studies used a dose of bergamot higher than 1000 mg/day and both found a significant effect of bergamot on lipid profile. Gliozzi et al. (2014) prescribed 1300 mg/day of BPF to 107 patients with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome for 120 days. The intervention led to significant decreases in total cholesterol (25.7%), LDL cholesterol (37.7%) and triglycerides (31.0%). However, it is important to point out that results of placebo group are not included in the manuscript that may be essential to reach definitive conclusions according to study design. Finally, 32 subjects with mixed hyperlipidemia received 1500 mg of bergamot combined with hypocaloric diet (1600 kcal/day). This study reported that the reduction of total cholesterol and LDL cholesterol was lower in patients treated with 1000 mg of bergamot, although it was only a statistically significant reduction compared to the control-placebo group (Mollace et al. 2011).

It should be noted that one of the found articles did not explicitly indicate the bergamot dose used in the intervention. This study was conducted by Izzo et al. (2017) who recruited 41 women with breast cancer who were prescribed with a nutraceutical composed of bergamot, phytosterol and vitamins. Authors found significant reductions in total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides with respect to the baseline.

Figure 2 shows the effect of bergamot on lipid profile based on the type of component that was administered (A) BPF or (B) any component of bergamot including BPF, compared to placebo or diet intervention. Mean changes in each lipid parameter for every study were used to figure out the graphics. The figure shows a dose-dependent effect of bergamot with higher decreasing in total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides concentration when they received higher doses of BPF or with any other form of bergamot.

Among 12 studies included in the systematic review, eight trials reported significant increased effect in HDL cholesterol concentration after receiving bergamot in any form. The study carried out by Cai et al. (2017) did not find statistically significant differences. Even though, it is important to note that Babish et al. (2016), Bruno, Pandolfo, Crucitti, Cacciola, et al. (2017) and Dahlberg et al. (2017) showed light although significant decreases in HDL cholesterol concentration, that ranged from 1% to 6.5%.

## Discussion

To our knowledge, this is the first systematic review aiming to explore the effect of bergamot in lipid profile in humans. We found 12 studies of which: 9 showed significant decrease of total cholesterol, triglycerides and LDL cholesterol; 1 only showed significant decrease in LDL cholesterol; and 2 did not find significant change in any lipid variable. Eight trials reported HDL cholesterol increase after intervention with bergamot in any form, while three studies described slight but significant decreases in HDL cholesterol concentration. A dose-dependent effect can be deduced from the studies but it should be confirmed with larger trials. However, it is

essential to point out that studies had quite heterogeneous designs and scientific quality of the studies was quite limited. The first issue is crucial to reach conclusions since bergamot was provided in different forms: (a) isolated phytosterols of bergamot; (b) dry extract of whole bergamot juice; and (c) as part of a complex nutraceutical including other substances like phytosterols, artichoke or vitamin C. Thus, a solidly elucidation of whether bergamot has a significant effect on lipid profile in humans, which would be the optimal dose, and the mechanism responsible for this benefit, should still be clarified.

Statins are the main therapeutic approach in dyslipidemia management due to their solidly demonstrated cholesterol decreasing and cardiovascular protective effect (Stone et al. 2014; Baigent et al. 2005). However, some subjects show statin-intolerance especially at high doses (Rosenson et al. 2017; Serban et al. 2017). Inadequate lipid-lowering therapy and nonadherence to statin treatment are the main causes of failing to achieve LDL cholesterol targets (Guglielmi et al. 2017). Nutraceuticals can help to achieve lipid therapeutic goals and reduce cardiovascular residual risk. However, data about them are still limited. A recent position paper of International Lipid Expert Panel established that nutraceuticals could reach an LDL cholesterol reduction from <10% to 20%, although some of them or the combinations of different nutraceuticals could achieve greater reductions in LDL cholesterol (Banach et al. 2018). Our systematic review founded 12 trials exploring the effect of bergamot effect on lipid profile in humans; among them, 9 trials showed significant improvement in lipid parameters. The decrease in total cholesterol varied from 12.3% to 31.3%, from 7.63% to 40.8% in LDL cholesterol and from 11.5% to 39.5% in triglycerides. These improvements are similar to those reported when taking red yeast rice (15–25% decrease in LDL cholesterol), phytosterols (8–12%) or berberine (15–20%), among others (Banach et al. 2018).

A dose-response effect could be deduced from the studies we have analyzed. Overall, higher decreases in total cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides were observed with higher bergamot doses when mean changes were calculated including the results of all trials (Figure 2). Although we found a linear association between bergamot dose and lipid profile improvement, there is a high variation in the lipid profile reduction within these studies. In this way, Cai et al. (2017) reported a decrease in LDL cholesterol of 7.63% when taking 500 mg/day dose of bergamot, while the same dose led to a decrease of 24.1% in the trial conducted by Mollace et al. (2011) On the other hand, the study carried out by Toth et al. (2015) included a low dose of 150 mg/day of flavonoids coming from bergamot and they found a 18.2% decrease in LDL cholesterol. Based on the other trials, a lower effect would had been expected if a linear dose-response would had existed. It is crucial to note that participants characteristics are quite different among trials and, most importantly, it results quite heterogeneous the way in which bergamot was administered. This could play an essential role in the findings observed. While Cai et al. (2017) studied the effect of a whole-bergamot extract (within a

complex nutraceutical), Mollace et al. (2011) used BPF and Toth et al. (2015) provided isolated bergamot flavonoids. Animal and *in vitro* studies suggested that polyphenols, particularly, flavonoids, such as melitidin and brutieridin combination with other flavonoid glycosides present in bergamot, are likely to be responsible for lipid-lowering effects of this fruit (Di Donna et al. 2014; Choe et al. 2001; Miceli et al. 2007). Thus, it would be vital to solidly establish which is the most effective way (in terms of lipid-lowering effect) of bergamot supplementation in humans including either isolation of certain flavonoids, whole polyphenols extraction or whole bergamot juice extract. Future studies should also focus on determining the exact dose that would reach the maximum benefit on lipid metabolism with no side effects and whether the effects could reach a plateau at a certain dose.

One of the main observations obtained of this systematic review is that adding bergamot to low-doses of statins led to a similar lipid profile improvement than could be reached with higher doses, suggesting a synergic effect between statins and bergamot. Despite findings are promising, only two studies included small sample number have explored this issue. Gliozzi et al. (2013) demonstrated that adding BPF to rosuvastatin 10 mg showed the same reduction in lipid parameters than the improvement achieved under rosuvastatin 20 mg treatment. Similar results were reported by Campolongo et al. (2016) who observed an equivalent reduction in LDL cholesterol when adding bergamot to simvastatin 20 mg with respect to those who received simvastatin 40 mg. High-risk or very-high-risk patients with partial statin intolerance (who can tolerate a dose of statin that is less than required based on their cardiovascular risk) could be benefited by this therapeutic option (Banach et al. 2018). Bergamot contains flavanones (including brutieridin, melitidin and HMG-neoeriocitrin) which have been demonstrated to inhibit 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase like statins (Di Donna et al. 2014). Some authors have also proposed different mechanisms that may concur in lipid homeostasis regulation by flavonoids. These included the activation of situin-1, which in turns activate adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)- $\alpha$  by increasing fatty acid oxidation and decreasing VLDL synthesis through of hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) inhibition, sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) regulation (Tsutsumi et al. 2014; Bruckbauer and Zemel 2014; Chang et al. 2013; Quesada et al. 2009) and the inhibition of the pancreatic cholesterol ester hydrolase and Acyl-CoA cholesterol acyltransferase, which increase the cholesterol fecal excretion (Musolino et al. 2017). Despite this is the most probable mechanism like bergamot, there are other mechanisms that have been proposed to be responsible for lipid-lowering effects of bergamot. Other potential mechanisms include increased gene transcription and increased membrane translocation of the LDL receptor, which could be mediated by proliferator-activated receptors gamma (PPAR- $\gamma$ ) activation (Farràs et al. 2013; Kumar et al. 1997). Although any study has specifically explored the effect of bergamot alone by comparing to its

combination with other nutraceutical components, a synergic effect of lipid-lowering nutraceuticals is deduced from published research. Those studies using low doses of bergamot together to other bioactive components have reached similar decreases than those using higher doses of bergamot alone. These findings point out a similar synergistic effect than the one described with statins by influencing on different lipid metabolic pathways.

It is essential to emphasize that quality assessment of trials revealed important issues which limit interpretation and conclusions that can be reached based on these trials. Among 12 studies identified through a systematic review process, only half of them used a randomization design and only two trials described how the randomization process was carried out. Most importantly, only one study took into consideration confounding factors in analyzing study data. Adjustment of lipid parameters change after intervention with bergamot by body weight or dietary changes, among others, is crucial to correct interpretation of results and establish firm conclusions. According to the study design, many trials carried out some statistical approaches that could be inappropriate according to study design. Limited methodology quality of trials is a cornerstone to establish definitive conclusions that should be considered when interpreting the results.

In conclusion, this is the first systematic review aiming to compile all studies that have explored the effect of bergamot on lipid profile in humans. Nine of 12 founded trials showed a significant decrease in total cholesterol, triglycerides and LDL cholesterol, while one study showed a significant decrease just in LDL cholesterol. Two trials did not find significant change in any variable. Eight trials reported HDL increase after intervention with bergamot in any form. Overall, a dose-dependent effect and a potential synergistic effect when administering with statins can be deduced from these trials. Possible synergistic effect could be explained because the mechanism of bergamot acts to different levels: inhibiting the HMG-CoA reductase, the pancreatic cholesterol ester hydrolase and Acyl-CoA cholesterol acyltransferase, which would produce lower cholesterol synthesis and higher cholesterol fecal excretion. Promising findings give away from an alternative therapeutic option in dyslipidemia management with bergamot supplementation, especially in patients with moderate hypercholesterolemia, low cardiovascular risk or intolerant to traditional pharmacological treatment. However, crucial issues are still remained to be clarified before a solid recommendation on this nutraceutical could be performed. These questions include the form in which most efficiently bergamot should be provided (BPF, certain flavonoids or whole bergamot juice extraction) and the optimal dose and its safety.

## Supplementary information

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website at [article DOI].

## Acknowledgments

All authors have read and approved the final manuscript.

## Funding

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness PI15/01983, PI13/02507, PI12/01321 and CIBERCV. These projects are co-financed by Instituto de Salud Carlos III and the European Regional Development Fund (ERDF) of the European Union "A way to make Europe".

## References

- Babish, J. G., C. J. Dahlberg, J. J. Ou, W. J. Keller, W. Gao, M. R. Kaadige, H. Brabazon, J. Lamb, H. C. Soudah, and X. Kou. 2016. Synergistic in vitro antioxidant activity and observational clinical trial of F105, a phytochemical formulation including *Citrus bergamia*, in subjects with moderate cardiometabolic risk factors. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 94 (12):1257–66. doi:10.1139/cjpp-2016-0062.
- Baigent, C., A. Keech, P. M. Kearney, L. Blackwell, G. Buck, C. Pollicino, A. Kirby, T. Sourjina, R. Peto, R. Collins, et al. 2005. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: Prospective meta-analysis of data From 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet (London, England)* 366 (9493):1267–78. doi:10.1016/S0140-6736(05)67394-1.
- Banach, M., A. M. Patti, R. V. Giglio, A. F. G. Cicero, A. G. Atanasov, G. Bajraktari, E. Bruckert, O. Descamps, D. M. Djuric, M. Ezhov, et al. 2018. The role of nutraceuticals in statin intolerant patients. *Journal of the American College of Cardiology* 72 (1):96–118. doi:10.1016/j.jacc.2018.04.040.
- Banach, M., T. Stulc, R. Dent, and P. P. Toth. 2016. Statin non-adherence and residual cardiovascular risk: There is need for substantial improvement. *International Journal of Cardiology* 225 (December): 184–96. doi:10.1016/j.ijcard.2016.09.075.
- Bea, A. M., F. Civeira, E. Jarauta, I. Lamiquiz-Moneo, S. Pérez-Calahorra, V. Marco-Benedí, A. Cénarro, and R. Mateo-Gallego. 2017. Association between the presence of carotid artery plaque and cardiovascular events in patients with genetic hypercholesterolemia. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 70 (7):551–8. doi:10.1016/j.rec.2017.01.023.
- Benavente-García, O., and J. Castillo. 2008. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (15):6185–205. doi:10.1021/jf8006568.
- Bruckbauer, A., and M. B. Zemel. 2014. Synergistic effects of polyphenols and methylxanthines with leucine on AMPK/sirtuin-mediated metabolism in muscle cells and adipocytes. *PLoS One* 9 (2):e89166. doi:10.1371/journal.pone.0089166.
- Bruno, A., G. Pandolfo, M. Crucitti, M. Cacciola, V. Santoro, E. Spina, R. A. Zoccali, and M. R. A. Muscatello. 2017. Low-dose of bergamot-derived polyphenolic fraction (BPF) did not improve metabolic parameters in second generation antipsychotics-treated patients: Results from a 60-days open-label study. *Frontiers in Pharmacology* 8:197. doi:10.3389/fphar.2017.00197.
- Bruno, A., G. Pandolfo, M. Crucitti, A. Maisano, R. A. Zoccali, and M. R. A. Muscatello. 2017. Metabolic outcomes of bergamot polyphenolic fraction administration in patients treated with second-generation antipsychotics: A pilot study. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 40:32–5. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.10.008.
- Cai, Y., G. Xing, T. Shen, S. Zhang, J. Rao, and R. Shi. 2017. Effects of 12-week supplementation of *Citrus bergamia* extracts-based formulation CitriCholesterol on cholesterol and body weight in older adults with dyslipidemia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lipids in Health and Disease* 16 (1):251. doi:10.1186/s12944-017-0640-1.





