



MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

Andrés Díaz López

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES
RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

TESIS DOCTORAL

Tesis dirigida por el Prof. Jordi Salas-Salvadó, y codirigida por la
Dra. Mònica Bulló Bonet y la Dra. Nancy Babio Sánchez



Unitat de Nutrició Humana
Departament de Bioquímica i Biotecnologia
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Reus, 2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

Prof. Jordi Salas-Salvadó, Catedrático de Nutrición y Bromatología del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICO:

Que este trabajo, titulado "*MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2*", que presenta el Sr. Andrés Díaz López para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de esta Universidad.

Reus, 19 de Octubre de 2015

El Director de la Tesis Doctoral,

Prof. Jordi Salas-Salvadó
Unitat de Nutrició Humana
Departament de Bioquímica i Biotecnologia
Universitat Rovira i Virgili

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

Mònica Bulló Bonet, profesora Agregada del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la
Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICO:

Que este trabajo, titulado “*MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON
DIABETES MELLITUS TIPO 2*”, que presenta el Sr. Andrés Díaz López para la obtención del
título de Doctor, ha sido realizado bajo mi co-dirección en el Departamento de Bioquímica y
Biotecnología de esta Universidad.

Reus, 19 de Octubre de 2015

La Codirectora de la Tesis Doctoral,

Dra. Mònica Bulló Bonet
Unitat de Nutrició Humana
Departament de Bioquímica i Biotecnologia
Universitat Rovira i Virgili

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

Nancy Babio Sánchez, profesor Lector del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la
Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICO:

Que este trabajo, titulado “*MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON
DIABETES MELLITUS TIPO 2*”, que presenta el Sr. Andrés Díaz López para la obtención del
título de Doctor, ha sido realizado bajo mi co-dirección en el Departamento de Bioquímica y
Biotecnología de esta Universidad.

Reus, 19 de Octubre de 2015

La Codirectora de la Tesis Doctoral,

Dra. Nancy Babio Sánchez
Unitat de Nutrició Humana
Departament de Bioquímica i Biotecnologia
Universitat Rovira i Virgili

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración, apoyo y conocimiento de muchas personas.

Mi agradecimiento más sincero a mi director, gran mentor, y un importante modelo a seguir, el Prof. Jordi Salas-Salvadó, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo investigador, por transmitirme su conocimiento y su pasión por la Nutrición y la investigación, por ayudarme a crecer profesional y personalmente. Admiro su manera de trabajar con esfuerzo, dedicación, constancia y pasión por lo que hace, así como su gran capacidad de hacer lo imposible, posible.

A la Dra. Mónica Bulló, por sus consejos muy válidos y opiniones claras y concisas, por dejarme formar parte del trabajo de campo del estudio Glyndiet, y por ayudarme incondicionalmente a tener los pies en el suelo.

A la Dra. Nancy Babio, por sus consejos y opiniones que muchas veces necesité y que me ayudaron a reflexionar, por las discusiones sobre estadística y muchos otros temas de los que tanto he podido aprender, por su apoyo y ayuda en muchos momentos tanto profesionales como personales y por la confianza y amistad depositada en mí.

A Carles Munné, por las discusiones mantenidas, por hacerme sonreír, por su apoyo y ayuda en muchos momentos en los que lo necesité y por hacer el día a día más fácil y agradable.

Gracias a todo el personal de la unidad de medicina preventiva y salud pública por todas las horas de sesiones prácticas compartidas y conocimientos aportados y, especialmente al Prof. Joan Fernández Ballart, por sus conocimientos en estadística, su disponibilidad y su paciencia.

Al Dr. Joan J. Vendrell y a la Dra. Matilde Rodríguez, por su colaboración, ayuda y por dejarme formar parte de su equipo de laboratorio cuando ha sido necesario.

A mis antiguos compañeros y amigos ya doctores Marta, Martí, Nuria, Olalla, y Silvia que echo mucho de menos, por todos los momentos compartidos tanto en el trabajo como fuera, por

Agradecimientos

aprender y trabajar con vosotros, por vuestro apoyo y cariño, estar a vuestro lado hacia que el trabajo se convirtiera en un hobby. Mi reconocimiento especial a mi amigo Martí que siempre estuvo en los momentos oportunos.

A los que todavía estamos cada día, compartiendo el esfuerzo, las alegrías y las frustraciones de trabajar en el mundo de la investigación, Cintia, Gemma, José María, Nerea, Nuria, Pablo, Pol y Simona, y también a otros compañeros, los "*Randoms*" y especialmente a Iván y Nora por hacer el día a día más fácil y agradable.

A los participantes y otros miembros del equipo PREDIMED por haber hecho posible un estudio clínico de esta importancia y trascendencia, sin su participación este trabajo no hubiera sido posible, y estoy muy orgulloso de poder haber formado una pequeña parte.

Gracias al Dr. Josep Basora, y al equipo de enfermería y médicos de los Centros de Atención Primaria del ICS, por compartir su profesionalidad.

Gracias a mis padres, a mis hermanas y hermanos, que han estado siempre e incondicionalmente a mi lado, sin vosotros no hubiera podido llegar donde he llegado y a ser la persona que soy. Os quiero y espero que estéis orgullosos de mí !!!.

Mi agradecimiento más especial a Arantxa, que ha estado ahí en todo momento, por quererme como me quiere, por su apoyo tanto en los momentos difíciles como los éxitos, es mi ejemplo a seguir en todos los aspectos. Gracias además, por dejarme compartir mi vida contigo ahora y siempre y por enseñarme lo maravilloso que puede resultar el día a día en tu compañía.

También agradecer a las fuentes de financiación: Universitat Rovira i Virgili, IISPV, ISCIII y CIBEROBN.

Muchas gracias a todos y a todas!!!!!!.

Resumen

Castellano

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una enfermedad con elevada morbilidad y una importante causa de mortalidad prematura, la cual, en gran medida, se podría prevenir. La identificación de nuevas vías metabólicas y/o biomarcadores implicados en su fisiopatología puede ayudar en la detección precoz de la enfermedad, y proporcionar nuevos enfoques terapéuticos. Estos últimos años, diferentes grupos de investigación han mostrado especial interés por el sTWEAK, una citocina multifuncional implicada en la respuesta pro-/anti-inflamatoria, su receptor *scavenger* CD163 y la osteocalcina (OC), un componente de la matriz ósea; los cuales han sido relacionados con el metabolismo de la glucosa.

Esta tesis ha sido realizada en el contexto del estudio PREDIMED, un ensayo de campo nutricional en paralelo, multicéntrico y aleatorizado que evalúa el efecto de la dieta Mediterránea en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular. El objetivo de la presente tesis fue analizar las asociaciones entre los niveles séricos de sTWEAK, sCD163 y ambas formas de OC [carboxilada (OCc) y no carboxilada (OCnc)] y la incidencia de DMT2 en una población adulta con alto riesgo cardiovascular y sin diabetes al inicio del estudio. Además se ha analizado la relación entre los niveles periféricos de sTWEAK y síndrome metabólico (SM).

Se realizó un estudio de diseño casos-control anidado y prospectivo incluyendo 153 casos con nuevo diagnóstico de diabetes y 306 controles que no desarrollaron diabetes tras 5 años de seguimiento. Los resultados del presente trabajo demuestran que niveles bajos de sTWEAK y ambas, OCc y OCnc al inicio del estudio, se asociaron con un mayor riesgo de diabetes. Asimismo, niveles bajos de sTWEAK se asociaron con una mayor prevalencia de SM, obesidad abdominal, hipertrigliceridemia e hiperglucemia. No se encontró relación entre los niveles séricos de sCD163 e incidencia de diabetes.

Los resultados de la presente tesis sugieren que los niveles circulantes de sTWEAK y OC podrían ser útiles como nuevos potenciales biomarcadores predictores de DMT2.

Resumen

English

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a disease with high morbidity and a major cause of premature mortality, which, in a large extent could be prevented. The identification of new pathways and/or biomarkers implicated in its pathophysiology can help in the early detection of the disease, and could provide new therapeutic approaches. Recently, various research groups have shown special interest in sTWEAK, a multifunctional cytokine involved in the pro/anti-inflammatory response, its scavenger receptor CD163 and in osteocalcin (OC), a component of the bone matrix; all them related with glucose metabolism.

This thesis has been conducted in the framework of the PREDIMED Study, a parallel-group, multicenter randomized trial evaluating the efficacy of a Mediterranean diet on the primary prevention of cardiovascular disease. We aimed to assess the associations between baseline serum concentrations of sTWEAK, sCD163 and both forms of OC [carboxylated (cOC) and undercarboxylated osteocalcin (ucOC)] and the future development of T2DM in an elderly population at high cardiovascular risk and free of T2DM at the beginning of the study. Additionally, we also aimed at exploring the relationship between sTWEAK and metabolic syndrome (MS) prevalence.

A prospective, nested case-control study was performed including 153 cases of newly diagnosed diabetic subjects and 306 individually matched controls free of diabetes during 5-years of the follow-up. The results of the present work demonstrated that low levels of sTWEAK and both cOC and ucOC at baseline are prospectively associated with an increased diabetes risk. We also found that low levels sTWEAK were associated with a higher prevalence of MS, abdominal obesity, hypertriglyceridemia and hyperglycemia. No relationship between serum levels sCD163 and diabetes incidence was found.