- Nogata, Y., K. Sakamoto, H. Shiratsuchi, T. Ishii, M. Yano, and H. Ohta. 2006. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (1):178–92. doi:10.1271/bbb.70.178.
- Quesada, H., J. M. del Bas, D. Pajuelo, S. Díaz, J. Fernandez-Larrea, M. Pinent, L. Arola, M. J. Salvadó, and C. Bladé. 2009. Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *International Journal of Obesity* 33 (9):1007–12. doi:10.1038/ijo.2009.136.
- Rosenson, R. S., S. Baker, M. Banach, K. M. Borow, L. T. Braun, E. Bruckert, L. R. Brunham, A. L. Catapano, M. B. Elam, G. B. John Mancini, et al. 2017. Optimizing cholesterol treatment in patients with muscle complaints. *Journal of the American College of Cardiology* 70 (10):1290–301. doi:10.1016/j.jacc.2017.07.752.
- Serban, M.-C., L. D. Colantonio, A. D. Manthripragada, K. L. Monda, V. A. Bittner, M. Banach, L. Chen, L. Huang, R. Dent, S. T. Kent, et al. 2017. Statin intolerance and risk of coronary heart events and all-cause mortality following myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 69 (11):1386–95. doi:10.1016/j.jacc.2016.12.036.
- Kmet, L. M., L. S. Cook, and R. C. Lee. 2004. *Standard quality assessment criteria for evaluating primary research papers from a variety of fields*. Edmonton: Alberta Heritage Foundation for Medical Research (AHFMR).
- Stone, N. J., J. G. Robinson, A. H. Lichtenstein, C. N. Bairey Merz, C. B. Blum, R. H. Eckel, A. C. Goldberg, D. Gordon, D. Levy, D. M. Lloyd-Jones, et al. 2014. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Journal of the American College of Cardiology* 63 (25):2889–934. doi:10.1016/j.jacc.2013.11.002.
- Toth, P. P., A. M. Patti, D. Nikolic, R. V. Giglio, G. Castellino, T. Biancucci, F. Geraci, S. David, G. Montalto, A. Rizvi, and M. Rizzo. 2015. Bergamot reduces plasma lipids, atherogenic small dense LDL, and subclinical atherosclerosis in subjects with moderate hypercholesterolemia: A 6 months prospective study. *Frontiers in Pharmacology* 6:299.
- Tsutsumi, R., T. Yoshida, Y. Nii, N. Okahisa, S. Iwata, M. Tsukayama, R. Hashimoto, Y. Taniguchi, H. Sakaue, T. Hosaka et al. 2014. Sudachitin, a polymethoxylated flavone, improves glucose and lipid metabolism by increasing mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Nutrition & Metabolism* 11 (1):32. doi:10.1186/1743-7075-11-32.
- Yu, J., L. Wang, R. L. Walzem, E. G. Miller, L. M. Pike, and B. S. Patil. 2005. Antioxidant activity of *Citrus limonoids*, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (6):2009–14. doi:10.1021/jf0484632.
- Zhang, H., J. Plutzky, S. Skentzos, F. Morrison, P. Mar, M. Shubina, and A. Turchin. 2013. Discontinuation of statins in routine care settings: A cohort study. *Annals of Internal Medicine* 158 (7):526–34. doi:10.7326/0003-4819-158-7-201304020-00004.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Nutrition

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/clnu>

## Randomized Control Trials

# High-protein energy-restricted diets induce greater improvement in glucose homeostasis but not in adipokines comparing to standard-protein diets in early-onset diabetic adults with overweight or obesity

Victoria Marco-Benedí<sup>a</sup>, Sofía Pérez-Calahorra<sup>a</sup>, Ana M. Bea<sup>a</sup>, Itziar Lamiquiz-Moneo<sup>a</sup>, Lucía Baila-Rueda<sup>a</sup>, Ana Cenarro<sup>a</sup>, Fernando Civeira<sup>a,b</sup>, Rocío Mateo-Gallego<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), CIBERCv, Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 November 2018

Accepted 7 June 2019

## Keywords:

Diabetes

High protein diet

Weight loss

Adipokines

Insulin resistance

Obesity

## SUMMARY

**Background & aims:** It has not been elucidated if an energy-restricted diet with high protein content could induce a benefit in insulin resistance in subjects with type 2 diabetes (T2DM); and if an adipose tissue functionality improvement could mediate this effect. We aimed to assess the effect of energy-restricted diets with standard (18% from total calories; SP) vs high (35%) protein (HP), mainly coming from lean animal source, composition on glucose metabolism and adipokine concentration in overweight and obese subjects with T2DM. HOMA-IR change was the primary outcome.

**Methods:** Six-month weight-loss intervention including 73 subjects (43.8% men,  $55.6 \pm 8.37$  aged and  $32.8 \pm 3.67$  of BMI) with T2DM that were randomized to follow one of two calorie-restricted diets with the following distribution of calories: 18% (0.75 [95%CI: 0.71–0.78] g/kg/day) protein, 52% carbohydrates and 30% fat, or 35% (1.34 [95%CI: 1.27–1.41] g/kg/day) protein, 35% carbohydrates, and 30% fat. Anthropometric, clinical, biochemical (involving leptin, RBP4 and adiponectin) and lifestyle assessments were performed.

**Results:** Sixty-seven participants completed the study. Weight loss homogeneously decreased among diets. HOMA-IR in HP diminished 2-fold than in SP diet ( $P = 0.023$  and  $P = 0.004$  at 3 and 6-months between diets). Participants following HP diet showed higher decrease in insulin, in glucose at 6-months ( $P = 0.004$ ) and in HbA1c at 3-months ( $P = 0.003$ ). RBP4 and leptin significantly decreased in both diets although no differences were found between diets. Adiponectin increased by 6.05% and 29.9% at 3-months in SP and HP diets, respectively ( $P = 0.167$ ), and 23.7% and 53.5% at 6-months in SP and HP diets ( $P = 0.219$ ). Adiponectin variation was inversely correlated with HbA1c, insulin and HOMA-IR changes at 6-months.

**Conclusions:** An energy-restricted diet containing 35% of total calories coming from protein lead to a greater improvement in glucose homeostasis, indicated by HOMA-IR and fasting plasma insulin concentrations, irrespective of weight loss in subjects with prediabetes or early stages of T2DM. This effect cannot be explained by changes in plasma concentration of adipokines.

**Clinical trial registration:** The clinical trial has been registered in [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (Identifier: NCT02559479).

© 2019 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

**Abbreviations:** ALT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma glutamil transferase; HbA1c, glycated hemoglobin; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; HP, high-protein; IFG, impaired fasting glucose; RBP4, retinol Binding Protein 4; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

\* Corresponding author. Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Aterosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Paseo Isabel La Católica, 1-3, 50009, Zaragoza, Spain. Fax: +34 976765500.

E-mail address: [rmateo@unizar.es](mailto:rmateo@unizar.es) (R. Mateo-Gallego).

## Introduction

Weight loss via lifestyle changes is the first-line therapy for type 2 diabetes mellitus (T2DM) [1,2]. A weight reduction achieving greater loss of adipose tissue has been shown to be more efficient in improving peripheral resistance to insulin, one of the fundamental

<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.06.005>

0261-5614/© 2019 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

Please cite this article as: Marco-Benedí V et al., High-protein energy-restricted diets induce greater improvement in glucose homeostasis but not in adipokines comparing to standard-protein diets in early-onset diabetic adults with overweight or obesity, *Clinical Nutrition*, <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.06.005>

components of T2DM [3]. Weight loss–induced improvements in glucose metabolism are most likely to occur early in the natural history of T2DM when obesity associated insulin resistance has produced reversible  $\beta$ -cell dysfunction, but insulin secretory capacity remains fairly preserved [4]. In fact, studies of weight loss in subjects with long-standing diabetes have not demonstrated long-term clinical benefits in morbidity and mortality [5].

In recent years, energy-restricted protein-rich diets resulted in greater weight loss than more conventional high-carbohydrate, low-fat diets [6,7]. Beyond the weight-loss enhancing ability, it has been demonstrated that high-protein (HP) diets improve cardiometabolic parameters regardless of weight loss [8,9]. Individuals on a HP diet demonstrated lower insulin resistance and triglyceride levels than those on a diet with a standard protein (SP) content [10]. The American Diabetes Association has recently encouraged increased protein consumption as part of a healthy lifestyle intervention [11]. However, research on the ideal amount of dietary protein to optimize glycemic control or cardiovascular risk is inconclusive, so further research is encouraged to fully establish dietary goals.

Evidence of the potential benefit comes from very different studies regarding the design, percentage of proteins in diet, duration of diabetes, concomitant treatments, and their duration. A meta-analysis including nine trials exploring HP diet's effect on cardiometabolic parameters in subjects with T2DM, pointed out a benefit in glycated hemoglobin (HbA1c) but glucose findings were inconclusive [12]. Heterogeneous results could be due to differences in quantity and protein sources. Thus, the purpose of this study was to demonstrate the effect of a energy-restricted diet with 35% of total calories coming from protein (considered as HP diet) on glucose metabolism in subjects with early-diagnosed impaired fasting glucose (IFG) or T2DM and overweight or obesity, comparing to a diet with an 18% of total energy coming from protein diet (considered as SP diet). We have previously shown that a diet with 35% of total calories from protein is well-tolerated and is associated with a better metabolic profile than other HP diets [10]. Primary outcome of this study was HOMA-IR while secondary outcomes included insulin, glucose and HbA1c.

## Subjects and methods

### Subjects

Eligible volunteers were women and men aged 18–70, with a body mass index (BMI) ranging from 27.5 to 40 kg/m<sup>2</sup> and steady weight ( $\pm 4$  Kg) in the previous 2 months. We included those subjects: a) with the diagnosis of IFG or T2DM according to international guidelines by including fasting glucose concentration over 100 mg/dL and/or HbA1c over 5.7% [13], and not taking antidiabetic drugs; b) with the diagnosis of IGF or T2DM as previously defined and taking a stable dose of metformin for 2 months, regardless of glucose and/or HbA1c levels. We excluded those subjects with HbA1c concentration over 7% at baseline. Exclusion criteria involved: lipid-lowering drugs and/or sterols supplements, omega-3 fatty acids, weight loss medications, kidney disease (glomerular filtration rate < 45 mL/min), active liver disease, uncontrolled hypothyroidism and any other disease or condition that could limit the study's compliance. Volunteers were recruited by public advertisements on local television and newspapers and were invited to an informative session where objectives, and inclusion and exclusion criteria were explained in detail. Participants willing to participate completed a questionnaire that included: body weight, height, medical history, common medications and availability to participate. Those volunteers who completed the study questionnaire and were eligible according to the inclusion and exclusion

criteria were scheduled for a pre-screening visit. Informed consent was obtained at the pre-screening visit along with clinical and biochemical parameters, to confirm eligibility, before proceeding to randomization if applicable.

The study protocol was approved by the local ethical committee institution (Comité de Ética e Investigación Clínica de Aragón); all procedures were in accordance with the ethical standards of that committee. This clinical trial was registered in [ClinicalTrials.gov](https://ClinicalTrials.gov) under identifier NCT02559479.

### Study design

This study consisted of a 6-month weight-loss intervention and was carried out between September 2015 and May 2017. Those individuals selected at the screening visit, were randomized 1:1 to a diet containing 18% of daily calories from protein (SP diet group) or to a diet with 35% of daily calories from protein (HP diet group). The two prescribed diets had the following distribution of calories: 18% protein, 52% carbohydrates, 30% fat; and 35% protein, 35% carbohydrates, 30% fat. Estimated quantity of protein that was prescribed was 0.75 (95% CI: 0.71–0.78) g/kg/day in SP diet group and 1.34 (95% CI: 1.27–1.41) g/kg/day in HP group. A SP diet was considered when 18% of calories coming from protein (around 0.80 g/kg/day within an energy-restricted diet) in agreement with WHO recommendations [14]. The rationale that a HP diet involved a 35% of energy intake from protein was based on our previous findings that revealed that this amount lead to greater cardiometabolic improvement (including glucose homeostasis) when compared to other HP quantity [10]. Randomization was performed by using an online software and participants and the staff, except for the nutritionists, were blinded to the type of diet individuals were assigned. The total number of calories was calculated using the Harris–Benedict equation by applying an activity factor (energy expenditure for various activities established by the WHO [14]) according to personal physical activity habits and a daily 600 kcal (2510 kJ)-deficit. In general, the prescribed energy intake was 1200–2000 kcal (5020–8370 kJ)/day. Diets included a wide variety of foods typical of the Mediterranean diet and participants were provided with daily menus ([Supplemental Table 1](#)). Around 80% of total proteins came from lean animal sources like lean meat (leg and shoulder of *rasa aragonesa* lamb, chicken or turkey), low-fat dairy or fish. Dieticians performed individual consultations every 2 weeks to reinforce the intervention and to motivate weight loss. If the subject had achieved a significant weight loss, a 100–200 kcal further restriction was added to the prescribed diet to compensate basal metabolic rate change. We did not prescribe diets containing less than 1200 kcal (5020 kJ)/day since nutritional requirements could be not reached.

Despite dietary intervention was the main target of the intervention, all participants were provided with general physical-activity advice that was in accordance with their physical status. Patients were counseled to increase exercise in each monitoring visit based on the training reported in each visit to promote weight loss. Physical activity advice was quite heterogeneous due to the different fitness conditions of subjects (i.e.: walk 1 h a day or running 30 min three times a week).