The results of the present thesis suggest that circulating levels of sTWEAK and OC, may be useful as potential biomarkers for predicting T2DM.

Català

La diabetis mellitus tipus 2 (DMT2) és una malaltia amb elevada morbiditat i una important causa de mortalitat prematura, la qual, en gran mesura es podria prevenir. La identificació de noves vies metabòliques i/o biomarcadors implicats en la seva fisiopatologia podrien ajudar en la detecció precoç de la malaltia, i proporcionar nous enfocaments terapèutics. Aquests últims anys, diferents grups d'investigació han mostrat especial interès pel sTWEAK, una citocina multifuncional implicada en la resposta pro-/anti-inflamatòria, el seu receptor scavenger CD163 i l'osteocalcina (OC), un component de la matriu òssia; els quals han estat relacionats amb el metabolisme de la glucosa.

Aquesta tesi ha estat realitzada en el context de l'estudi PREDIMED, un assaig clínic en paral·lel, multicèntric i aleatoritzat que avalua l'efecte de la dieta Mediterrània en la prevenció primària de la malaltia cardiovascular. L'objectiu va ser analitzar les associacions entre els nivells sèrics de sTWEAK, sCD163 i dues formes de OC [carboxilada (OCc) i no carboxilada (OCnc)] i la incidència de DMT2 en una població adulta amb alt risc cardiovascular i sense diabetis a l'inici de l'estudi. Així mateix, s'ha volgut explorar la relació entre els nivells perifèrics de sTWEAK i la prevalença de síndrome metabòlica (SM).

Es va realitzar un estudi de disseny cas-control aniuat, prospectiu, incloent 153 casos amb nou diagnòstic de diabetis i 306 controls que no ho van desenvolupar durant els 5 anys de seguiment. Els resultats d'aquest treball van demostrar que nivells sèrics baixos de sTWEAK i ambdues formes d'osteocalcina, OCc i OCnc a l'inici de l'estudi, s'associen amb un major risc de desenvolupar diabetis tipus 2. Així mateix, nivells perifèrics baixos de sTWEAK es van associar amb una major prevalença de SM, obesitat abdominal, hipertrigliceridèmia i hiperglucèmia. No es va observar una relació significativa entre els nivells sèrics de sCD163 i la incidència de diabetis.

Els resultats de la present tesi suggereixen que els nivells circulants de sTWEAK i OC, podrien ser útils com a nous potencials biomarcadors per a predir la DMT2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

ABREVIATURAS

DM, diabetes mellitus.
DMT1, diabetes mellitus tipo 1.
DMT2, diabetes mellitus tipo 2.
ADA, Asociación Americana de Diabetes.
OMS, Organización Mundial para la Salud.
GPA, glucosa plasmática en ayunas.
PTOG, prueba de tolerancia oral a la glucosa.
GBA, glucesmia basal alterada.
TAG, tolerancia alterada a la glucosa.
IDF, International Diabetes Federation.
HbA1c, hemoglobina A1C.
NGSP, National Glycohemoglobin Standardization Program.
DCCT, Diabetes Control and Complications Trial.
RI, resistencia a la insulina.
AGL, ácidos grasos libres.
SM, síndrome metabólico.
HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance.
QUICKI, quantitative insulin check index.
IR, receptor de insulina.
IRS, sustratos del IR.
PI3-K, cinasa de fosfoinositol trifosfato.
MAPK, cinasa activada por mitógeno.
JNK, cinasa c-Jun NH₂-terminal.
ERK, cinasa activada por señales extracelulares.
NF- κ B, factor nuclear kappa B.
I κ B, inhibidor I kappa B.
PTP1 β , proteína fosfatasa de tirosina 1 β .
PTEN, homólogo de fosfatasa y tensina.
mTOR, mammalian target of rapamycin.
PKC, proteína cinasa C.
IKK, cinasa del inhibidor de NF- κ B.
TNF- α , factor de necrosis tumoral α .
IL-6, interleucina 6.
GKRP, proteína reguladora de la glucocinasa.
IGF-1, factor de crecimiento insulínico tipo 1.

Abreviaturas

FTO, fat mass and obesity-associated protein.

KLF14, kruppel-like factor 14.

PPAR γ , receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas.

PREDIMED, PREvención con Dieta MEDiterránea.

DASH, dietary approaches to stop hypertension.

IMC, índice de masa corporal.

NHANES, The National Health and Nutrition Examination Survey.

NHEFS, The National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up Study.

PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno.

RBP4, proteína transportadora de retinol tipo 4.

MCP-1, proteína quimioatrayente de monocitos 1.

PCR, proteína c reactiva.

AGT, angiotensinógeno.

TGF- β 1, factor de crecimiento TGF-beta 1.

TWEAK, tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis.

Fn14, fibroblast growth factor-inducible 14.

RNA m , ácido ribonucleico mensajero.

PP2A, protein Phosphatase 2A.

SRCR, scavenger receptor cysteine-rich.

Hp-Hb, hemoglobina:haptoglobina.

ADAM, a disintegrin and metalloproteinase.

TLR, toll-like receptors.

LPS, lipopolisacárido.

PMA, forbol 12-miristato 13-acetato.

Fc γ R, receptores Fc-gamma.

IFN- γ , interferoon-gamma.

OC, osteocalcina.

BGP, bone gla protein.

OCc, osteocalcina carboxilada.

OCnc, osteocalcina no carboxilada.

ECG, electrocardiograma.

ECV, enfermedad cardiovascular.

CAP, centro de atención primaria.

HDL, lipoproteína de alta densidad.

LDL, lipoproteína de baja densidad.

CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. DIABETES MELLITUS	3
1.1.1. Definición y clasificación	3
1.1.2. Criterios diagnósticos de diabetes mellitus tipo 2	5
1.1.3. Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 2	6
1.1.4. Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2	11
1.1.5. Factores de riesgo de la diabetes mellitus tipo 2	16
1.1.5.1. Factores de riesgo no modificables	17
a) Factores familiares y/o genéticos	17
b) Edad y sexo	18
c) Diabetes gestacional	19
1.1.5.2. Factores de riesgo modificables	19
a) Estilos de vida (dieta, actividad física y hábito tabáquico)	19
b) Sobrepeso u obesidad	23
1.1.6. Obesidad, inflamación y resistencia a la insulina	25
1.1.7. Biomarcadores del estado inflamatorio y diabetes mellitus tipo 2	28
1.1.8. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)	31
1.1.8.1. TWEAK y resistencia a la insulina en la obesidad	33
1.1.9. Receptor scavenger CD163	35
1.1.9.1. CD163 y resistencia a la insulina en la obesidad	37
1.1.10. Osteocalcina	39
1.1.10.1. Osteocalcina: un nexo de unión entre hueso y metabolismo de la glucosa	40
2. JUSTIFICACIÓN	45
3. HIPÓTESIS	49
4. OBJETIVOS	53
5. MATERIAL Y MÉTODOS	57
6. POBLACIÓN DE ESTUDIO	73

Índice

7. PUBLICACIONES	77
Publicación 1	77
Díaz-López A, Chacón MR, Bulló M, Maymó-Masip E, Martínez-González MA, Estruch R, Vendrell J, Basora J, Díez-Espino J, Covas MI, Salas-Salvadó J. Serum sTWEAK concentrations and risk of developing type 2 diabetes in a high cardiovascular risk population: a nested case-control study. J Clin Endocrinol Metab. 2013; 98: 3482-90. PMID: 23760626. Factor de impacto: 6.31	
Publicación 2	89
Díaz-López A, Bulló M, Chacón MR, Estruch R, Vendrell J, Díez-Espino J, Fitó M, Corella D, Salas-Salvadó J. Reduced circulating sTWEAK levels are associated with metabolic syndrome in elderly individuals at high cardiovascular risk. Cardiovasc Diabetol. 2014; 13: 51. PMID: 24565471. Factor de impacto: 4.015	
Publicación 3	101
Díaz-López A, Bulló M, Juanola-Falgarona M, Martínez-González MA, Estruch R, Covas MI, Arós F, Salas-Salvadó J. Reduced serum concentrations of carboxylated and undercarboxylated osteocalcin are associated with risk of developing type 2 diabetes mellitus in a high cardiovascular risk population: a nested case-control study. J Clin Endocrinol Metab. 2013; 98: 4524-31. PMID: 24037881. Factor de impacto: 6.31	
8. DISCUSIÓN	113
9. CONCLUSIONES	129
10. BIBLIOGRAFÍA	133
11. ANEXOS	155
11.1. CUESTIONARIOS DEL ESTUDIO PREDIMED	
Anexo 1. Cuestionario de inclusión/exclusión. Estudio PREDIMED	
Anexo 2. Cuestionario general. Estudio PREDIMED	
Anexo 3. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos. Estudio PREDIMED	
Anexo 4. Cuestionario de actividad física. Estudio PREDIMED	
Anexo 5. Cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea. Estudio PREDIMED	
Anexo 6. Cuestionario de adherencia a la dieta baja en grasa. Estudio PREDIMED	
Anexo 7. Cuestionario de tolerancia. Estudio PREDIMED	
Anexo 8. Cuestionario de seguimiento. Estudio PREDIMED	
11.2. APORTACIONES CIENTÍFICAS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimaciones del número de personas con DMT2 por población (20-79 años) por región de la IDF, 2014 y 2035	8
Figura 2. Fisiopatología de la hiperglucemia y aumento de ácidos grasos circulantes en la DMT2 ...	13
Figura 3. Vías de transducción de señales en la acción de la insulina	15
Figura 4. Relación entre marcadores inflamatorios y factores específicos de la enfermedad como una etapa patológica continua, pasando desde el sobrepeso a la DMT2 y a la ECV	29
Figura 5. Efectos biológicos inducidos por el sistema TWEAK/Fn14 a través de vías de señalización intracelulares de NFκB y MAPK	32
Figura 6. Liberación de CD163 y TNF-α en macrófagos por acción de ADAM17/TACE inducida por activación de TLR en inflamación	36
Figura 7. Función endocrina de osteocalcina derivada de los osteoblastos	40
Figure 8. Diseño del estudio PREDIMED	61

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios diagnósticos de DMT2 establecidos por la ADA en el año 2014	7
---	---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

1. INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) es considerada como uno de los principales problemas de salud mundial más desafiantes del siglo XXI, entre otras razones por su elevada prevalencia, su repercusión socio-sanitaria y, el impacto de las complicaciones crónicas asociadas a ésta y el número de muertes prematuras que provoca ¹⁻³.