Main study outcomes were assessed at 3-time points: baseline, after 3 and 6 months of dietary intervention. They included anthropometric, clinical and biochemical parameters and dietary and exercise evaluation. Participants were asked to complete a 3-day weighed food record before each visit to focus their dietary intervention, to monitor dietary changes, and to check compliance with the diet during the study. Dietary analysis was performed by EasyDiet<sup>®</sup> (Biocentury, S.L.U, Barcelona, Spain) which is based on Spanish food-composition tables [15]. The International Physical

Activity Questionnaire (IPAQ) – a brief validated exercise questionnaire – was administered at baseline and after 3 and 6 months to monitor activity changes [16].

#### *Anthropometric and clinical parameters*

Body weight was measured in subjects without shoes to the nearest 0.1 kg with a calibrated scale (Seca 813, Seca Deutschland®, Hamburg, Deutschland). Height was assessed to the nearest 0.1 cm with a wall-mounted stadiometer (Seca 217, Seca Deutschland®, Hamburg, Deutschland). BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Waist circumference was measured with anthropometric tape midway between the lowest rib and the iliac crest. Body composition was assessed via bioelectrical impedance through the bipolar foot-to-foot technique (Tanita TBF 410 GS, Omron Corporation®, Tokyo, Japan) [17]. Visceral fat depots were analyzed by means of bioelectrical impedance (“Tanita ViScan” AB-140, Omron Corporation®, Tokyo, Japan). As established by the manufacturer, visceral measurement is expressed on a scale of 1–35 levels and the interpretation of the results would be: a) average (when visceral fat level ranges from 1.0 to 12.5); b) high (when visceral level ranges from 13.0 to 17.5); c) very high (when visceral fat level is over 18.0). Based on manufacturer's validation studies, a level of 13.0 generally correlates to a visceral fat area of 130 cm<sup>2</sup> as measured by computerized tomography and X-ray. All measurements were taken in accordance with the recommended guidelines: no food or drink 3 h prior to measurements, no exhausting exercise 12 h prior to measurements, and no alcohol or caffeine consumption 24 h prior to measurements. Blood pressure was measured in triplicate with a validated semiautomatic oscillator (Omron M3, Omron Cop; Hoofddorp, the Netherlands).

#### *Biochemical parameters*

Blood samples were drawn by venipuncture after 12 h fasting. The levels of total cholesterol, triglycerides, and HDL cholesterol, uric acid, gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) were measured in serum with standard enzymatic methods, all of them on a Beckman Coulter AU analyser (Beckman Coulter, USA). Total cholesterol was quantified by the esterase-oxidase-4-aminoantipyrine method. Triglycerides were determined by the lipase-peroxidase method. HDL cholesterol was determined by direct method (non-apoB lipoproteins). Uric acid was quantified by the uricase method. The kinetic determination of gamma-glutamyl transpeptidase activity was measured by the change in absorbance at 410/480 nm, according to the methodology recommended by the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). The kinetic determination of glutamic pyruvic transaminase was measured by the decrease in absorbance due to the consumption of NADH at 340 nm, according to IFCC. LDL cholesterol levels were estimated with the Friedewald formula when serum triglycerides were <400 mg/dL. The levels of non-HDL cholesterol were calculated as the levels of total cholesterol minus the levels of HDL cholesterol. Blood glucose levels were measured in serum with the glucose hexokinase G-6-PDH method on a Beckman Coulter AU analyser (Beckman Coulter, USA). Insulin levels were determined in serum by a chemiluminescent micro-particle immunoassay (CMIA, Abbott Architect, USA). We used homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) as a marker for insulin resistance. HOMA-IR was estimated as fasting glucose (mg/dL) × insulin (μU/mL)/405. HbA1c levels were determined in plasma by high-performance liquid chromatography (HPLC). C-reactive protein (CRP) was determined in serum by nephelometry using IMMAGE-Immunochemistry System (Beckman Coulter, USA). Subjects also collected a spot urine sample in

which urea nitrogen concentrations were determined by the urease-GLDH method on a Beckman Coulter AU analyser (Beckman Coulter, USA). This parameter was used as surrogate marker of protein intake to assess dietary compliance [18].

We determined leptin, adiponectin and Retinol Binding Protein 4 (RBP4) as relevant adipokines related to weight loss according to previous studies [19,20]. Adipokine profiles were determined in plasma using the Human Adipokine Magnetic Bead Panel 1 (Adiponectin), Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2 (Leptin) and Human Kidney Injury Magnetic Bead Panel 6 (RBP4) protocols from the MILLIPLEX® MAP Kits (Cat. #. HADK1MAG-61K, HADK2MAG-61K, HKI6MAG-99K, Millipore) according to manufacturer's instructions. Analyses were performed by duplicate and plasma sample dilutions were done according to the detection range of each panel. Assay sensitivities were 0.013 ng/mL for RBP4, 19 pg/mL for leptin and 11 pg/mL for adiponectin. Intra-assay precision (mean of % CV) was <10% for RBP4, 5 for leptin and 4 for adiponectin while inter-assay precision (mean of % CV) was <10% for RBP4, 13 for leptin and 10 for adiponectin. Accuracy was 104% of recovery in plasma samples for RBP4, 96% of recovery in plasma samples for leptin and 89% of recovery in plasma samples for adiponectin.

#### *Statistical analyses*

HOMA-IR was established as the main outcome and its variability was estimated as 2 units. We expected a difference of HOMA-IR change after dietary intervention of 25% among diet groups according to previous findings [10]. A total sample size of 41 subjects per group was obtained by considering 80% power ( $Z\beta$  unilateral = 0.842) to detect a difference between treatment groups and a confidence interval ( $1 - \alpha$ ) of 90% ( $Z\alpha$  unilateral = 1.645). All subjects who completed the study were included in the data analysis, independent of reported dietary compliance, as indicated by food records, or weight loss according to intention-to-treat analysis. Thus, we included all subjects who attended to 3 and 6-month visits regardless of study intervention compliance. Continuous variables are expressed as mean ± SD or mean (95% confidence interval) when normally distributed or as median [25th percentile–75th percentile] or mean ± interquartile range otherwise. Categorical variables are reported as percentages. Differences in continuous variables were calculated by *t*-test or Mann–Whitney test, as appropriate, while categorical variables were compared using the chi-square test. Pearson or Spearman tests were used to analyze correlation between changes in adipokines concentration and other clinical and biochemical variables. Differences across dietary intervention within diet group were calculated by repeated measures ANOVA or Friedman tests as applicable. We used multiple linear regressions to evaluate the impact of: a) the type of diet on glucose metabolism parameters and adipokine concentration by adjusting weight loss and other confounding factors (gender, baseline visceral fat, weight loss, metformin use (yes/no), baseline concentrations of glucose and HbA1c in fully-adjusted model); b) weight loss and type of diet on the relation between adipokine and cardiometabolic changes. All statistical analyses were performed with SPSS version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and significance was set at  $P < 0.05$ .

## **Results**

### *Participants*

Among 100 subjects that performed randomization visit, 80 were finally randomized to one of two reduced-calorie diets of whom 67 completed the whole study intervention. Seven

participants (8.75% of all participants, 5 and 2 from SP and HP groups respectively) withdrew from the study during the first 3 months and six subjects (7.50% of all participants, 3 from each diet group) withdrew during the next three months. Withdrawal reasons included: personal issues (N = 6), change of place of residence (N = 1) and unknown reasons (N = 6). Subjects who withdrew from the study did not differ from the remaining participants in terms of any clinical characteristics at baseline according to sensitivity analysis. The complete study flow chart is shown in Fig. 1.

Both diet groups did not differ in terms of clinical and biochemical characteristics ( $P \geq 0.05$  for all variables among diet groups) except for visceral fat. Those subjects randomized to the HP group had higher visceral fat level than those following the SP diet. Distribution of gender was homogeneous ( $P = 0.185$ ) by including 43 women (58.9%) and 30 men (41.1%). Participants were mostly middle-aged ( $55.6 \pm 8.37$ ) with a mean BMI of  $32.8 \text{ kg/m}^2$  ( $P = 0.288$  between groups) who showed high fat mass, visceral fat and other clinical and biochemical characteristics expected according to inclusion and exclusion criteria. Metformin use did not differ between groups at the beginning of the study and it was maintained stable across the study. Baseline characteristics are included in Table 1.

#### Weight loss and body composition

Mean weight loss was  $-6.81 \pm 3.82\%$  at 3-month visit and  $-8.79 \pm 5.15\%$  at 6-month visit by including statistically significant differences across the study in both diets. However, there was not significant difference between diets. Differences in weight loss between diets were similar than those reported in previous studies comparing SP and HP diets. Lack of statistical significance could be due to the small sample size that was calculated to explore changes in glucose homeostasis not in body weight variation. Similar trends were observed in fat-free mass and fat mass change after dietary intervention between diet groups. Visceral fat showed a greater decrease in subjects following HP diet comparing to those

randomized to HP diet which was especially relevant in 3-month visit ( $P = 0.069$ ). These differences remained after adjusting by baseline visceral fat levels.

#### Glucose metabolism parameters

Glycemic control showed a greater improvement in subjects consuming a HP diet which was especially remarkable in insulin, HOMA-IR index and HbA1c (Table 2 and Supplemental Table 2). The decrease in fasting plasma glucose concentration was markedly greater in those subjects following HP diet than in those following SP diet although it was just statistically significant after 6-months of dietary intervention (weight loss adjusted- $P = 0.013$ , Fig. 2). Statistical significance disappeared after adjusting by metformin treatment, gender, baseline visceral fat, baseline concentration of glucose, baseline concentration of HbA1c, and weight loss (full model adjustment  $P = 0.053$ ). Those participants following HP diet showed higher insulin decrease than those in SP group both at 3 and 6-months (weight loss adjusted- $P = 0.014$  and  $P = 0.007$  respectively). Statistical difference kept after fully-adjusted at 6-month visit (B [95% CI]:  $19.4 [6.21-32.5]$ ,  $P = 0.005$ , corrected  $R^2 = 0.38$ ) but disappeared at 3-month visit ( $P = 0.054$ ). Participants following HP diet had higher reduction of HOMA-IR than those following SP diet after 3-month intervention (weight loss adjusted- $P = 0.016$ ) and after 6-month intervention (weight loss adjusted- $P = 0.001$ ). Fully-adjusted model showed statistical impact of diet on HOMA-IR variation after 6 months (B [95% CI]:  $21.6 [7.82-35.4]$ ,  $P = 0.003$ , corrected  $R^2 = 0.40$ ) but not at 3-month visit ( $P = 0.099$ ). HbA1c diminished more in those subjects following HP diet after 3-months of weight loss intervention while statistical differences disappeared at 6-months visit. However, statistical differences disappeared after adjusting by body weight reduction ( $P = 0.051$ ) and in fully-adjusted model ( $P = 0.115$ ). The effect of type of diet on glucose metabolism did not significantly differ according to baseline concentration of each parameter (glucose, HbA1c, insulin and HOMA-IR) and the use of metformin (data not shown).

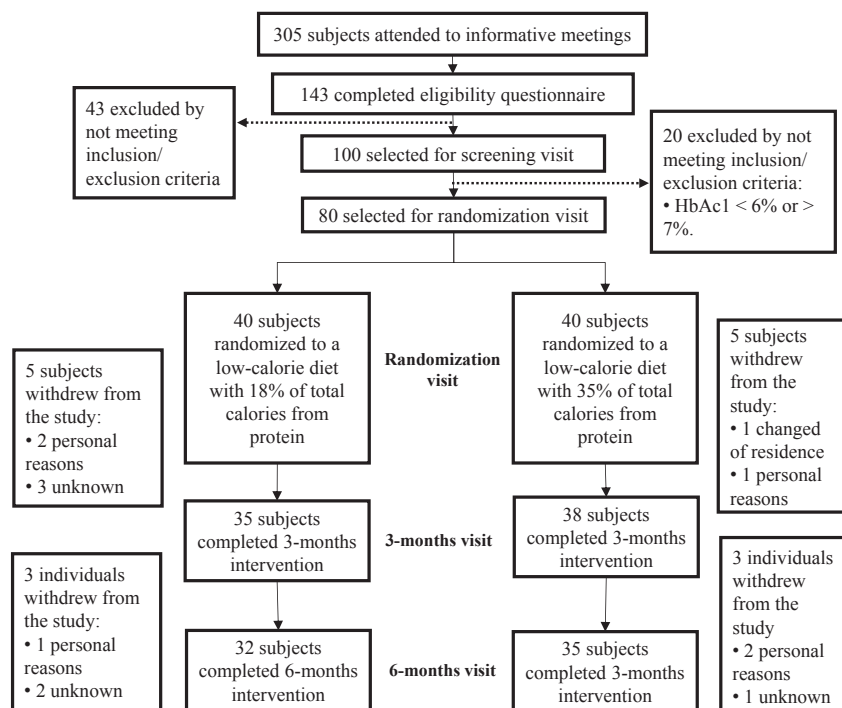


Fig. 1. Schematic representation of randomization and study course. BMI denotes body mass index and HbA1c denotes glycated hemoglobin.