La carga global de DM en la población adulta se estima en aproximadamente 387 millones de personas en el año 2014, y se proyecta que aumentará a 592 millones el 2035 ⁴. Desde el punto de vista clínico la DM se caracteriza por una hiperglucemia, como resultado de defectos en la secreción de la insulina, en la DM tipo 1 (DMT1), o una progresiva resistencia a la acción periférica de la insulina con o sin déficit asociado en la secreción, en la DM tipo 2 (DMT2). Aunque la prevalencia de DMT1 y DMT2 en todo el mundo es cada vez mayor, la prevalencia de DMT2 está aumentando más rápidamente, representando entre el 85% y 95% del total de los casos de diabetes.

La DMT2 es una enfermedad crónica de curso silente, sin un inicio brusco, donde se desencadenan un grupo heterogéneo de procesos metabólicos. La identificación de nuevas vías o biomarcadores indicativos de alteraciones metabólicas, implicados en sus mecanismos etiopatogénicos puede proporcionar nuevos enfoques terapéuticos, y ser eficaces en la detección precoz antes de la manifestación de la enfermedad ^{5,6}.

1.1.1. Definición y clasificación

Bajo el término de DM se incluyen un grupo de enfermedades metabólicas cuya característica común es la hiperglucemia como consecuencia de un defecto en la secreción o acción de insulina o por la combinación de ambos. Esta situación de hiperglucemia mantenida, se asocia a efectos nocivos que consisten en daños, disfunción y fallo a largo plazo de diferentes órganos como

Introducción

riñones, ojos, sistemas nervioso, cardíaco y circulatorio, ocasionando complicaciones crónicas de tipo microvascular (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovascular (cardiopatía isquémica y enfermedades cerebrovasculares) ⁷.

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA), la DM se clasifica en 4 categorías:

a) La DMT1, representa del 3 al 5% de todos los casos de diabetes ⁴ y se produce por una falta de secreción de insulina por destrucción autoinmune de la célula β pancreática. Las personas a riesgo de padecer DMT1 pueden ser identificadas por marcadores serológicos y genéticos ⁷.

b) La DMT2, es la forma más frecuente de diabetes, resultante de un defecto progresivo de la secreción de insulina en el contexto de una resistencia gradual periférica a la acción de la insulina ^{7,8}. Es frecuente que este tipo de diabetes pase desapercibida y que pueda permanecer sin diagnosticar durante años, debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y no es suficientemente severa para presentar sintomatología, pero sí como para causar cambios fisiopatológicos y funcionales en diferentes tejidos, incrementando el riesgo de desarrollar complicaciones vasculares de la enfermedad. La mayoría de personas afectadas por la DMT2 presentan sobrepeso u obesidad cuando desarrollan la enfermedad y suele presentarse con más frecuencia en personas de mediana edad o/y ancianas. Sin embargo, la DMT2 está presentándose cada vez en edades más tempranas, en niños y jóvenes con sobrepeso. A diferencia de la DMT1, en la DMT2 no se requiere por lo general, dosis diarias de insulina, pudiéndose controlar la enfermedad en la mayoría de los casos mediante la adopción de una dieta saludable y actividad física, el mantenimiento del peso corporal dentro de los límites de normalidad, y antidiabéticos orales.

c) Otros tipos más específicos de DM ocasionados por distintas causas: por ejemplo defectos genéticos en la función de las células β o en la acción de la insulina, enfermedades exocrinas del páncreas tal como la fibrosis quística, la diabetes inducida por drogas o químicos, etc.

d) Diabetes gestacional, es la diabetes que se diagnostica por primera vez en el curso del embarazo.

1.1.2. Criterios diagnósticos de diabetes mellitus tipo 2

En 1979 el *Nacional Diabetes Data Group*⁹ de EE.UU., estableció los primeros criterios diagnósticos unificados de diabetes. Posteriormente estos criterios fueron adoptados y modificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la ADA en diferentes informes¹⁰⁻¹². Básicamente, el diagnóstico de DM se basaba en la hiperglucemia determinada mediante las concentraciones de glucosa plasmática en ayunas (GPA) o mediante la glucemia a las 2 horas tras la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) con 75 g de glucosa.

En 1995 la ADA, uno de los órganos más representativos a nivel mundial en la diabetología, promovió la creación de un *Comité Internacional de Expertos* con el objetivo de revisar la literatura científica posterior a 1979 y valorar la necesidad de introducir nuevas modificaciones en los criterios de clasificación y diagnósticos de DM. El informe del *Comité Internacional de Expertos* fue publicado en 1997¹³. A partir de este consenso, se identifican dos grupos de población en los que los niveles de glucemia no alcanzan el umbral diagnóstico de DMT2, pero tampoco pueden ser considerados normales. Se trata de individuos con glucemia basal alterada (GBA), es decir un valor de GPA entre 100 y 125 mg/dl, o con tolerancia alterada a la glucosa (TAG), un valor de GPA a las 2 horas tras la PTOG entre 140 mg/dl y 199 mg/dl. Estos individuos con GBA y/o TAG fueron considerados como “prediabéticos”, lo que indica un riesgo relativamente alto para el futuro desarrollo de DMT2. Cabe señalar que la OMS y otras organizaciones definieron 110 mg/dl como punto de corte para GBA.

En el año 2009, el *Comité de Expertos* formado por representantes de la ADA, la European Association for the Study of Diabetes, y la International Diabetes Federation (IDF), aprobaron la determinación de la hemoglobina glucosilada (HbA1c) como criterio diagnóstico de diabetes¹⁴.

Inmediatamente después, en el año 2010 la ADA incorporó la HbA1c por primera vez como test diagnóstico de diabetes y definió tres puntos de corte para la HbA1c: $\leq 5,6\%$, nivel no diabético; entre 5,7% y 6,4%, nivel prediabético; y, $\geq 6,5\%$, compatible con el diagnóstico de diabetes (punto de corte que se asocia con el aumento de la prevalencia de retinopatía)¹⁵. Los criterios

Introducción

diagnósticos de DMT2 establecidos por la ADA en el último informe publicado 2014 se muestran en la tabla 1 ⁷:

Tabla 1. Criterios diagnósticos de DMT2 establecidos por la ADA en el año 2014.

- 1. Hemoglobina glucosilada $\geq 6,5\%$.** La prueba debe realizarse en un laboratorio utilizando un método certificado por NGSP y estandarizado por DCCT*; o
- 2. Glucemia plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/L).** El ayuno se define como la no ingesta calórica durante al menos 8 horas*; o
- 3. Glucemia plasmática a las 2 horas después de la PTOG (con 75 g de glucosa) ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/L)*;** o
- 4. Glucemia plasmática al azar ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/L)** en pacientes con síntomas clásicos de hiperglucemia (poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso) o crisis de hiperglucemia.

NGSP, *National Glycohemoglobin Standardization Program*; DCCT, *Diabetes Control and Complications Trial*; PTOG, prueba de tolerancia oral a la glucosa. *En ausencia de hiperglucemia inequívoca, los criterios 1-3 deben ser confirmados por pruebas repetidas.

1.1.3. Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 2

En la actualidad, la DMT2 es una de las enfermedades no transmisibles más frecuentes en todo el mundo, que representa entre el 85 y el 95% del total de casos de diabetes. Su prevalencia continua aumentando rápidamente asociada a una combinación de factores demográficos, hereditarios y ambientales que afectan al estilo de vida, dieta, falta de ejercicio y aumento de obesidad ⁴. La DMT2 se encuentra entre las diez primeras causas de mortalidad ¹⁻³. En el 2010, el número total de muertes atribuibles a la diabetes en todo el mundo se estimaba en 3,96 millones dentro del grupo de edad de 20 a 79 años, representando el 6,8% de la mortalidad global ³. En 2013, la diabetes causó 5,1 millones de muertes (8,4% de la mortalidad por todas las

causas) y un coste de 548.000 millones de dólares en gastos de salud (11% del gasto total en todo el mundo), superando en 5,5% las estimaciones del año 2011 ^{4,16}. Además, no debemos pasar por alto que cerca de la mitad de todas las personas con DM no están diagnosticadas o no son conscientes de ello.