**Table 1**  
Baseline clinical and biochemical characteristics according to diet group.<sup>a</sup>

	SP diet n = 35	HP diet n = 38	P <sup>b</sup>
Age, years	54.6 ± 8.11	56.5 ± 8.59	0.322
Gender (men), n (%)	12 (34.3)	20 (47.4)	0.185
Weight, kg	86.3 ± 11.8	91.4 ± 12.7	0.082
BMI, kg/m <sup>2</sup>	32.3 ± 3.70	33.2 ± 3.63	0.288
Waist circumference, cm	109 ± 8.98	110 ± 9.37	0.565
Fat mass, kg	32.6 ± 7.39	35.9 ± 9.32	0.097
Fat free mass, kg	51.2 ± 15.7	53.0 ± 15.2	0.415
Visceral fat, level	12.2 ± 3.49	14.9 ± 5.23	0.019
Systolic blood pressure, mmHg	134 ± 13.9	134 ± 14.5	0.984
Diastolic blood pressure, mmHg	82.9 ± 6.97	86.9 ± 9.86	0.069
Metformin, n (%)	12 (36.4)	13 (35.1)	0.915
Total cholesterol, mg/dL	215 ± 38.8	224 ± 47.4	0.382
HDL cholesterol, mg/dL	50.7 ± 9.81	54.3 ± 11.9	0.168
Triglycerides, mg/dL	184 ± 88	164 ± 108	0.899
LDL cholesterol, mg/dL	132 ± 29.4	136 ± 37.9	0.635
Apolipoprotein B, mg/dL	115 ± 28.9	124 ± 38.6	0.261
Glucose, mg/dL	113 ± 18.0	116 ± 17.1	0.409
Insulin, µU/mL	14.9 ± 11	15.6 ± 10	0.851
HOMA-IR	4.37 ± 3.47	4.52 ± 2.82	0.622
HbA1c, %	6.11 ± 1.00	6.38 ± 1.00	0.319
GGT, U/L	41.9 ± 33.0	44.0 ± 36.0	0.592
ALT, U/L	29.9 ± 18.0	32.5 ± 18.0	0.404
Uric acid, mg/dL	6.05 ± 1.43	6.07 ± 1.22	0.956
Blood urea, mg/dL	37.9 ± 16.0	35.7 ± 13.0	0.436
Urine urea, g/L	24.0 ± 20.9	17.3 ± 9.08	0.105
Urine albumin-to-creatinine ratio, mg/g creatinine	6.53 (4.46–8.60)	6.10 (4.92–12.3)	0.070
Glomerular filtration rate, mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	92.0 ± 15.6	93.2 ± 18.3	0.773
CRP, g/L	4.04 ± 3.00	5.75 ± 5.00	0.962
RBP4, mg/L	25.9 ± 7.94	25.6 ± 10.1	0.885
Adiponectin, pg/µL	13,094 ± 7,086	13,059 ± 9,198	0.554
Leptin, pg/µL	23.1 ± 21.1	27.8 ± 24.8	0.404
Physical activity level, METs/min	712 ± 1040	1112 ± 1856	0.046

<sup>a</sup> Values are mean ± SD or median (25th percentile–75th percentile) as applicable. ALT, alanine aminotransferase; BMI; Body mass index; CRP; C-reactive protein; GGT, gamma glutamil transferase; HbA1c, glycated hemoglobin; HOMA-IR, Homeostasis model assessment of insulin resistance; HP, High protein; RBP4, Retinol Binding Protein 4; SP, Standard protein. All biochemical variables refer to fasting serum concentrations except for adipokines, which were determined in plasma, and those specifically indicated that were measured in urine.

<sup>b</sup> P refers to differences calculated by t-test, U-Mann–Whitney or chi-squared test, as appropriate.

In a sensitive analysis, we assessed by multiple regression analysis the effect of total protein consumption reported by participants (mean across intervention) on glucose metabolism parameters in weight loss and fully-adjusted models. We found that total protein consumption (mean of protein reported along the study, expressed as g/day) directly and significantly influenced HOMA-IR variation both at 3 and 6-months ( $P = 0.036$  and  $P = 0.019$ , respectively, in the fully adjusted model) and insulin variation both at 3 and 6-months ( $P = 0.029$  and  $P = 0.017$ , respectively, in the fully adjusted model). We did not observe significant association of carbohydrates consumption along the study and variation in any parameter of glucose homeostasis.

#### Other cardiometabolic parameters

The lipid profile homogeneously improved in both diet conditions, mainly due to an improvement in the triglyceride levels. Subjects consuming HP diet showed a higher decrease in apolipoprotein B concentration after 3-months of weight loss intervention ( $P = 0.047$  after adjusting by weight loss). CRP and liver enzymes significantly decreased in both diets although we did not find statistical differences between diets.

Systolic and diastolic blood pressure significantly decreased across intervention only in subjects in HP diet, although we just observed statistical differences between diets for diastolic blood pressure at 3-months assessment ( $P = 0.049$  after adjusting by weight loss).

#### Adipokine concentration

RBP4 significantly decreased after dietary intervention both in SP and HP groups although no significant differences between diet groups were found (Table 3). Adiponectin increased more than double in HP group with respect to SP group although no statistically significant differences were denoted between diets. We neither found statistical differences after adjusting by weight loss. Leptin homogeneously decreased in both diets ( $P < 0.001$  in both diet groups across intervention).

Leptin reduction showed the highest correlation with weight loss ( $r = 0.59$  and  $r = 0.76$  at 3 and 6-months) (Supplemental Table 3). Adiponectin inversely and moderately correlated with weight loss, while RBP4 only positively correlated with body weight change after 6-months of dietary intervention. Quite similar results were observed for body composition change correlation with adipokine concentrations change. Correlations between adipokines concentration and cardiometabolic and other biochemical parameters (although some of them did not significantly change across the study) are also shown in Supplemental Table 3. Adiponectin change inversely correlated with glucose, HbA1c and HOMA-IR changes while leptin reduction directly correlated with all glucose metabolism parameter reductions. RBP4 reduction directly correlated with total cholesterol and LDL cholesterol changes. Adiponectin concentration change was directly correlated with HDL cholesterol and CRP after 6-months of intervention although it was not observed at 3-month visit. Leptin was positively associated to triglycerides, apolipoprotein B, GGT and CRP changes

**Table 2**  
Changes in clinical and biochemical characteristics after 3 and 6 months of dietary intervention according to diet group.<sup>a</sup>

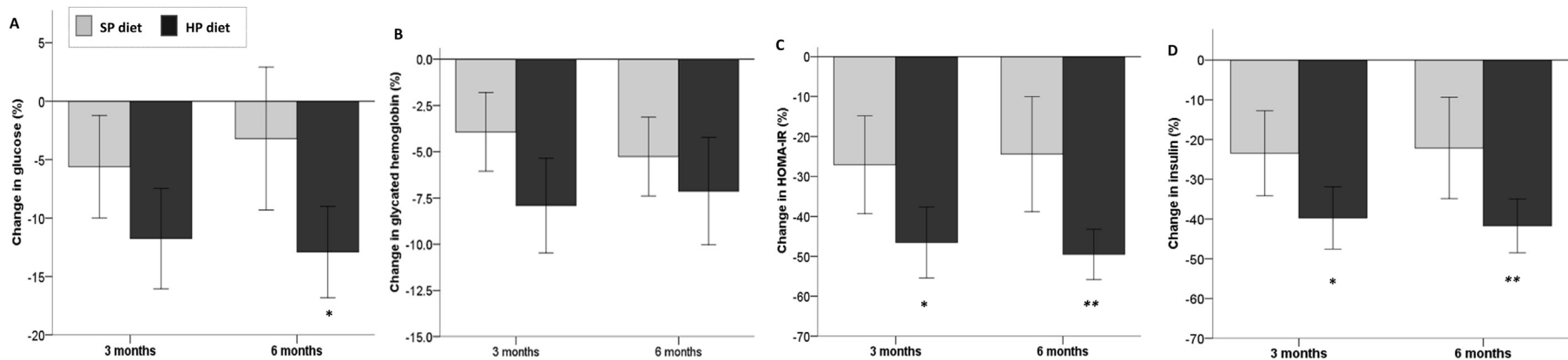
	SP diet			HP diet			P Δ% SP vs HP diets at 3 months <sup>c</sup>	P Δ% SP vs HP diets at 6 months <sup>d</sup>
	% Change from randomization to 3 months n = 35	% Change from randomization to 6 months n = 32	P-trend across dietary intervention <sup>b</sup>	% Change from randomization to 3 months n = 38	% Change from randomization to 6 months n = 35	P-trend across dietary intervention <sup>b</sup>		
Weight	-6.48 ± 3.93	-8.36 ± 5.03	<0.001	-7.12 ± 3.75	-9.20 ± 5.31	<0.001	0.485	0.519
BMI	-6.14 ± 4.36	-7.95 ± 5.32	<0.001	-7.08 ± 3.77	-9.15 ± 5.32	<0.001	0.327	0.362
Waist circumference	-4.96 ± 3.98	-7.06 ± 5.58	<0.001	-4.95 ± 4.72	-6.28 ± 5.28	<0.001	0.996	0.581
Fat mass	-10.1 ± 13.5	-13.4 ± 28.3	0.010	-14.5 ± 14.2	-16.9 ± 18.9	<0.001	0.217	0.559
Fat free mass	-3.11 ± 3.58	-3.92 ± 4.82	<0.001	-3.37 ± 3.69	-2.90 ± 4.07	<0.001	0.788	0.383
Visceral fat	-8.71 ± 12.5	-11.1 ± 21.1	<0.001	-12.5 ± 10.6	-12.5 ± 13.6	<0.001	0.069	0.885
Systolic blood pressure	-2.95 ± 11.3	-4.22 ± 11.6	0.099	-4.94 ± 10.2	-5.71 ± 9.06	0.005	0.380	0.597
Diastolic blood pressure	-1.64 ± 11.6	-2.54 ± 12.1	0.488	-7.57 ± 10.6	-6.62 ± 10.5	<0.001	0.043	0.187
Total cholesterol	-4.32 ± 10.6	-1.23 ± 14.8	0.010	-7.39 ± 10.6	-3.35 ± 10.8	<0.001	0.227	0.488
HDL cholesterol	-1.30 ± 11.9	4.23 ± 14.4	0.066	-1.20 ± 11.0	3.89 ± 14.1	0.104	0.971	0.924
Triglycerides	-18.9 ± 37.1	-15.0 ± 42.7	0.001	-21.8 ± 26.3	-19.0 ± 30.0	0.001	0.705	0.668
LDL cholesterol	0.56 ± 13.6	2.68 ± 20.9	0.927	-4.31 ± 11.1	-0.84 ± 15.2	0.081	0.123	0.462
Apolipoprotein B	-6.56 ± 15.3	-13.6 ± 26.3	<0.001	-14.2 ± 12.2	-13.8 ± 13.3	<0.001	0.025	0.966
Glucose	-6.45 ± 12.6	-1.24 ± 19.8	0.021	-10.6 ± 12.0	-12.9 ± 11.0	<0.001	0.159	0.004
Insulin	-23.4 ± 27.7	-20.6 ± 34.6	<0.001	-37.7 ± 21.3	-41.7 ± 18.1	<0.001	0.021	0.004
HOMA-IR	-27.1 ± 31.9	-20.5 ± 43.8	<0.001	-43.5 ± 24.8	-49.5 ± 16.9	<0.001	0.023	0.001
HbA1c	-3.20 ± 5.86	-4.88 ± 5.60	<0.001	-5.50 ± 6.02	-6.25 ± 8.46	<0.001	0.003	0.235
GGT	-13.1 ± 42.2	-14.5 ± 44.8	<0.001	-22.9 ± 22.1	-18.7 ± 29.9	<0.001	0.220	0.658
ALT	-12.3 ± 38.8	-15.0 ± 38.1	0.001	-22.5 ± 27.6	-21.6 ± 31.5	<0.001	0.203	0.443
Uric acid	-2.01 ± 12.0	-4.47 ± 17.0	0.015	-4.02 ± 10.4	-6.07 ± 10.9	0.001	0.453	0.651
Blood urea	0.04 ± 15.1	4.67 ± 23.0	0.631	14.8 ± 27.6	17.9 ± 24.7	<0.001	0.007	0.029
Urine urea	-25.7 ± 90.7	-12.3 ± 61.8	0.496	6.09 ± 93.0	14.6 ± 63.5	0.714	0.294	0.147
Urine albumin-to-creatinine ratio creatinine	-28.2 ± 93.1	-7.74 ± 67.4	0.056	-42.3 ± 84.2	-17.5 ± 95.4	0.120	0.510	0.993
Glomerular filtration rate	4.83 ± 7.58	3.23 ± 10.5	0.051	1.52 ± 15.3	0.98 ± 12.5	0.891	0.279	0.448
CRP	-20.8 ± 50.3	-43.5 ± 88.8	0.004	-15.0 ± 34.1	-28.6 ± 40.7	<0.001	0.348	0.304
Physical activity level	40.4 ± 127	77.3 ± 191	0.001	14.1 ± 103	40.0 ± 152	0.010	0.636	0.383

<sup>a</sup> Values are mean ± SD or median ± interquartile range as applicable. ALT, alanine aminotransferase; CRP; C-reactive protein; GGT, gamma glutamyl transferase HbA1c, glycated hemoglobin; HOMA-IR, Homeostasis model assessment of insulin resistance; HP, High protein; SP, Standard protein. All biochemical variables refer to fasting serum concentrations except for those specifically indicated that were measured in urine.

<sup>b</sup> P refers to differences across dietary intervention within diet group what was calculated by repeated measures ANOVA or Friedman tests as applicable.

<sup>c</sup> P refers to differences (% change with respect to baseline) between diet groups what was calculated by t-test or U-Mann-Whitney test as applicable.

<sup>d</sup> P refers to differences (% change with respect to baseline) between diet groups what was calculated by t-test or U-Mann-Whitney test as applicable.



**Fig. 2.** Change in glucose metabolism parameters after 3 and 6 months of dietary intervention according to type of diet. Change in A) glucose; B) HbA1c; C) HOMA-IR; D) insulin concentration after 3 and 6 months of dietary intervention according to type of diet. HP, High protein; SP, Standard protein. \* $P < 0.05$  in weight-loss adjusted model comparing both diets at that visit and \*\* $P < 0.05$  in weight-loss adjusted model and in fully adjusted model (weight loss, baseline visceral fat, metformin treatment (yes/no) and baseline concentrations of glucose and HbA1c) comparing both diets at that visit.



**Table 3** Plasma adipokines concentration change after 3 and 6 months of dietary intervention according to diet group.<sup>a</sup>

	SP diet			HP diet			
	3 months n = 35	6 months n = 32	3 months n = 38	6 months n = 35	3 months n = 38	6 months n = 35	
	Mean (CI)	Mean (CI)	Mean (CI)	Mean (CI)	Mean (CI)	Mean (CI)	
	Average change from baseline	-8.32 (-17.0, 0.35)	-3.06 (-14.7, 8.56)	0.031	-8.89 (-16.8, 0.35)	-	0.024
RBP4	Model 1: raw	Ref.	Ref.	-	-3.40 (13.9, 7.12)	0.521	0.591
	Model 2: adjusted for weight loss	Ref.	Ref.	-	-3.20 (13.8, 7.44)	0.550	0.285
Adiponectin	Average change from baseline	6.05 (-4.01, 16.1)	23.7 (10.6, 36.7)	<0.001	29.9 (0.07, 58.1)	-	<0.001
	Model 1: raw	Ref.	Ref.	-	19.8 (-8.50, 48.0)	0.167	0.114
Leptin	Model 2: adjusted for weight loss	Ref.	Ref.	-	17.5 (-10.6, 45.6)	0.219	0.184
	Average change from baseline	-37.6 (-45.6, -29.6)	-33.5 (-42.7, -24.3)	<0.001	-36.0 (-45.3, -26.8)	-	<0.001
	Model 1: raw	Ref.	Ref.	-	0.99 (-11.2, 13.2)	0.872	0.927
	Model 2: adjusted for weight loss	Ref.	Ref.	-	4.19 (-5.51, 13.9)	0.392	0.136

<sup>a</sup> Values are percentage with respect to baseline and are expressed as means (95% confidence interval). Dif. denotes difference and refers to the difference HP vs SP. HP, High protein; RBP4, Retinol Binding Protein 4; SP, Standard protein.

<sup>b</sup> P refers to significance of adipokine change across intervention within dietary group. It is calculated by repeated measures ANOVA or Friedman tests as appropriate.

<sup>c</sup> P refers to significance of adipokine change comparing to SP diet which was calculated by multiple linear regression.

although these relationships disappeared after adjusting by weight loss. Linear regression models showed that: a) all these significant associations disappeared after adjusting by weight loss except for the relation between adiponectin with HbA1c changes; b) the type of diet did not show any significant impact on the association between adipokine and cardiometabolic changes.

#### Study intervention adherence

Urine urea concentration decreased during intervention in SP diet while it increased in those subjects randomized to HP diet (Table 2). We calculated a urine urea/weight (kg) ratio to normalize this variable for body weight. A decrease in the urine urea/body weight ratio ( $-23.6 \pm 10.4\%$  and  $-6.99 \pm 66.7\%$  after 3 and 6-months respectively) was observed in SP group while it increased ( $10.2 \pm 99.6\%$  and  $33.3 \pm 71.9\%$  after 3 and 6-months respectively) in HP group ( $P = 0.327$  and  $P = 0.090$  comparing SP and HP diets at 3 and 6-month visits). Blood urea increased more across intervention in subjects in HP group ( $P = 0.007$  and  $P = 0.029$  at 3 and 6-months). These data showed a quite different consumption of protein in both groups by suggesting a correct adherence to prescribed diets.

Physical activity significantly increased during intervention in both diet groups. Exercise homogeneously increased across the study without showing statistically significance between groups.

#### Discussion

The main finding of this study is that an energy-restricted diet containing 35% of total calories coming from protein, mainly from animal source, leads to a greater glucose metabolism improvement, especially observed in HOMA-IR, irrespective of weight loss in subjects with prediabetes or early stages of T2DM comparing to a diet with an 18% of total energy from protein energy-restricted diet. Adipokine concentration significantly and homogeneously decreased after dietary intervention in both diets, so the effect of the energy-restricted HP diet probably cannot be explained by changes in the adipose tissue functionality.

The results of our study are in agreement with a meta-analysis aimed to explore the effect of a HP diet (25–32% of total calories coming from protein) or a SP diet (15–20% of total calories coming from protein) on glucose and HbA1c in subjects with T2DM [12]. Results showed that HP diets resulted in more HbA1c decrease ( $-0.52\%$ ; 95% CI:  $-0.90, -0.14$ ) although they did not find statistical significance in fasting blood glucose levels. We also observed higher HbA1c concentration decreases in those participants following HP diet ( $-6.25\%$  vs  $-4.88\%$  in HP and SP diets respectively) although we neither found statistical differences between diets after weight loss adjustment. Our results did show a glucose reduction enhance-ability of a HP diet compared to an SP diet even after adjusting by weight loss. Some important factors differ our study from previous studies included in the meta-analysis which could determine our findings. First, HP diet in our study involved a 35%-energy coming from protein while HP diets included in previous studies were up to 32% of total calories coming from protein. Higher protein consumption could lead to superior effects since a dose-dependent metabolic effect of proteins has previously been described [6,21,22]. Second, the majority of the studies included in the meta-analysis had a short duration which could be insufficient to detect significant differences in glucose metabolism outcomes. Third, participants from our study had prediabetes or new-onset diabetes, which are early stages of T2DM with certain insulin secretory capacity preservation. It has been established that those patients with short duration of T2DM may benefit from more aggressive targets and better glycemic control lead to higher rates

of diabetes remission and/or lower risk of recidivism within these subjects. Several studies have demonstrated that weight loss improves cardiometabolic parameters especially in early stages of the disease [5]. Our findings confirm that HP diets lead to significant benefit on glucose metabolism in prediabetic and early diagnosed T2DM subjects who would benefit from a high intensity target. However, further research is needed to confirm it glycemic control enhance ability of HP diets would also be observed in subjects with T2DM of long duration.

The mechanism responsible for glucose metabolism-induced improvements of HP diets is not yet known. Our findings show that a HP diet lead to the largest reductions in HOMA-IR and insulin concentrations by pointing out the improvement in insulin resistance as a key factor in physiological effects of protein intake. Few other small-sample studies have explored the effect of energy-restricted HP diets on these outcomes in T2DM with divergent results [23–26]. Gannon et al. compared the effect of a HP diet (30% of total calories coming from protein) with a SP diet (15% of total calories coming from protein) for 5 weeks [23]. Authors observed significant differences between both diets in HbA1c concentrations but not in HOMA-IR. However, another study found a 75%-insulin sensitivity improvement in 10 obese subjects with TD2M following a 14-day diet with a low percentage of carbohydrates but HP content [24]. Other studies carried out in non-diabetic subjects also reported opposing findings on the effect of HP diets on insulin and HOMA-IR [7,10,27].

Elucidating the mechanisms mediating insulin resistance improvement deserves special attention. Many studies have focused on the effect of HP diets on incretins secretion, like GLP-1 or GIP, which have an important impact in glucose metabolism regulation and satiety [28]. Recently, some studies have proposed reductions of pro-inflammatory adipokine concentrations while increments in anti-inflammatory adipokine concentrations after weight loss through HP diets [19]. Thus, HP content diets could lead to an adipose tissue functionality improvement, which may mediate the cardiometabolic profile improvement. Our study is the first one to compare the effect of different protein content in an energy-restricted diet on adipokine concentration in subjects with IFG or T2DM. The results showed that both HP and SP diets homogeneously improved adipokine concentration which was directly related to weight loss. Despite we found no statistically significant differences between diets, we observed a tendency in adiponectin variation after weight loss since those subjects consuming the HP diet had more than double increase in adiponectin concentration than those randomized to SP diet. Adiponectin exhibits anti-atherogenic, insulin-sensitizing and anti-inflammatory properties [29,30]. Some authors have described an increase in its concentration after weight loss in non-diabetic subjects while others have not found any significant change [19]. Our data do not support adipokine profile change as the key mechanism mediating glucose metabolism-enhance ability of HP diets. However, further research is needed to confirm adiponectin findings and other less common adipokines by taking other possible confounder factors like study duration or protein sources.

Total calories of a diet directly impact the absolute protein amount of protein that is consumed [31]. Thus, a 35%-protein within a 1800 kcal (7530 kJ) diet involves 158 g of protein per day while the same diet would imply 105 g of protein per day in a 1200 kcal (5020 kJ) diet. Thus, it is essential to state the absolute protein quantity regardless of calorie content of diet and protein sources determining its quality. Protein source could also play an essential role in its physiological effect. When consumed in excess of postprandial protein synthesis, amino acids can readily be used as substrate for oxidation [31]. If protein oxidation provides more

ATP than the liver could use, amino acids could lead to hepatic gluconeogenesis or they can be converted into ketone bodies through ketogenesis. Threonine or isoleucine can be converted into either glucose or ketone bodies, whereas lysine and leucine are strictly ketogenic and therefore not used as a substrate for gluconeogenesis. Thus, differential impact on glucose metabolism of different protein foods is clear. Few studies have described the differential effect of vegetal and animal proteins in metabolic effect of proteins and it has not been previously explored in subjects with IFG or T2DM [32,33]. Prescribed diets in our study include >150 g/day of protein coming mainly from animal sources which could be a key element in the insulin resistance improvement we found in those subjects consuming the HP diet.

Considering that the diets of this trial had the same amount of fat and they just differed in protein and carbohydrates, the impact of each macronutrient in the results deserves special attention. If the low content in carbohydrate in the diet has a role in the cardiometabolic beneficial effect within HP diets cannot be discarded. However, the studies exploring the potential benefits of low-carbohydrate diets on glucose metabolism in absence of HP do not shown consistent results [34,35], in contrast with HP trials [7,9,12]. Furthermore, in our study the protein content in the diet was an independent factor associated to insulin resistance improvement but carbohydrate content was not. Further long-term studies exploring the independent effect of each macronutrient should be carried out to elucidate this issue.

Our study has some limitations worth mentioning. The mid-term intervention design could have influenced findings, although most interventional studies that have explored the effect of HP diets on glucose metabolism in diabetic subjects have a shorter time frame. The relatively small sample size could have limited the significance of the effect of HP in some outcomes. We have not assessed incretins and other glucose-related metabolites which are also proposed as potential mediators for glucose metabolism improvement effect of protein consumption. We have studied a limited number of adipokines, though we selected those accumulating more evidence on glucose metabolism. Diet compliance and physical activity were assessed by self-reported questionnaires which is a limitation. We assessed urine nitrogen in a spot sample which is established as a good surrogate biomarker of protein consumption [18]; however, the determination of 24 h urinary nitrogen would have provided a more reliable measurement of protein intake and patient's nitrogen balance. Accelerometry would have also provided a more accurate physical activity assessment. It is also difficult to discern if our findings could be entirely due to high protein consumption or lower carbohydrates intake which is inherent due to the stable fat content. Finally, to analyze the total years of prediabetes or T2DM duration would have been useful to explore if this factor, determining the pancreatic insulin reserve, could directly impact the effect of HP diets effect on glucose metabolism, as previously stated.

In conclusion, an energy-restricted diet containing 35% of total calories coming from protein (mean of 1.34 g/kg/day), mainly from animal source, and low in carbohydrates, leads to a greater glucose metabolism improvement, especially observed in HOMA-IR, irrespective of weight loss in subjects with IFG or early stages of T2DM comparing to a diet with an 18% of total energy from protein (mean of 0.75 g/kg/day) energy-restricted diet. This effect was not explained by changes in plasma concentrations of adipokines. Further research is crucial to confirm the mechanisms responsible for the beneficial effect of HP diets on glucose metabolism by elucidating the role of protein source and the exact and absolute protein amount leading to this improvement.