Prevalencia de diabetes mellitus tipo 2

Las proyecciones sobre la evolución de la diabetes auguran un espectacular y constante crecimiento de la enfermedad en las próximas décadas. Este aumento será principalmente a expensas de los países en vías de desarrollo. Según las últimas cifras publicadas por la IDF, se estima que el número de personas con diabetes entre la población mundial de 20 a 79 años era de 387 millones en 2014. Cerca del 77% del número total de afectados viven en regiones poco desarrolladas. Sin una acción concertada para prevenir la diabetes, y siguiendo los patrones demográficos actuales, en menos de 25 años se estima que más de 592 millones de personas tendrán diabetes (ver figura 1). Casi el 50% de todos los adultos con diabetes tienen entre 40 y 59 años de edad, siendo este grupo de edad el que seguirá incluyendo el mayor número de personas con diabetes en los próximos años. En general, la prevalencia de diabetes es ligeramente superior en hombres que en mujeres (198 millones de hombres frente a 184 millones de mujeres en 2013).

Introducción

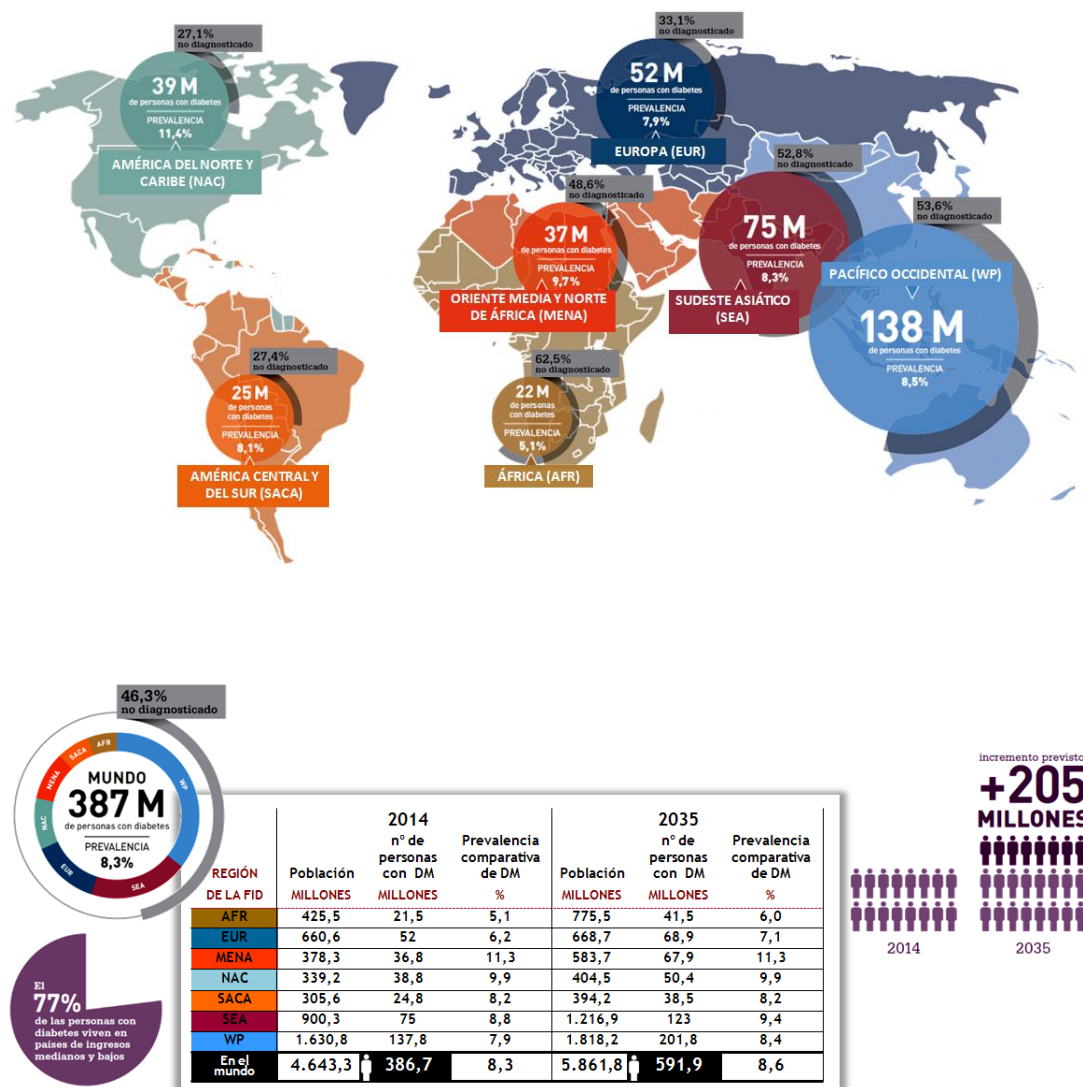


Figura 1. Estimación del número de personas con DMT2 por población (20-79 años) por región de la IDF, 2014 y 2035. Adaptado de: International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 6th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, Actualización de 2014.

En Europa, la prevalencia de diabetes en adultos se estima en 52 millones, el 7,9% de la población adulta. Turquía tiene la mayor prevalencia (14,8%), en cambio, Azerbaiyán tiene una prevalencia estimada de diabetes de sólo el 2,4%. Después de Turquía, los países con mayor prevalencia son Portugal (13,1%), Montenegro, Serbia y Bosnia Herzegovina (12%), Alemania (11,5%), Macedonia (11,4%), Malta (10,7%) y España (10,6%). Los países con el mayor número de personas con diabetes están en su mayor parte en Europa Occidental, como Alemania, España, Italia, Francia y el Reino Unido.

En España, se han llevado a cabo varios estudios que describen una aproximación de la prevalencia de DMT2 mediante el uso de encuestas, registros médicos o estimaciones basadas en consumo de fármacos. Datos disponibles en España con base poblacional sobre prevalencia de DMT2 total (conocida/no conocida) y TAG sitúan la prevalencia entre el 5,6% y el 15,9%¹⁷⁻²⁹, pudiendo variar en función del tipo de estudio, población y métodos utilizados para su diagnóstico.

La mayor prevalencia de diabetes se ha observado en Canarias en el estudio Guía²³, estimándose en un 15,9%. Posteriormente, otro estudio en la misma región, estimó que la prevalencia es del 13,2%¹⁹. En el año 2009, según la Encuesta Europea de Salud realizada en España, las regiones con mayor prevalencia de DMT2 eran Ceuta (9,4%) y Melilla (10,5%), seguidas de Murcia (8,6%), Extremadura (8,3%), Andalucía (7,2%) y Comunidad Valenciana (7,3%). La región con menor prevalencia fue las Islas Baleares (3,3%), mostrando una tendencia creciente en el grupo de población de más de 65 años (19%) independientemente del sexo³⁰.

Los datos más actuales publicados en 2012 son los obtenidos del estudio Di@bet.es²⁹. Este es el primer estudio realizado en España examinando la prevalencia de DMT2, así como otros factores de riesgo cardio-metabólicos en 5.419 personas mayores de 18 años procedentes de 100 centros de salud distribuidos por toda España. Los resultados obtenidos mostraron una prevalencia de DMT2 en España del 13,8%, de estos sujetos el 6% no eran conocidos como tal y, la prevalencia aumentaba con la edad y era mayor en hombres que en mujeres.

Introducción

Incidencia de diabetes mellitus tipo 2

Los estudios de incidencia son importantes y muy útiles para el establecimiento de la etiopatogenia de la DMT2. Éstos son necesarios y se deben hacer, a fin de detectar diabetes asintomática, mediante pruebas específicas, glucemia y/o PTOG repetidas anualmente o tras un lapso de tiempo en la población general.

Son escasos los datos sobre tasas de incidencia en estudios Europeos basados en poblaciones. Estudios realizados sobre población adulta Europea han mostrado tasas de incidencia total de DMT2 (conocida/no conocida) que varían entre el 3,0 por cada 1.000 personas-año en el caso de Suecia, ^{31,32} y 19,1 en el sur de España basados en la PTOG ³³ y, con tasas intermedias por cada 1.000 personas-año para otros países europeos como Islandia (3,7 en hombres y 2,3 en mujeres) ³⁴, Inglaterra (7,3) ³⁵, Italia (7,6) ³⁶, y Alemania (15,5) ³⁷.

En línea con lo anterior, en el estudio InterAct-EPIC ³⁸, incluyendo datos de ocho países de Europa (Dinamarca, Francia, Alemania, Italia, Países Bajos, España, Suecia y Reino Unido), se estimó la tasa de incidencia global de DMT2 en 3,7 casos por 1.000 personas-año, observándose un aumento en la tasa de incidencia con la edad, siendo mayor en hombres que mujeres, lo que refuerza lo observado en otros estudios ^{33,37,39,40}. Sin embargo, no todos los estudios ³⁶ han descrito un mayor riesgo de DMT2 en varones que en mujeres.