# Behavioural cardiovascular risk factors and prevalence of diabetes in subjects with familial hypercholesterolaemia

Sofia Perez-Calahorra<sup>1</sup>, Fernando Civeira<sup>1,2</sup>,  
Pilar Guallar-Castillón<sup>3,4</sup>, Xavier Pinto<sup>5</sup>, José R Banegas<sup>3</sup>,  
Juan Pedro-Botet<sup>6</sup>, Manuel Suarez-Tembra<sup>7</sup>, Marta Mauri<sup>8</sup>,  
Cristina Soler<sup>9</sup>, Fernando Rodriguez-Artalejo<sup>3,4</sup> and  
Martín Laclaustra<sup>1,10</sup>

European Journal of Preventive  
Cardiology  
0(00) 1–12  
© The European Society of  
Cardiology 2020  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/2047487319896138  
journals.sagepub.com/home/cpr



## Abstract

A low prevalence of type 2 diabetes mellitus has been reported in familial hypercholesterolaemia. Whether a healthier lifestyle could explain it has not been explored. This cross-sectional study determines the prevalence of lifestyle-related cardiovascular risk factors in heterozygous familial hypercholesterolaemia (HeFH) from the Dyslipidaemia Registry of the Spanish Atherosclerosis Society and in the ENRICA study, a representative sample of the adult Spanish general population, weighted to match the age and sex distribution of the HeFH sample. A total of 2185 HeFH patients and 11,856 individuals from ENRICA were included. HeFH had lower body mass index and fewer of them were smokers than in the reference population. A model adjusted for age, sex and body mass index showed that HeFH more frequently had cardiovascular disease (odds ratio (OR) 23.98; 95% confidence interval (CI) 18.40–31.23) and hypertension (OR 1.20; 95% CI 1.07–1.35), and took anti-hypertensive medication (OR 1.36; 95% CI 1.18–1.56) and anti-diabetic medication (OR 1.25; 95% CI 1.00–1.56), but less frequently were smokers (OR 0.79; 95% CI 0.71–0.89). In a HeFH subsample ( $n = 513$ ) with complete blood glucose information, those patients without cardiovascular disease showed lower prevalence of smoking and type 2 diabetes mellitus, lower body mass index and glucose, and higher diastolic blood pressure than the Spanish population. The differences in type 2 diabetes mellitus were justified mostly by the difference in body mass index. Body mass index adjustment also showed higher prevalence of hypertension and use of anti-hypertensive drugs in HeFH. In summary, HeFH patients had lower body mass index, which may contribute to explaining the lower prevalence of diabetes, and lower current smoking but higher hypertension.

## Keywords

Familial hypercholesterolaemia, smoking, diabetes, hypertension, lifestyle

Received 11 October 2019; accepted 30 November 2019

<sup>1</sup>Lipid Unit, Hospital Universitario Miguel Servet, IIS Aragon, CIBERCV, Zaragoza, Spain

<sup>2</sup>Universidad de Zaragoza, Spain

<sup>3</sup>Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, University Autònoma of Madrid/Research Institute of University Hospital La Paz (IdiPAZ) and CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

<sup>4</sup>IMDEA Food Institute, CEI UAM+CSIC, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Lipid Unit and Vascular Risk Unit, Internal Medicine Service, Hospital de Bellvitge, CIBEROBN, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Servicio Endocrinología y Nutrición, Hospital del Mar and Departamento de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>7</sup>Lipid and Vascular Risk Unit, Hospital San Rafael, A Coruña, Spain

<sup>8</sup>Lipid Unit, Consorci Sanitari de Terrassa-Hospital de Terrassa, Spain

<sup>9</sup>Internal Medicine Department, Hospital de Santa Caterina de Salt, Parc Hospitalari Martí i Julià, Girona, Spain

<sup>10</sup>Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y Desarrollo (ARAID), Zaragoza, Spain

## Corresponding author:

Fernando Civeira, Unidad de Lípidos, Hospital Universitario Miguel Servet, Paseo Isabel La Católica 1-3, 50009, Zaragoza, Spain.  
Email: civeira@unizar.es

## Introduction

Familial hypercholesterolaemia is one of the most common genetic diseases worldwide.<sup>1</sup> The estimated prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia (HeFH) is one in every 200–250 persons<sup>2,3</sup> and it is even higher in areas with some genetic isolation.<sup>4</sup> Familial hypercholesterolaemia patients are characterized by very high plasma concentration of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol with autosomal co-dominant pattern of transmission, tendon xanthomas and high risk of premature coronary heart disease (CHD).<sup>5</sup> Most cases of familial hypercholesterolaemia are caused by mutations in the genes encoding for the LDL particle receptor (*LDLR*),<sup>6</sup> apolipoprotein B (*APOB*),<sup>7</sup> proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*)<sup>8</sup> and apolipoprotein E (*APOE*).<sup>9</sup> Untreated individuals have a markedly elevated long-term CHD risk, with hazard ratios up to 5.0 with respect to the general population and 100-fold increase in early CHD mortality in young adults.<sup>10,11</sup>

Several recent studies have found that patients with HeFH might be less prone to developing type 2 diabetes mellitus (T2DM).<sup>12,13</sup> This protection is puzzling because these patients are frequently treated with high doses of potent statins for long periods, and it is well established that hydroxy-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCR) inhibition increases the risk of T2DM.<sup>13</sup> Several observational studies<sup>14,15</sup> and a large meta-analysis of statin trials showed that statins increase the risk for new onset T2DM by 9–12% with a dose-dependent effect, supporting a causal relationship.<sup>16</sup> The mechanism of this apparent protection of HeFH for the development of T2DM is unknown. It has been hypothesized that a reduction of cholesterol uptake by pancreatic  $\beta$  cells in HeFH may improve insulin secretion.<sup>11,17</sup>

T2DM is the result of complex interactions between genetic and environmental factors. The genetic component is very polygenic in most cases, and attributable to modest deleterious effects of common regulatory gene variants present in the general population.<sup>18</sup> However, the genes causing familial hypercholesterolaemia have not been found associated with T2DM, neither in the genome-wide association studies<sup>19</sup> nor in exome sequencing of T2DM populations.<sup>20</sup> These data suggest that T2DM protection is not related with the primary defect of familial hypercholesterolaemia.<sup>21</sup>

On the contrary, some reports suggest that certain cardiovascular disease (CVD) risk factors could be diminished in the HeFH population, especially those related to healthy behaviours<sup>12,13</sup> such as diet and physical activity. Maintaining a healthy lifestyle throughout young adulthood is strongly associated with a low cardiometabolic risk later in life.<sup>22,23</sup> It is plausible that the low prevalence of T2DM in patients with HeFH could be related to a healthy lifestyle early in life, which can

modulate the risk of T2DM. Hence, the aim of this study is to assess the frequency of some behaviour-dependent CVD risk factors in patients with HeFH and compare it against the general population.

## Methods

### *Aim, design and participants*

This observational, multicentre, national study in Spain was designed to determine the prevalence of lifestyle-related cardiovascular risk factors in patients with HeFH and to compare it against that observed in the general population. Data on HeFH patients and general population information were obtained from the Dyslipidaemia Registry of the Spanish Atherosclerosis Society (SEA)<sup>24</sup> and the ENRICA study,<sup>25</sup> respectively. The Dyslipidaemia Registry of the SEA is an active online registry, where 65 certified lipid clinics across all regions of Spain report cases of various types of primary hyperlipidaemias.<sup>24</sup> Anonymous clinical data collection in this registry was approved by a central ethics committee (Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón) and participants gave their informed written consent. The ENRICA study was conducted between June 2008 and October 2010 on a representative sample of the Spanish population aged 18 years and older. The information was collected by trained personnel in participants' homes in three sequential stages: i) computer-assisted telephone interview, ii) first home visit to obtain biological samples (blood and urine), and iii) second home visit to measure anthropometric variables and blood pressure as well as to take a dietary history. The ENRICA protocol was approved by the Clinical Research Ethics Committees of the 'La Paz' University Hospital in Madrid and the Hospital 'Clinic' in Barcelona; all study participants gave informed written consent.

Subjects in both studies were eligible for inclusion in this analysis if they were 18 years of age or older and, in the case of the Dyslipidaemia Registry cohort, if they had a clinical or genetic diagnosis of HeFH. Clinical diagnosis was based on the diagnostic criteria proposed by the Dutch Lipid Clinics Network: 6–8 points (probable) and >8 points (definitive).<sup>1</sup> Genetic diagnosis was based on tested carrier status of a known pathogenic mutation for familial hypercholesterolaemia (78.1% of HeFH cohort). Homozygous familial hypercholesterolaemia were not included in this study.

### *Study variables*

Arterial hypertension was defined as having systolic blood pressure  $\geq 140$  mmHg or diastolic blood pressure  $\geq 90$  mmHg, or self-reported use of antihypertensive

medication. Blood pressure was measured three consecutive times using automatic oscillometric sphygmomanometers with the participant sitting after a 5-min rest. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in metres. Diabetes was defined as fasting plasma glucose  $\geq 126$  mg/dl or self-reported treatment with anti-diabetic medication. Glucose was not available in all subjects in the Dyslipidaemia Registry and diabetes was considered based on the physician diagnosis encoded in the registry. However, a subgroup analysis with the aforementioned strict definition was performed (see below). Smoking was defined as smoking at present (current smoker) or having ever smoked. Former smoker was defined as a subject having smoked for at least one year in his lifetime but being a non-smoker in the last year.

### Subgroup analysis

In the Dyslipidaemia Registry of the SEA the information about current blood glucose, although it is present in most cases, is not mandatory, in contrast to information on the diagnosis of T2DM and anti-diabetic medication use. To avoid any selection bias, we selected a subgroup of HeFH cases from those lipid clinics in which 100% of HeFH cases had full information of current blood glucose.

### Statistical analysis

Summaries of risk factors, continuous and categorical variables, were calculated as mean (standard deviation) and percentage, respectively. Estimations with 95% confidence intervals (CIs) were calculated using Student's *t* and binomial distributions or its normal approximation, as appropriate. Sex and age strata were created in both studies and weights were created for the ENRICA study so that the sample would have the same age and sex composition as HeFH patients in the Dyslipidaemia Registry, that is, ENRICA estimations would provide summary values for the registry sample should they have been members of the general population instead of HeFH patients. This approach dealt with the sparse and irregular demographics distribution of the registry sample and avoided assumptions implied when adjusting through the use of linear models, like those on linearity of the association of risk factors with age and those on absence of sex interactions.

Differences between the registry and ENRICA samples were tested with weighted Student's *t* and Chi squared tests. Plots of sex and 5-years-of-age strata provided detailed information on which patients were most different. Linear models were used to analyse the differences, adjusting for pre-hypothesized variables

that could justify environmental influences on the differences observed, such as BMI, and preventive drugs. Given that some of these variables are associated with demographics, conditioning on them reintroduces an artificial confounding association in spite of weighting, which was resolved including age and sex in the adjusted regression models. We also performed stratified analyses by lipid-lowering drug use, genetic results and CVD.

Analyses were performed with the statistical software R version 3.4.4.

## Results

A total of 2185 subjects with HeFH from the Dyslipidaemia Registry and 11,856 subjects as reference population from the ENRICA were selected according to inclusion criteria. In a first analysis where the ENRICA population was weighted to match age and sex distribution of the familial hypercholesterolaemia sample, HeFH patients had lower levels of systolic blood pressure, lower BMI and fewer of them were current smokers and ever smokers than the reference population (Table 1). The prevalence of CVD was much higher in HeFH than in the general population (15.1% vs. 0.9%). Antihypertensive medication was more frequently taken by HeFH subjects than the reference population (20.0% vs. 17.7%) in spite of similar prevalence of hypertension in both cohorts. There were not any differences in the prevalence of T2DM or in the consumption of anti-diabetic drugs (Table 1).

After adjusting for age, sex and BMI, HeFH patients more frequently had CHD (OR 23.98; 95% CI 18.40 to 31.23) and hypertension (OR 1.20; 95% CI 1.07 to 1.35) and took anti-hypertensive medication (OR 1.36; 95% CI 1.18 to 1.56) and anti-diabetic medication (OR 1.25; 95% CI 1.00 to 1.56), but less frequently were current smokers (OR 0.79; 95% CI 0.71 to 0.89) (Table 2).

The differences in CVD risk factors were compared by age and sex strata (Figure 1). For any stratum of age, in both men and women, the HeFH subjects had lower BMI, higher CVD prevalence and lower tobacco consumption (except in the case of women in the decade of 60 to 70 years) than the general population. Regarding anti-hypertensive medication, the differences in consumption increase as the age increases in men and women, just as happens with anti-diabetic medication.

Subsequently, we performed a sub-analysis with identical methodology, selecting 513 HeFH subjects from lipid clinics where 100% of HeFH subjects had information on blood glucose, as described in Methods, and 11,856 subjects of the reference population. The existing differences were very similar to those in the first analysis (Tables 3 and 4).

**Table 1.** Clinical characteristics of heterozygous familial hypercholesterolaemia and ENRICA populations matched for age and sex.

	ENRICA Mean/% (95% CI)	FH registry Mean/% (95% CI)	<i>p</i>
<i>N</i>	11,856	2182	
Age, years	49.2 (48.9, 49.4)	49.1 (48.5, 49.7)	0.939
Women, %	52.5 (51.5, 53.4)	52.5 (50.4, 54.6)	1.000
Systolic blood pressure, mmHg	128.8 (128.5, 129.2)	127.4 (126.7, 128.1)	<0.001
Diastolic blood pressure, mmHg	76.8 (76.7, 77.0)	77.3 (76.8, 77.7)	0.093
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	27.1 (27.0, 27.2)	26.3 (26.1, 26.4)	<0.001
Waist circumference, cm	91.8 (91.5, 92.0)	89.6 (89.0, 90.2)	<0.001
LDL-c, mg/dl	125.7 (125.1, 126.3)	265.9 (262.8, 268.9)	<0.001
HDL-c, mg/dl	53.4 (53.1, 53.7)	55.0 (54.3, 55.6)	<0.001
Current smoking, %	26.6 (25.8, 27.5)	22.8 (21.1, 24.6)	<0.001
Ever smoking, %	52.8 (51.8, 53.8)	46.7 (44.6, 48.8)	<0.001
Former smoking, %	26.2 (25.3, 27.1)	23.9 (22.1, 25.7)	0.026
Lipid-lowering medication, %	14.9 (14.2, 15.6)	88.4 (86.9, 89.6)	<0.001
Hypertension medication, %	17.7 (16.9, 18.4)	20.0 (18.4, 21.7)	0.011
Diabetes medication, %	4.7 (4.3, 5.1)	5.1 (4.2, 6.1)	0.392
Personal history of cardiovascular disease, %	0.9 (0.8, 1.2)	15.0 (13.6, 16.6)	<0.001
Hypertension, %	34.2 (33.2, 35.1)	35.2 (33.2, 37.2)	0.389
Diabetes, %	6.6 (6.2, 7.2)	6.7 (5.8, 7.9)	0.881

Unadjusted estimates from linear and logistic regression models. ENRICA is weighted to match age and sex distribution of familial hypercholesterolaemia sample (by 5-year wide age and sex strata).