Si comparamos las tasas de incidencia de DMT2 en Europa con los datos de estudios realizados en territorio español basados en PTOGs, las cifras son similares, pero muy dispares entre estudios ^{41,42}. Datos procedentes de dos estudios prospectivos realizados en población adulta del norte de España, el estudio de Lejona (realizado en Vizcaya) ⁴³ y el estudio Asturias (realizado en el Principado de Asturias) ⁴⁴, muestran una incidencia de 8,2 y 10,8 casos por 1.000 personas-año respectivamente, incrementándose la incidencia partir de los 60 años de edad. En el estudio Asturiano se observaron diferencias en la incidencia de DMT2 según el grado de hiperglucemia que presentaban los sujetos al inicio del seguimiento. La incidencia expresada en casos por 1.000 personas-año fue de 5 en individuos con normoglucemia, de 21 en individuos

con TAG, de 34,7 en individuos con una GBA, y de 95,2 en individuos que presentaban una combinación de GBA y TAG. Algo similar fue observado en otro estudio realizado en nuestro entorno inmediato, Reus-Tarragona (Cataluña), el estudio TAG ⁴⁵. En este estudio se estimó que la incidencia media anual de DMT2 fue del 9,2%, un 14,2% para el grupo de sujetos con TAG y un 5,3% para el grupo de con tolerancia normal de la glucosa. En esta misma región, un estudio longitudinal retrospectivo ⁴⁶, realizado en un centro de Atención Primaria de Sant Adrià del Besòs (Barcelona), estimó una incidencia anual de 3,7 casos por 1.000 personas. Aunque ligeramente mayor, estas cifras concuerdan con otros estudios realizados en la en la Comunidad de Madrid ⁴⁷ y en Málaga (estudio Pizarra) ³³, que sitúan la incidencia anual de DMT2 entre el 9,4 y 19,1 nuevos casos por 1000 habitantes, respectivamente.

En general, y con todos los datos anteriormente reportados se puede afirmar que la DMT2 es un importante problema de salud pública a nivel global, que irá incrementándose en los próximos años si no se toman las medidas de prevención y control oportunas.

1.1.4. Fisiopatología de diabetes mellitus tipo 2

La fisiopatología de la DMT2 es compleja, pero existe pleno consenso reconociendo que la alteración del metabolismo de la glucosa es consecuencia de una combinación de resistencia a la acción de la insulina e inadecuada secreción de insulina como respuesta compensatoria por parte de las células β pancreáticas ^{48,49}.

Concepto de resistencia a la insulina y principales funciones de la insulina

La resistencia a la insulina (RI) se define como la incapacidad genética o adquirida de los tejidos diana de responder normalmente a la acción de la insulina circulante.

Introducción

La insulina es una hormona anabólica secretada por las células β del páncreas en respuesta a diversos estímulos, siendo la glucosa el más relevante, cuya función principal es mantener la homeostasis glucemia y de otros sustratos energéticos a través del equilibrio entre la acción y secreción de la insulina. En situación post-prandial se produce un aumento de los niveles de glucosa plasmáticos. Como respuesta y para intentar mantener una glucemia constante, el páncreas responde mediante la secreción de insulina, cuyas principales funciones son: a) estimular la captación y almacenamiento de la glucosa en tejidos como el musculo, tejido adiposo e hígado mediante la estimulación de la síntesis de glucógeno, y estimula la síntesis proteica en el musculo e hígado; b) inhibir la gluconeogénesis y proteólisis hepática; y c) inhibir los procesos de lipólisis en el tejido adiposo, disminuyendo la circulación de ácidos grasos libres (AGL), mientras que estimula la lipogénesis, favoreciendo la síntesis de triglicéridos y la acumulación de éstos en los adipocitos.

En un estado de RI o sensibilidad a la insulina disminuida, la acción de esta hormona a nivel celular está reducida, lo que hace que aumente la secreción de insulina (hiperinsulinemia) para compensar el defecto en la acción tisular, a fin de mantener la homeostasis glucemia. Esta RI mantenida conduce a un fracaso de las células β del páncreas que en combinación, provocan la hiperglucemia debido a una disminución del transporte de glucosa al interior de la célula en los tejidos diana y por un aumento de la producción hepática de glucosa. Además de otras alteraciones en la homeostasis de los ácidos grasos, de los triglicéridos y de las lipoproteínas, que van a favorecer la aparición de DMT2 ⁴⁸⁻⁵¹ (ver Figura 2).

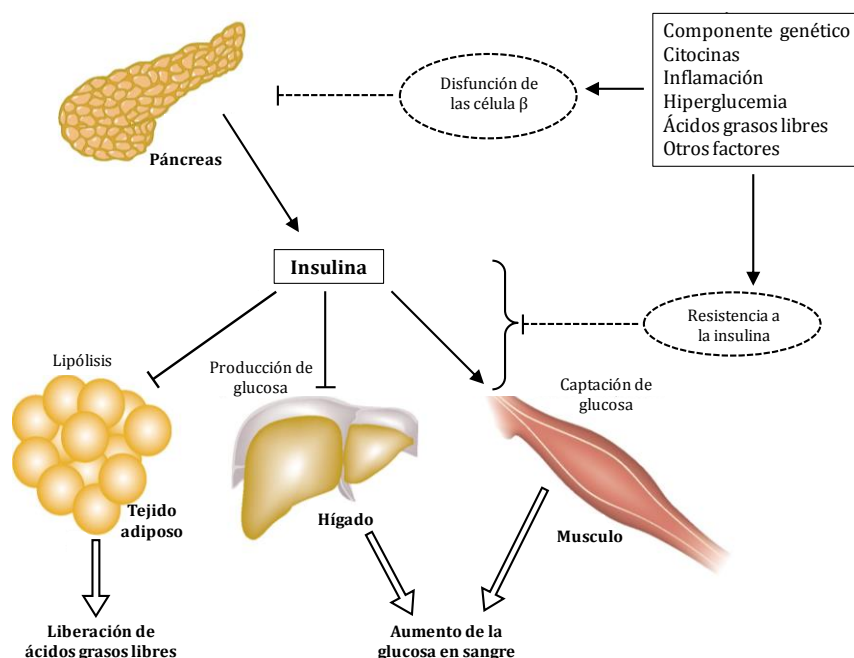


Figura 2. Fisiopatología de la hiperglucemia y aumento de ácidos grasos circulantes en la DM2. Adaptado de: Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. 2005 ⁵²

Evaluación de la resistencia insulínica

La RI puede ser determinada mediante varios métodos diagnósticos: 1) el *clamp* hiperinsulinémico-euglucémico, que representa el estándar de oro para medir la sensibilidad tisular a la insulina y la secreción de insulina aunque, por su complejidad, no es de utilidad clínica, 2) los índices de RI basados en mediciones de ayuno, HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) y QUICKI (Quantitative Insulin Check Index), que por su simplicidad y buena correlación con el método *clamp* son los más utilizados para evaluar RI en la clínica y, 3) el índice Matsuda-DeFronzo (ISI-Compuesto) calculado a partir de las mediciones de glucosa e insulina obtenidas en una curva de la PTOG ⁵³.

Introducción

Mecanismos moleculares de acción y señalización de la insulina

Una vez que la insulina entra en la circulación sistémica, ésta inicia su acción uniéndose a su receptor (IR, insulin receptor, en inglés), situado en la superficie de las células. Éste pertenece a la familia de receptores que poseen actividad intrínseca cinasa de tirosina. La unión insulina-IR, estimula su autofosforilación, así como la de varios sustratos de señalización intracelulares, incluyendo los miembros de la familia de sustratos del IR (IRS) — IRS-1, IRS-2, IRS-3 y IRS-4 — y las proteínas Cbl, Shc, y Gab1, que actúan como proteínas intracelulares de anclaje para otras proteínas. Como consecuencia de todos estos eventos, se activa una serie de reacciones de fosforilación/desfosforilación en cascada que desembocan en los importantes efectos metabólicos y mitógenos derivados de la insulina ^{50,54}.

Las tres principales vía de señalización que emanan de la activación del IRS son (ver Figura 3) ^{50,54} : a) La vía de la cinasa de fosfoinositol trifosfato (PI3-K), donde la PI3-K activada cataliza la formación de fosfoinositol-3-fosfatos, el cual se comporta como un segundo mensajero que puede activar la PDK, y ésta a su vez fosforila y activa a la Akt (existen en tres isoformas: Akt1, Akt2 Akt13) y la PKC. La fosforilación de estas proteínas es necesaria para activar la translocación de las vesículas intracelulares que contienen el transportador de glucosa de alta afinidad GLUT4 hacia la membrana plasmática, activar la glucogénesis, la lipogénesis y la síntesis de proteínas.

b) Además de la vía PI3-K, en tejidos sensibles a la insulina, el transporte de glucosa se estimula también por otra vía secundaria, la vía CAP/Cbl/Tc10. Y finalmente, c) la vía de señalización que involucra a las cinasas activadas por mitógenos (MAPK, siglas en inglés), esencial en la regulación del crecimiento y proliferación celular, así como de la expresión génica ^{50,54}. La activación de ésta vía es mediada por el complejo Grb2/SOS que activa a Ras (proteína GTP-Ras). Las principales familias de MAPKs que pueden ser activadas vía Ras son tres, cinasa c-Jun NH₂-terminal (JNK), cinasa activada por señales extracelulares (ERK) y cinasa p38.

Para cada uno de los pasos que se activan por la acción de la insulina existen complejos y sensibles mecanismos de control que limita la duración y las señales. Unos de autorregulación a través del IR y sus IRS, y otros de desensibilización a través de vías alternativas. Las fosfatasas encargadas de esta función son la proteína fosfatasa de tirosina 1 β (PTP1 β), homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) y SHIP-2.

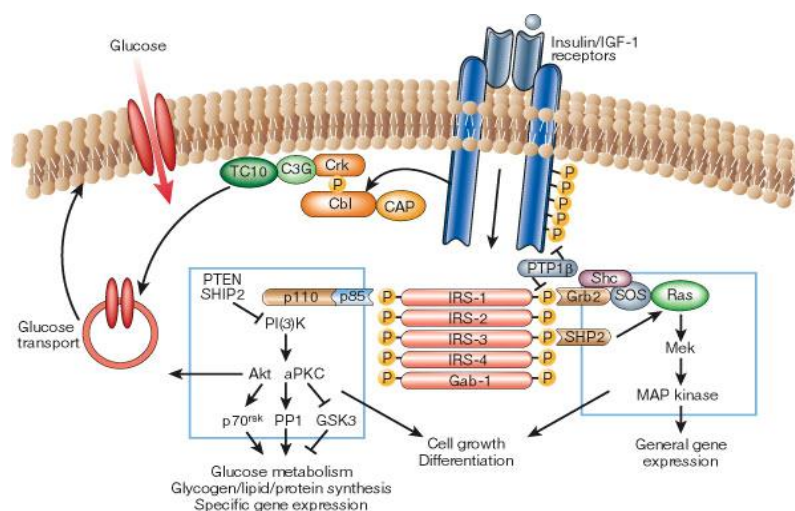


Figura 3. Vías de transducción de señales tras la acción de la insulina. Fuente: Saltiel AR, Kahn CR. 2001 ⁵⁵

Mecanismos responsables del desarrollo de la resistencia a la insulina

Aunque siendo múltiples los mecanismos que pueden conducir hacia la RI, estos pueden ser clasificados fundamentalmente como alteraciones: a) a nivel receptor, en la unión insulina-IR, y/o, b) a nivel post-receptor, tras la unión insulina-IR, que involucran desensibilización en los IRS o en proteínas que forman parte de la cascada de señales intracelulares desencadenadas por la acción de la insulina.

Introducción

Las fosforilaciones en los residuos de serina/treonina a nivel del IR y de sus IRS llevadas a cabo por cinasas de serina/treonina [como las proteínas mTOR (mammalian Target of Rapamycin), PKC, IKK (cinasa del inhibidor de NFκB) o JNK], se consideran uno de los mecanismos claves para el desarrollo de resistencia a la insulina. Estas cinasas, pueden inducir la disociación de los IRS del IR, bloquear sitios de fosforilación en tirosinas en los IRS, separar a éstos del complejo de proteínas acopladas o su degradación ^{56,57}.

De hecho, se ha descrito una reducción en la actividad tirosina cinasa del RI y sus IRS en rabdomiocitos de pacientes obesos con RI o pacientes diabéticos, siendo en algunos casos consecuencia de un aumento en la cantidad de serinas fosforiladas ^{58,59}. Sin embargo, se ha propuesto que las alteraciones *post-receptor* son las más frecuentes en condiciones patológicas tal como la obesidad y/o DMT2, y posiblemente las que están más directamente implicadas en el desarrollo de la RI ⁶⁰.

Como inductores de RI se han implicado a un gran número de citocinas pro-inflamatorias como el TNF-α y la IL-6 entre otras, además de los AGL que inhiben la fosforilación de IRS-1; tal como se ha comentado, dicha inhibición y la disminución de la unión IR-IRS1 condicionan la RI ^{50,61}.

1.1.5. Factores de riesgo de diabetes mellitus tipo 2

La DMT2 es una patología compleja de etiología multifactorial, en la que factores genéticos y ambientales interactúan jugando un papel importante como favorecedores del desarrollo de la enfermedad. A continuación se realiza una breve descripción de los distintos factores que intervienen directamente en la etiopatogénesis de la DMT2.

1.1.5.1. Factores de riesgo no modificables

a) Factores familiares y/o genéticos

En lo que respecta a los antecedentes familiares de DMT2 y su relación con el riesgo de desarrollarla, son escasos los estudios que se han centrado en valorar tal efecto. Resultados provenientes de estudios epidemiológicos muestran que la existencia de progenitores con DMT2 se asocia a mayor riesgo de desarrollar la enfermedad por parte del descendiente. Ha sido descrito que el riesgo de desarrollar DMT2 es del 40% para aquellos que tienen un padre afectado (mayor si es la madre en lugar del padre), y del 70% si ambos padres son diabéticos ⁶². También se ha descrito, que en gemelos monocigóticos (idénticos genéticamente), la tasa de concordancia de la enfermedad se acerca al 100%, mucho más alta que la observada en gemelos no idénticos (dicigóticos) o entre hermanos ⁶³. Además, la predisposición genética en la DMT2 es confirmada por las observaciones de que existen diferencias en las tasas de prevalencia de la enfermedad entre diferentes poblaciones y etnias ⁴, incluso después de la migración de grupos étnicos enteros a otro país. Estos hechos, muestra indicios de que los antecedentes familiares de DM actúan de forma independiente de las influencias ambientales ⁶⁴⁻⁶⁶.

Aunque todavía es poco conocido, el papel de la genética en la DMT2 está bien documentado. En los últimos años han sido identificados un gran número de variantes genéticas. Sin embargo, la implicación de múltiples genes que interactúan entre sí de una manera epistática en la patogénesis de la DMT2 puede explicar por qué, a pesar de los enormes esfuerzos realizados hasta la fecha, los mecanismos funcionales por los que los genes asociados son responsables de un aumento de la susceptibilidad a la DMT2 sigue sin esclarecerse ⁶⁷⁻⁶⁹.

La mayoría de los genes identificados están involucrados en la masa y/o función de las células β , sugiriendo que la mayor parte del riesgo asociado con la DMT2 se refiere a defectos genéticos en las células β , mientras que la RI es el resultado principalmente del componente ambiental (incremento de la ingesta calórica, exceso de peso, y estilos de vida poco saludables que incluyen el sedentarismo y la dieta, entre otros) ^{67,68}.

Introducción

Algunos ejemplos de importantes variantes genéticas implicadas en la secreción de la insulina incluyen: polimorfismos en gen que codifica para CAPN10 y IRS-1⁷⁰⁻⁷². Tal como, la variante Gly972Arg de IRS-1 que determina un defecto en la unión de la subunidad p85 de la PI3-K, causando una disminución en la secreción de insulina⁷³; polimorfismos en el gen ABCC8 (conocido como SUR1) y en el gen KCNJ11 que codifica para una proteína llamada Kir6.2. Los dos genes están implicados en la formación de los canales de K⁺ sensible a ATP, un factor clave en el proceso de secreción de la insulina en las célula β ⁶⁸; polimorfismos en el gen de TCF7L2 que codifica al factor transcripcional TCF4, siendo la variante rs7903146 la que mayor efecto produce sobre el riesgo de DMT2⁷⁴.

Entre las variantes genéticas en genes implicados en la acción de la insulina, polimorfismos en el gen HMGA1, un regulador clave de la expresión génica del IR, muestran las asociaciones más fuertes con el riesgo de DMT2, y su variante más frecuente, rs146052672 es la que confiere un mayor riesgo de diabetes^{75,76}. Algunas otras variantes genéticas que predisponen al desarrollo de RI han sido identificadas en los genes que codifican para GKR (proteína reguladora de la glucocinasa), y para IGF-1⁷⁷. También se han descrito 3 loci nuevos asociado con mayores niveles de insulina en ayunas y una reducción de la sensibilidad a la insulina, en los genes FTO, KLF14 y PPAR γ ⁷⁰. Otros gen implicado en la DMT2 es el GRB14, que codifica para la proteína adaptadora Grb14⁷⁸.

b) Edad y sexo

Tener una edad avanzada confiere un riesgo mayor de desarrollar DMT2. Casi la mitad de todos los adultos con DMT2 en el mundo tienen entre 40 y 59 años de edad. Las personas que actualmente tienen TAG tienen usualmente menos de 50 años (153 millones de personas en todo el mundo), y casi un tercio están en el grupo de población de 20 a 39 años de edad. Éstos, si no son tratados, corren un alto riesgo de desarrollar DMT2 con el tiempo⁴.

El sexo es un factor cuyo papel en la progresión a DMT2 todavía es controvertido, con evidencias tanto a favor ^{43,44,47} como en contra de su posible implicación ^{33,46}. A nivel mundial, la prevalencia de diabetes es similar en hombres y mujeres, siendo ésta ligeramente más alta en hombres sobre todo en edades más avanzadas (198 millones de hombres frente a 184 millones de mujeres) ⁴. Sin embargo, existen pruebas de que en algunos países la tasa de prevalencia y la de incidencia de DMT2 está aumentando en niños, adolescentes y jóvenes adultos con sobrepeso, siendo considerablemente estas cifras superiores en mujeres que en varones ⁷⁹.

c) Diabetes gestacional

La diabetes gestacional se desarrolla en un 6 a 8% de los embarazos y algunos estudios describen que las mujeres con antecedentes de diabetes gestacional presentan un mayor riesgo de desarrollar DMT2 con el tiempo. De acuerdo a lo observado por Lee y colaboradores ⁸⁰, en 5470 gestantes con diabetes gestacional y 783 controles, después de 15 años de seguimiento, el riesgo de desarrollar DMT2 fue 9.6 veces mayor en gestantes que habían padecido diabetes gestacional respecto a las gestantes que no cursaron con esta enfermedad durante el embarazo.