FH: familial hypercholesterolaemia; CI: confidence interval; LDL-c: low-density lipoprotein cholesterol; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol

We analysed whether the higher prevalence of CVD among HeFH could be responsible for the CVD risk factors differences found between cohorts. HeFH subjects without CVD from the HeFH showed lower BMI and blood glucose, and prevalence of current smokers

and T2DM, and higher mean diastolic blood pressure than the general population (Table 5). The differences in T2DM disappeared after adjustment for age, gender and BMI; however, this adjustment showed higher prevalence of hypertension and anti-hypertensive

**Table 2.** Unadjusted and adjusted differences in cardiovascular risk factors between heterozygous familial hypercholesterolaemia and the general population.

	Unadjusted		Adjusted	
	Difference/OR (95% CI)		Difference/OR (95% CI)	
Age, years	−0.03 (−0.67, 0.62)	0.937		
Women, OR	1.00 (0.91, 1.10)	1.000		
Systolic blood pressure, mmHg	−1.45 (−2.22, −0.67)	<0.001	−0.71 (−1.41, −0.02)	0.045
Diastolic blood pressure, mmHg	0.42 (−0.07, 0.90)	0.093	0.96 (0.50, 1.41)	<0.001
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	−0.87 (−1.07, −0.66)	<0.001		
Waist circumference, cm	−2.19 (−2.80, −1.58)	<0.001		
LDL-c, mg/dl	140.14 (137.00, 143.28)	<0.001	140.71 (137.64, 143.78)	<0.001
HDL-c, mg/dl	1.53 (0.81, 2.26)	<0.001	0.93 (0.25, 1.61)	0.008
Current smoking, OR	0.81 (0.73, 0.91)	<0.001	0.79 (0.71, 0.88)	<0.001
Ever smoking, OR	0.78 (0.71, 0.86)	<0.001	0.77 (0.70, 0.85)	<0.001
Former smoking, OR	0.88 (0.79, 0.99)	0.026	0.90 (0.80, 1.00)	0.050
Lipid-lowering medication, OR	43.37 (37.58, 50.04)	<0.001	60.87 (50.87, 72.83)	<0.001
Hypertension medication, OR	1.16 (1.04, 1.31)	0.011	1.36 (1.18, 1.56)	<0.001
Diabetes medication, OR	1.10 (0.89, 1.36)	0.392	1.24 (0.99, 1.55)	0.064
Personal history of cardiovascular disease, OR	18.55 (14.44, 23.84)	<0.001	24.03 (18.44, 31.33)	<0.001
Hypertension, OR	1.04 (0.95, 1.15)	0.389	1.20 (1.07, 1.35)	0.002
Diabetes, OR	1.01 (0.84, 1.22)	0.881	1.14 (0.94, 1.40)	0.183

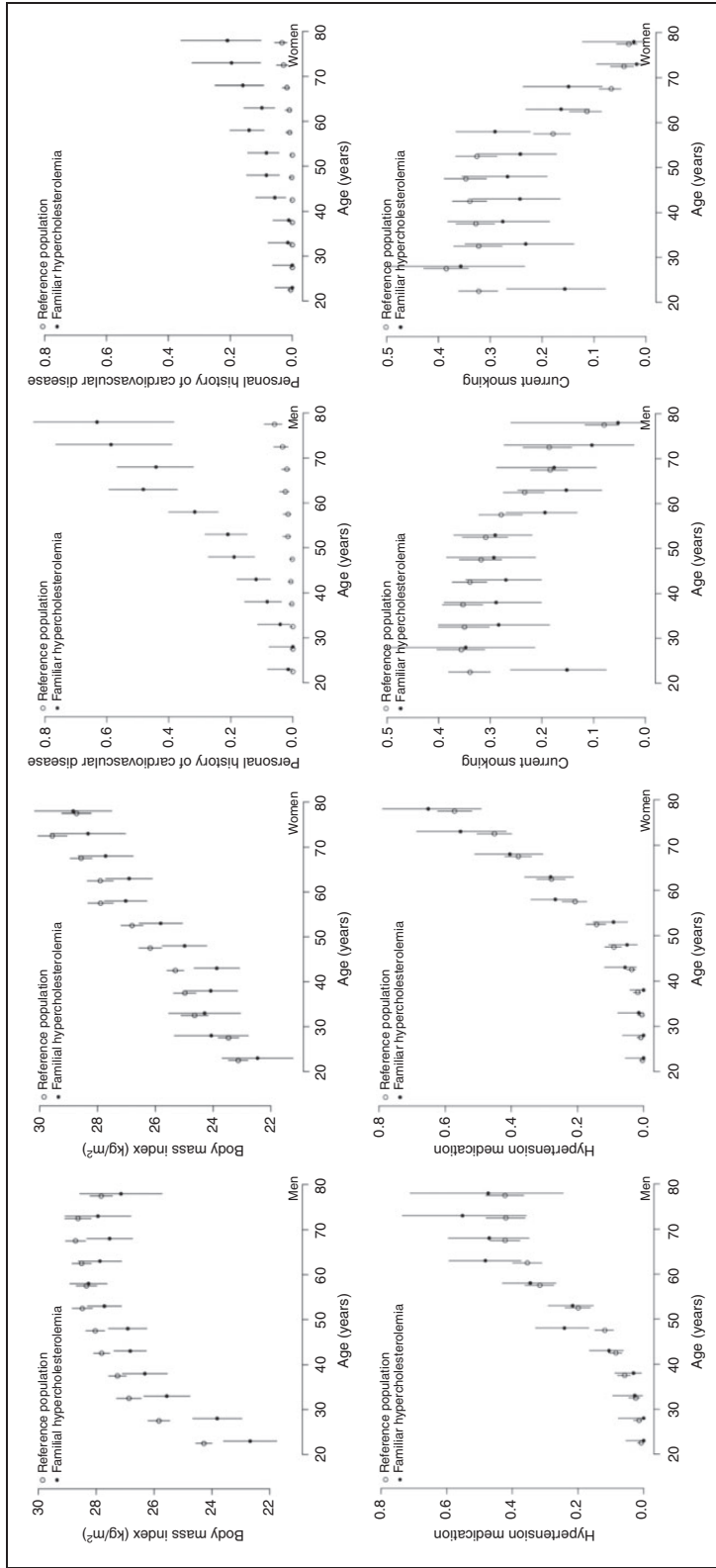
Estimates from linear and logistic regression models. Unadjusted are obtained from the same models as Table 1. Adjusted estimates are calculated from models adjusted by age, sex and body mass index.

OR: odds ratio; CI: confidence interval; LDL-c: low-density lipoprotein cholesterol; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol

drugs in HeFH (Table 5). Identical results, with the exception in the prevalence of hypertension but with similar higher diastolic blood pressure, were observed when the whole HeFH group was analysed (Supplementary Material Table 1 online). Regarding only subjects under lipid-lowering treatment, which are most of the HeFH group, still shows reduced

prevalence of T2DM among HeFH (Supplementary Tables 2 and 3). Finally, we analysed adjusted differences between both cohorts without CVD but in genetically confirmed familial hypercholesterolaemia (Supplementary Table 4). In this last analysis, all differences remained significant except for the prevalence of hypertension.





**Figure 1.** Plots of sex and 5-years-of-age strata of means and percentages of relevant variables. Two plots (one per sex) are created for each variable. Circles (solid for familial hypercholesterolemia and hollow for the reference population) denote the mean or percentage for the reference population. Vertical lines are the 95% confidence interval of the estimation.

**Table 3.** Clinical characteristics of heterozygous familial hypercholesterolaemia sub-cohort and ENRICA populations matched for age and sex.

	ENRICA Mean/% (95% CI)	FH registry Mean/% (95% CI)	<i>p</i>
<i>N</i>	11,797	513	
Age, years	49.9 (49.6, 50.1)	49.9 (48.7, 51.2)	0.955
Women, %	54.8 (53.8, 55.8)	54.8 (50.4, 59.0)	1.000
Systolic blood pressure, mmHg	129.0 (128.7, 129.4)	129.8 (128.3, 131.2)	0.344
Diastolic blood pressure, mmHg	76.9 (76.7, 77.1)	78.8 (77.9, 79.7)	<0.001
Glucose, mg/dl	94.2 (93.8, 94.7)	91.7 (90.3, 93.2)	0.001
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	27.2 (27.1, 27.3)	26.0 (25.6, 26.3)	<0.001
Waist circumference, cm	91.7 (91.5, 92.0)	89.6 (88.6, 90.7)	<0.001
LDL-c, mg/dl	126.3 (125.7, 127.0)	258.8 (253.1, 264.6)	<0.001
HDL-c, mg/dl	53.7 (53.4, 54.0)	56.6 (55.1, 58.1)	<0.001
Current smoking, %	26.1 (25.3, 27.0)	19.9 (16.7, 23.6)	0.002
Ever smoking, %	52.2 (51.2, 53.3)	53.2 (48.9, 57.5)	0.663
Former smoking, %	26.1 (25.2, 27.0)	33.3 (29.4, 37.5)	<0.001
Lipid-lowering medication, %	15.6 (14.8, 16.4)	85.6 (82.3, 88.4)	<0.001
Hypertension medication, %	18.5 (17.6, 19.3)	22.6 (19.2, 26.4)	0.020
Diabetes medication, %	4.8 (4.3, 5.2)	4.9 (3.3, 7.1)	0.917
Personal history of cardiovascular disease, %	1.0 (0.8, 1.2)	13.1 (10.4, 16.3)	<0.001
Hypertension, %	35.1 (34.1, 36.1)	38.4 (34.3, 42.7)	0.129
Diabetes, %	7.0 (6.5, 7.6)	5.5 (3.8, 7.8)	0.182

FH: familial hypercholesterolaemia; CI: confidence interval; LDL-c: low-density lipoprotein cholesterol; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol

## Discussion

In the present work, we have analysed different CVD risk factors in subjects with HeFH and compared their prevalence with a representative population of the same country. The main results are that patients with HeFH

have lower prevalence of certain CVD risk factors than the general population in spite of a much higher prevalence of CVD. Considering that these risk factors are influenced strongly by environmental factors,<sup>26</sup> our results suggest that a healthier lifestyle in HeFH may be a major contributor to these findings. These differences

**Table 4.** Unadjusted and adjusted differences in cardiovascular risk factors between the heterozygous familial hypercholesterolaemia sub-cohort and the general population.

	Unadjusted	Model I		
	Difference/OR (95% CI)		Difference/OR (95% CI)	
Age, years	0.04 (-1.22, 1.29)	0.955		
Women, OR	1.00 (0.84, 1.20)	1.000		
Systolic blood pressure, mmHg	0.71 (-0.76, 2.17)	0.344	1.67 (0.41, 2.93)	0.009
Diastolic blood pressure, mmHg	1.92 (1.01, 2.83)	<0.001	2.66 (1.80, 3.51)	<0.001
Glucose, mg/dl	-2.48 (-4.01, -0.95)	0.001	-1.41 (-2.94, 0.12)	0.071
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	-1.19 (-1.58, -0.81)	<0.001		
Waist circumference, cm	-2.10 (-3.23, -0.98)	<0.001		
LDL-c, mg/dl	132.50 (126.71, 138.29)	<0.001	133.77 (127.92, 139.62)	<0.001
HDL-c, mg/dl	2.82 (1.29, 4.34)	<0.001	2.12 (0.64, 3.61)	0.005
Current smoking, OR	0.70 (0.56, 0.88)	0.002	0.67 (0.54, 0.85)	0.001
Ever smoking, OR	1.04 (0.87, 1.24)	0.663	1.05 (0.87, 1.26)	0.624
Former smoking, OR	1.42 (1.17, 1.71)	<0.001	1.49 (1.22, 1.81)	<0.001
Lipid-lowering medication, OR	32.10 (24.91, 41.38)	<0.001	52.92 (37.89, 73.91)	<0.001
Hypertension medication, OR	1.29 (1.04, 1.60)	0.020	1.60 (1.25, 2.06)	<0.001
Diabetes medication, OR	1.02 (0.68, 1.55)	0.917	1.18 (0.76, 1.83)	0.462
Personal history of cardiovascular disease, OR	15.24 (10.68, 21.74)	<0.001	18.55 (12.64, 27.22)	<0.001
Hypertension, OR	1.15 (0.96, 1.38)	0.129	1.40 (1.13, 1.74)	0.002
Diabetes, OR	0.77 (0.52, 1.13)	0.182	0.86 (0.57, 1.30)	0.481

Estimates from linear and logistic regression models. Unadjusted are obtained from the same models as Table 1. Model I: adjusted estimates are calculated from models adjusted by age, sex and body mass index.

OR: odds ratio; CI: confidence interval; LDL-c: low-density lipoprotein cholesterol; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol

are present early in life, supporting the idea that the familial environment induces a higher consciousness about CVD.<sup>27</sup> This seems to be obvious because of the history of precocious CVD in most of these families.<sup>28</sup> In

addition, medical intervention seems to play a major role. A relevant fact of our data is that the treatment of risk factors not directly dependent on cholesterol, that is, T2DM, hypertension and smoking, is higher in subjects

**Table 5.** Unadjusted and adjusted differences in cardiovascular risk factors between the heterozygous familial hypercholesterolaemia sub-cohort and the general population in absence of cardiovascular disease.