1.1.5.2. Factores de riesgo modificables

a) Estilos de vida

Existe evidencia suficiente demostrando que la DMT2 se puede prevenir con cambios de estilo de vida. Una modificación del estilo de vida promoviendo la pérdida de peso a través de dietas hipocalóricas, junto con el aumento de la actividad física, se ha visto que puede reducir el riesgo relativo de diabetes hasta un 50% ^{81,82}, valores que van incluso más allá de los obtenidos mediante tratamiento farmacológico ⁸³.

Introducción

Dieta

Existen numerosas evidencias científicas basadas en estudios prospectivos de grandes cohortes que justifican la recomendación de seguir una dieta saludable para la prevención y control de la DMT2 ^{84,85}.

Uno de los principales patrones saludables conocido por sus efectos beneficiosos sobre la salud es el que se conoce como "dieta Mediterránea". Este patrón de dieta se caracteriza por una ingesta elevada de frutas, verduras, legumbres, cereales integrales, frutos secos y aceite de oliva virgen extra; un consumo moderado de pescado y alcohol, y una ingesta baja de carnes, dulces y alimentos procesados ^{86,87}. De hecho, varios estudios prospectivos han demostrado una asociación inversa entre el grado de adherencia a un patrón alimentario tipo Mediterráneo y la incidencia de DMT2 ⁸⁸⁻⁹⁴. Estos estudios aportan suficientes evidencias científicas para asegurar que una dieta como la dieta Mediterránea previene la aparición de DMT2.

El máximo grado de evidencia disponible a este respecto procede del ensayo de campo PREDIMED ^{94,95}, el ensayo de campo más grande realizado en España con personas de alto riesgo cardiovascular. Tras una intervención de más de 4 años de seguimiento, los participantes aleatorizados a los grupos de intervención con dieta Mediterránea enriquecida con aceite de oliva virgen (1L/semana) o con frutos secos (30 g/día), presentaron una reducción significativa del riesgo de incidencia de DMT2 del 40% y una reducción del riesgo no significativa de 18% respectivamente, en comparación con los participantes que seguían recomendaciones para seguir una dieta baja en grasa. Estos cambios se observaron en ausencia de variaciones en el peso corporal y sin cambios significativos en la actividad física ⁸⁸. Estos mismos hallazgos se observaron en un subestudio del ensayo PREDIMED publicado anteriormente en la cohorte de Reus-Tarragona, donde ambas dietas Mediterráneas reducían en un 48% el riesgo de incidencia de DMT2 determinado anualmente mediante PTOGs ⁸⁹.

En línea con lo anterior, en un subestudio publicado en la cohorte de PREDIMED, tras 3 meses de intervención, se observó una mejora de los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas, una

menor RI y una reducción en los marcadores de inflamación circulantes en los dos grupos de intervención aleatorizados a seguir la dieta Mediterránea en comparación al grupo control ⁹⁶ lo que podría explicar esta protección en cuanto a padecer diabetes a largo plazo.

Además del patrón de dieta Mediterránea, numerosos estudios han observado que el patrón de dieta tipo *DASH* (Dietary Approaches to Stop Hypertension), el cual se aconseja para tratar la hipertensión y las dietas veganas carentes de productos de origen animal se han asociado con una reducción en la incidencia de DMT2 ⁹⁷⁻¹⁰².

Por el contrario, la adherencia a un patrón dietético "Occidentalizado" (caracterizado por ingesta elevada de carne roja, carnes procesadas, patatas fritas, productos lácteos de alto contenido en grasas, dulces y postres) se ha asociado con un mayor riesgo de padecer con el tiempo DMT2, así como con un peor control de la glucemia ^{103,104}. Por ejemplo, en un estudio prospectivo realizado por Van Dam y colaboradores ¹⁰⁵, tras 12 años de seguimiento se observó que aquellos que consumían un patrón dietético "Occidentalizado" presentaban un 59% mayor riesgo de desarrollar DMT2. Este riesgo era incluso superior en los sujetos que al inicio presentaban obesidad ¹⁰⁵.

Actividad Física

El nivel de actividad física se ha reducido en las últimas décadas, siendo el sedentarismo un importante factor de riesgo de hiperglucemia, hipertensión, dislipemia y enfermedad cardiovascular, tanto en individuos sanos como en aquellos que presentan una DMT2 ¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Sin embargo, a pesar de los conocidos beneficios que tiene para la salud la actividad física, las personas con DMT2 suelen ser más sedentarios y realizar menos actividad física ^{109,110}.

La mayoría de los beneficios de la práctica de actividad física tanto para el control de la DMT2, como para su prevención pueden explicarse a través del control agudo y crónico de la acción de la insulina ¹¹¹⁻¹¹³. Varios estudios han demostrado de forma consistente que la progresión de

Introducción

prediabetes a DMT2 se reduce con la pérdida de peso y el aumento en la actividad física ¹¹⁴, mientras que en sujetos con DMT2, las intervenciones promoviendo la actividad física favorece no tan solo el control metabólico de la enfermedad, sino también el riesgo a largo plazo de las complicaciones relacionadas con ésta ¹¹⁵⁻¹¹⁷.

En el estudio de InterAct (incluyendo datos de 26 centros de ocho países: Dinamarca, Francia, Alemania, Italia, España, Suecia, Reino Unido, los Países Bajos), una diferencia en el nivel de actividad física (por ejemplo, entre inactividad y actividad moderada) se asoció con una reducción del 13% y 7% en el riesgo de incidencia DMT2 en hombres y mujeres, respectivamente ¹¹⁸.

Por otro lado, no solo es importante la práctica de actividad física si no también la intensidad y la frecuencia con la que se practica. Existen evidencias que demuestran que los individuos que practican regularmente actividades físicas de intensidad moderada tienen un 30% menos riesgo de desarrollar DMT2 en comparación con los individuos sedentarios ¹¹⁹. Además, la misma disminución en el riesgo de DMT2 se ha visto en personas que practican caminatas regulares con una frecuencia $\geq 2,5$ h/semana a paso ligero, en comparación con los personas que casi ni caminan ¹¹⁹.

Hábito tabáquico

El hábito tabáquico activo es un factor de riesgo altamente documentado DMT2 ¹²⁰. Varios estudios prospectivos de cohortes también han observado una mayor incidencia de DMT2 entre los individuos fumadores pasivos ¹²¹, que según un estudio publicado en el 2011, son un 40% de los niños, un 33% de los varones, y un 35% de las mujeres en todo el mundo ¹²².

b) Sobrepeso u obesidad

El sobrepeso y la obesidad constituyen un serio problema de salud pública a nivel mundial. El principal condicionante son los cambios en los estilos de vida, los cuales han ido acompañados de una ganancia de peso como consecuencia de un desbalance energético - con un mayor ingesta de calorías procedente principalmente de los alimentos con altos contenidos en azúcares y grasas saturadas - y una reducción de la práctica de actividad física.

La OMS define la obesidad como la acumulación anormal o excesiva de grasa corporal total que puede ser perjudicial para la salud; definiendo como sobrepeso aquellos individuos que presentan un IMC (Índice de Masa Corporal) igual o superior a 25 kg/m² y obesidad a aquellos con IMC igual o superior a 30 kg/m² ¹²³.

El exceso de peso corporal es uno de los factores de riesgos modificables más importantes para la DMT2. Las tasas de prevalencia e incidencia de DMT2 están aumentando exponencialmente en forma paralela al incremento del sobrepeso y obesidad a nivel mundial ¹²⁴. A pesar que no todos los individuos diabéticos son obesos y que muchos sujetos obesos no tienen diabetes, existen varios estudios que confirman que en general la mayoría de los sujetos con DMT2 tienen sobrepeso. Asimismo, las personas obesas tienen un mayor riesgo de desarrollar DMT2 con el tiempo ¹²⁵. Por ejemplo, en el estudio NHANES (The National Health and Nutrition Examination Survey) 1999–2004, realizado en EE.UU. en población a partir de 19 años de edad, se observó que el riesgo en la prevalencia de diabetes incrementaba linealmente con el IMC. El rango en el riesgo fue de 2,4% para individuos con peso normal (IMC, 18,5-24,9 kg/m²) hasta 14,2% para individuos con obesidad clase III (IMC \geq 40,0 kg/m²) ¹²⁶. Más recientemente, en un meta-análisis de estudios de cohortes prospectivos procedentes de EE.UU. y Europa, se observó que tanto el sobrepeso como la obesidad se asociaban a un incremento en el riesgo de diabetes. Los hombres obesos tenían 7 veces más riesgo de desarrollar DMT2, mientras que las mujeres con obesidad presentaban un riesgo de diabetes 12 veces mayor en comparación con los individuos situados en el rango de peso saludable ¹²⁷.

Introducción

Más que la que la cantidad grasa corporal total, la distribución de la grasa y sobre todo a nivel abdominal, se ha visto que es más importante en la evaluación de riesgo de la enfermedad ¹²⁸. De hecho, varios estudios prospectivos indican que el perímetro de la cintura o el ratio cintura/cadera podrían ser mejores indicadores de riesgo de DMT2 que el propio IMC ^{127,129-133}. Sin embargo, en una revisión sistemática y meta-análisis de 17 estudios prospectivos (de entre 3 y 15 años de seguimiento) y 35 estudios transversales realizado sobre adultos de 18 a 74 años de edad, tanto el IMC como el perímetro de la cintura fueron predictores y se asociaron de forma independiente con la DMT2 ¹³⁴.