	Unadjusted	<i>p</i>	Adjusted	<i>p</i>
Age, years	-1.03 (-2.38, 0.32)	0.135		
Women, OR	1.17 (0.97, 1.42)	0.105		
Systolic blood pressure, mmHg	0.10 (-1.47, 1.68)	0.897	1.99 (0.64, 3.34)	0.004
Diastolic blood pressure, mmHg	1.74 (0.76, 2.71)	<0.001	2.86 (1.95, 3.76)	<0.001
Glucose, mg/dl	-3.02 (-4.67, -1.36)	<0.001	-1.28 (-2.97, 0.41)	0.137
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	-1.42 (-1.83, -1.01)	<0.001		
Waist circumference, cm	-3.08 (-4.27, -1.90)	<0.001		
LDL-c, mg/dl	132.38 (126.08, 138.67)	<0.001	134.50 (128.10, 140.90)	<0.001
HDL-c, mg/dl	3.65 (2.01, 5.29)	<0.001	2.44 (0.86, 4.03)	0.003
Current smoking, OR	0.76 (0.60, 0.96)	0.020	0.72 (0.56, 0.91)	0.006
Ever smoking, OR	0.97 (0.80, 1.17)	0.722	0.99 (0.82, 1.21)	0.946
Former smoking, OR	1.23 (1.00, 1.51)	0.056	1.35 (1.09, 1.67)	0.007
Lipid-lowering medication, OR	28.18 (21.76, 36.48)	<0.001	47.23 (33.42, 66.74)	<0.001
Hypertension medication, OR	0.99 (0.78, 1.27)	0.961	1.37 (1.03, 1.82)	0.033
Diabetes medication, OR	0.81 (0.50, 1.33)	0.414	1.07 (0.63, 1.81)	0.798
Hypertension, OR	0.97 (0.80, 1.19)	0.796	1.31 (1.03, 1.66)	0.026
Diabetes, OR	0.61 (0.38, 0.97)	0.036	0.78 (0.48, 1.29)	0.336

Estimates from linear and logistic regression models. Unadjusted are obtained from the same models as Table 1. Adjusted estimates are calculated from models adjusted by age, sex and body mass index.

OR: odds ratio; CI: confidence interval; LDL-c: low-density lipoprotein cholesterol; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol

with HeFH than in subjects of the general population, which probably translates into a greater contact with a highly specialized health system that favours the diagnosis and treatment of all risk factors.<sup>29</sup>

It is well known that the prevalence of T2DM is lower in patients with HeFH.<sup>12,13</sup> In our study it appears that a large part of this lower prevalence could be related to the fact that BMI is lower at any age than in the general population. Without being able

to rule out that familial hypercholesterolaemia itself causes or plays a role in the control of weight in these subjects, it does not seem that this is a relevant factor since the genes related to the familial hypercholesterolaemia (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9* and *APOE*) have not been related to the inter-individual variation of weight in the general population.<sup>30,31</sup> Therefore, it seems reasonable that the HeFH subjects are thinner due to environmental factors probably linked to a healthier

lifestyle since childhood and the aforementioned medical intervention. This environmental action is in line with the observed data of smoking that shows that HeFH subjects smoke less from early stages of life, as previously reported.<sup>32</sup> However, previous studies used different populations as controls, including non-affected relatives, and the bias of a shared environment makes interpretation difficult.<sup>12,33</sup>

The differences attributed to the prevalence of T2DM in subjects with familial hypercholesterolaemia have been attributed to a lower disposition of the pancreatic beta cell when LDL cholesterol uptake is defective in the presence of mutations in the receptor.<sup>34</sup> This defect in peripheral uptake would be compensated for by an increase in endogenous cholesterol synthesis. In accordance with this hypothesis, the genetic variation in *HMGCR*, the gene responsible for intracellular cholesterol synthesis, is associated with the risk of T2DM and variants with gain of function are associated with T2DM.<sup>35</sup> However, whether or not this phenomenon is responsible for the lower risk in familial hypercholesterolaemia is unknown. Without being able to rule out that the genetic factors that cause familial hypercholesterolaemia play a causal role, our data suggest that environmental factors, such as a lower weight, are important to explain a large part of the phenomenon. This would explain a previously known fact: the lower prevalence of T2DM occurs in subjects with familial hypercholesterolaemia with independence in the presence or absence of a mutation in the candidate gene, implying that it is the familial hypercholesterolaemia itself, or as we suggest with our data, the healthier behaviour that it prompts, and not the molecular cause, that is responsible for the described reduced prevalence of diabetes.<sup>13</sup>

The use of statins is associated with the risk of T2DM.<sup>36</sup> Our HeFH cohort, where most subjects take statins for many years, shows that prevalence of T2DM is not increased, which emphasizes the value of a healthy lifestyle in the prevention of T2DM in subjects with high doses of statins.<sup>37</sup> The risk of T2DM in statin users is increased in those who had predisposition factor for T2DM, such as obesity or metabolic syndrome, and independent of the concentration of LDL cholesterol.<sup>13</sup> So, a lower BMI may be an important factor explaining this protection against T2DM in familial hypercholesterolaemia.

It is noteworthy that subjects with HeFH have higher diastolic blood pressure, higher prevalence of hypertension and higher anti-hypertensive drug treatment than the general population in spite of a lower BMI. The association of hypertension with familial hypercholesterolaemia has not been studied in depth previously. A recent report from our country in a different population has found almost double prevalence of hypertension among clinically defined HeFH.<sup>38</sup>

Whether this phenomenon is related to a closer medical control and discovery, a higher prevalence of anti-hypertensive drugs associated with CVD, a true higher prevalence of hypertension, a misdiagnosis of some clinically defined HeFH but truly having familial combined hyperlipidaemia, which is a phenotype highly related to hypertension,<sup>39</sup> or a disorder causally associated with familial hypercholesterolaemia, cannot be concluded from our study, although our analysis suggests that it is the result of the combination of all these circumstances.

Our study has some limitations. The diagnosis of tobacco consumption is self-reported by patients and this may cause underestimation in the medical environment of a lipid unit and there may be biases with respect to an interview in the patient's own home. However, the differences are important enough to be hardly explained by this phenomenon. Similarly, the diagnosis of hypertension has been made in both studies according to the figures of blood pressure and medication, and blood pressure at home is usually lower than the clinical blood pressure. However, our study has important strengths: the high number of subjects studied in both samples, the control population being representative of the same population from which subjects with familial hypercholesterolaemia are extracted, and the homogeneous criteria used for the diagnosis of the main risk factors.

In conclusion, subjects with HeFH have a different prevalence of CVD risk factors than the general population. This includes a lower mean BMI, which could explain much of the lower prevalence of diabetes in this population, and a lower frequency of current smoking, but they have higher hypertension prevalence.

#### Author contribution

Both authors FR-A and ML should be considered senior authors in this work. All authors contributed to the study conception and design. Material preparation and data collection were performed by all authors. Data analysis was performed and the first draft of the manuscript was written by SP-C, FC and ML, and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was funded by CIBERCV (grant number CB16/11/00451) and Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA 2019).

## References

- Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2013; 34: 3478–3490a.
- De Ferranti SD, Rodday AM, Mendelson MM, et al. Prevalence of familial hypercholesterolemia in the 1999 to 2012 United States National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES). *Circulation* 2016; 133: 1067–1072.
- Benn M, Watts GF, Tybjaerg-Hansen A, et al. Mutations causative of familial hypercholesterolaemia: Screening of 98 098 individuals from the Copenhagen General Population Study estimated a prevalence of 1 in 217. *Eur Heart J* 2016; 37: 1384–1394.
- Hovingh GK, Davidson MH, Kastelein JJP, et al. Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 2013; 34: 962–971.
- Civeira F; International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004; 173: 55–68.
- Brown MS and Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor. *N Engl J Med* 1976; 294: 1386–1390.
- Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: A mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1990; 31: 1337–1349.
- Abifadel M, Rabès J-P, Devillers M, et al. Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum Mutat* 2009; 30: 520–529.
- Cenarro A, Etxebarria A, de Castro-Orós I, et al. The p.Leu167del mutation in APOE gene causes autosomal dominant hypercholesterolemia by down-regulation of LDL receptor expression in hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101: 2113–2121.
- Perak AM, Ning H, de Ferranti SD, et al. Long-term risk of atherosclerotic cardiovascular disease in US adults with the familial hypercholesterolemia phenotype. *Circulation* 2016; 134: 9–19.
- Santos RD, Gidding SS, Hegele RA, et al. International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. Defining severe familial hypercholesterolaemia and the implications for clinical management: A consensus statement from the International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016; 4: 850–861.
- Besseling J, Kastelein JJP, Defesche JC, et al. Association between familial hypercholesterolemia and prevalence of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2015; 313: 1029–1036.
- Climent E, Pérez-Calahorra S, Marco-Benedí V, et al. Effect of LDL cholesterol, statins and presence of mutations on the prevalence of type 2 diabetes in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Sci Rep* 2017; 7: 5596.
- Ridker PM, Pradhan A, MacFadyen JG, et al. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: An analysis from the JUPITER trial. *Lancet* 2012; 380: 565–571.
- Izzo R, de Simone G, Trimarco V, et al. Primary prevention with statins and incident diabetes in hypertensive patients at high cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013; 23: 1101–1106.
- Sattar N, Preiss D, Murray HM, et al. Statins and risk of incident diabetes: A collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet* 2010; 375: 735–742.
- Besseling J and Hutten BA. Is there a link between diabetes and cholesterol metabolism? *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2016; 14: 259–261.
- Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich TM, et al. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature* 2016; 536: 41–47.
- Billings LK and Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: What have we learned from GWAS? *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1212: 59–77.
- Flannick J, Mercader JM, Fuchsberger C, et al. Exome sequencing of 20,791 cases of type 2 diabetes and 24,440 controls. *Nature* 2019; 570: 71–76.
- Sun D, Cao Y-X, You X-D, et al. Clinical and genetic characteristics of familial hypercholesterolemia patients with type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest*. Epub ahead of print 1 October 2018. DOI: 10.1007/s40618-018-0959-0.
- Liu K, Daviglius ML, Loria CM, et al. Healthy lifestyle through young adulthood and the presence of low cardiovascular disease risk profile in middle age. *Circulation* 2012; 125: 996–1004.
- Engeseth K, Prestgaard EE, Mariampillai JE, et al. Physical fitness is a modifiable predictor of early cardiovascular death: A 35-year follow-up study of 2014 healthy middle-aged men. *Eur J Prev Cardiol* 2018; 25: 1655–1663.
- Pérez-Calahorra S, Sánchez-Hernández RM, Plana N, et al. National Dyslipidemia Registry of the Spanish Arteriosclerosis Society: Current status. *Clin Invest Arterioscler* 2017; 29: 248–253.
- Rodríguez-Artalejo F, Graciani A, Guallar-Castillón P, et al. Rationale and methods of the study on nutrition and cardiovascular risk in Spain (ENRICA). *Rev Esp Cardiol* 2011; 64: 876–882.
- Mozaffarian D. Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity. *Circulation* 2016; 133: 187–225.
- Reiner Z. Management of patients with familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Cardiol* 2015; 12: 565–575.
- Besseling J, Kindt I, Hof M, et al. Severe heterozygous familial hypercholesterolemia and risk for cardiovascular disease: A study of a cohort of 14,000 mutation carriers. *Atherosclerosis* 2014; 233: 219–223.
- Claassen L, Henneman L, Kindt I, et al. Perceived risk and representations of cardiovascular disease and preventive behaviour in people diagnosed with familial hypercholesterolemia. *J Health Psychol* 2010; 15: 33–43.
- Barsh GS, Farooqi IS and O’Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. *Nature* 2000; 404: 644–651.

31. Mei H, Chen W, Jiang F, et al. Longitudinal replication studies of GWAS risk SNPs influencing body mass index over the course of childhood and adulthood. *PLoS One* 2012; 7: e31470.
32. Akioyamen LE, Genest J, Chu A, et al. Risk factors for cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Lipidol* 2019; 13: 15–30.
33. Arroyo-Olivares R, Alonso R, Quintana-Navarro G, et al. Adults with familial hypercholesterolaemia have healthier dietary and lifestyle habits compared with their non-affected relatives: The SAFEHEART study. *Public Health Nutr* 2019; 22: 1433–1443.
34. Brunham LR, Kruit JK, Verchere CB, et al. Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2008; 118: 403–408.
35. Ference BA, Robinson JG, Brook RD, et al. Variation in PCSK9 and HMGCR and risk of cardiovascular disease and diabetes. *N Engl J Med* 2016; 375: 2144–2153.
36. Rajpathak SN, Kumbhani DJ, Crandall J, et al. Statin therapy and risk of developing type 2 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care* 2009; 32: 1924–1929.
37. Vinther JL, Jacobsen RK and Jørgensen T. Current European guidelines for management of cardiovascular disease: Is medical treatment in nearly half a population realistic? *Eur J Prev Cardiol* 2018; 25: 157–163.
38. Masana L, Zamora A, Plana N, et al. Incidence of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia phenotype: Analysis of 5 years follow-up of real-world data from more than 1.5 million patients. *J Clin Med* 2019; 8: 1080.
39. Brouwers MCGJ, van der Kallen CJH, Schaper NC, et al. Five-year incidence of type 2 diabetes mellitus in patients with familial combined hyperlipidaemia. *Neth J Med* 2010; 68: 163–167.