Cercano a nuestra región, en la cohorte española del estudio EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) realizado sobre 37.733 participantes durante 12 años de seguimiento se analizó el riesgo de incidencia de DMT2 según distintas medidas antropométricas. En éste estudio se observó que tanto la obesidad general como obesidad abdominal se asociaban de forma independiente con el riesgo de desarrollar DMT2; el mejor indicador de riesgo fue el IMC en hombres, y los indicadores de obesidad abdominal como el perímetro de la cintura, e índices cintura-cadera y cintura-altura en mujeres ¹³⁵. Asimismo, en un subestudio realizado por nuestro grupo en una población de elevado riesgo cardiovascular del estudio PREDIMED, se encontró que el índice cintura-altura y perímetro de la cintura fueron mejores predictores del riesgo de prevalencia de DMT2 que el IMC o el peso corporal ¹³⁶.

A todo lo anterior, se le suman los resultados de estudios prospectivos que han valorado a largo plazo la relación entre los cambios de peso y la incidencia de diabetes ¹³⁷⁻¹⁴³. Por ejemplo, en la cohorte NHEFS (The National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up Study) valorando 1.929 adultos no diabéticos con sobrepeso se observó que por cada kilogramo de peso ganado al año (durante un promedio de 10 años) aumentó en un 49% el riesgo de desarrollar DMT2 en los siguientes 10 años en comparación con los individuos que mantenían un peso estable. A la inversa, por cada kg/año de peso perdido se asoció con un 33% menos riesgo de DMT2 ¹³⁷. Éste hallazgo se replicó en la cohorte de los profesionales Sanitarios (Health Professionals Follow-up Study) ¹³⁹ con 22.171 sujetos. En éste estudio se observó que por cada kg de peso ganado entre los años 1986 y 1996, el riesgo en la incidencia de DMT2

aumentaba en un 7,3% en los siguientes 4 años. Asimismo, un aumento de la grasa abdominal se asociaba positivamente con el riesgo de DMT2 independientemente de los cambios ocurridos en el peso durante el seguimiento ¹³⁹.

Por lo tanto, y dado el efecto que tiene el exceso de peso sobre el desarrollo de la DMT2, todas las estrategias enfocadas a la pérdida peso y basadas principalmente en cambios en los estilos de vida contribuyen directamente en reducir el riesgo de DMT2, y además, controlar la diabetes una vez establecida ^{83,114,144-146}.

1.1.6. Obesidad, inflamación y resistencia a la insulina

La obesidad, y principalmente la obesidad de predominio abdominal, ha sido asociada a un estado de inflamación crónica de bajo grado caracterizado por la producción anormal de citocinas pro- y anti-inflamatorias, con un aumento de las primeras y una disminución de las segundas, secretadas por los adipocitos hipertrofiados. Asimismo, la obesidad induce la acumulación de macrófagos en tejido adiposo que contribuyen a la producción de muchas de las moléculas inflamatorias secretadas por éste. Dichas moléculas activan, regulan o son mediadores de vías de señalización pro-inflamatorias ¹⁴⁷⁻¹⁵⁴ implicadas en el desarrollo de aterosclerosis y RI inducida por la obesidad ¹⁴⁷, la cual favorece el desarrollo de SM y de la DMT2 ¹⁵⁵⁻¹⁵⁸.

Entre la variedad de moléculas segregadas por el tejido adiposo, se ha observado que los individuos obesos poseen concentraciones séricas incrementadas de citocinas de acción pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1, IL-8, leptina, visfatina, resistina, PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno), RBP4 (proteína transportadora de retinol tipo 4) y MCP-1 (proteína quimio atrayente de monocitos-1). Todas estas citocinas pro-inflamatorias se encuentran involucradas en el desarrollo de la RI, ya sea directamente por que afectan a la vía de señalización de la insulina o indirectamente a través estimulación de las vías inflamatorias. Por el contrario, el tejido adiposo de sujetos delgados segrega moduladores inflamatorios como

Introducción

la adiponectina, vaspina e IL-10, con función insulino-sensibilizadora, mejorando la acción de la insulina ^{156,159-161}.

Un claro ejemplo y muy bien estudiado de citocina pro-inflamatoria, es el TNF- α , que fue la primera molécula que relacionó obesidad, inflamación y RI. El TNF- α es una de las principales citocinas pro-inflamatoria implicada en la respuesta inflamatoria en el adipocito y el músculo esquelético. En humanos, los niveles circulantes de TNF- α están elevados en sujetos obesos y sujetos con resistencia a la insulina, y éstos se asocian positivamente con el IMC. Asimismo, se ha encontrado un incremento en los niveles plasmáticos de TNF- α asociado paralelamente con el incremento del número de componentes del SM ¹⁶². Por el contrario, se han observado unas reducciones en los niveles circulantes y en de expresión del RNAm del TNF- α en tejido adiposo de sujetos obesos tras la pérdida de peso corporal ^{163,164}.

Además, se ha descrito que en células de tejido adiposo *in vitro*, la exposición durante 24 horas a TNF- α produce una disminución en la expresión de genes que codifican para los transportadores de glucosa GLUT4 y de varias proteínas de señalización de la insulina, incluyendo el IR, el IRS-1, y la AKT ¹⁶⁵. También se ha observado que un incremento de la expresión de RNAm de TNF- α en tejido adiposo de sujetos obesos se correlaciona positivamente con la RI ¹⁶⁶. El TNF- α disminuye la señalización intracelular del IR en adipocitos y en células de músculo esquelético humano. Debido a su capacidad para fosforilar la serina del SRI-1 mediante un mecanismo dependiente de JNK1/2, disminuyendo así la actividad tirosina cinasa del receptor de insulina y por tanto disminuyendo la amplificación intracelular de la señal de éste, generando un estado de resistencia a la insulina ^{163,167}. Por lo tanto, estos hallazgos junto con otros muchos, sugieren que el TNF- α es una molécula que juega un papel importante en la regulación de la acción de la insulina y la homeostasis de la glucosa en la obesidad ¹⁶⁶.

Junto con el TNF- α , otra de las citocinas inflamatorias mejor estudiadas en relación con la obesidad y la resistencia a la insulina, es la IL-6. Respecto al metabolismo de la glucosa, se ha publicado que la expresión de RNAm de IL-6 en tejido adiposo está incrementada en estados de obesidad y resistencia a la insulina ¹⁶⁸. Asimismo, los niveles séricos de IL-6 se han encontrado

elevados en sujetos obesos ^{161,169}, y éstos se han asociado inversamente con medidas de sensibilidad a la insulina en individuos aparentemente sanos ¹⁷⁰. De hecho, algunos autores proponen que niveles séricos elevados de IL-6 pueden predecir el desarrollo de DMT2 ¹⁷¹.

Los mecanismos moleculares mediante los que la IL-6 causa resistencia o sensibilidad a insulina no se conocen con exactitud. Sin embargo se ha propuesto, que de manera similar a la acción del TNF- α , la IL-6 disminuye la activación del IRS-1 y de la PI3-K, condición que contribuye a la resistencia a la insulina en músculo.

Por otra parte, la IL-6 es un potente inductor de proteínas hepáticas de respuesta de fase aguda, como son la proteína C reactiva (PCR), el fibrinógeno, la haptoglobina y la proteína sérica del amiloide A, con las implicaciones que todas ellas tienen en los procesos inflamatorios ^{172,173}.

Finalmente, otra importante molécula secretada por el tejido adiposo, en este caso, con acciones anti-inflamatorias que sugieren un papel protector en el desarrollo de RI es la adiponectina ¹⁷⁴. La deficiencia de adiponectina o la de sus receptores en modelos animales, da lugar a un estado de RI; y, recíprocamente, la administración de adiponectina o la sobreexpresión de los receptores de adiponectina mejoran la acción de la insulina y la diabetes ¹⁷³.

Varios estudios han demostrado que tanto en humanos como en modelos animales la expresión de adiponectina se encuentra disminuida en todos los procesos relacionados con estados de inflamación y RI, como en la obesidad y la DMT2, así como en la enfermedad cardiovascular ¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. En un estudio realizado por Hotta y colaboradores,¹⁷⁶ encontraron que los niveles de adiponectina fueron más bajos en pacientes con DMT2 que en los pacientes no diabéticos, y que éstos fueron especialmente más bajos en sujetos con enfermedad coronaria. En este estudio, las concentraciones de adiponectina se correlacionaron negativamente con la glucosa plasmática, los niveles de insulina y triglicéridos e IMC, pero positivamente con los niveles séricos de HDL-colesterol ¹⁷⁶. Asimismo, varios estudios prospectivos han sugerido que niveles séricos elevados de adiponectina juegan un papel protector en el desarrollo de DMT2 ¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

Introducción

La acción “antidiabética” y de mejora de la sensibilidad a la insulina de la adiponectina se explica, en parte, por sus efectos sobre el metabolismo hepático y muscular. La adiponectina inhibe la gluconeogénesis hepática, y aumenta la captación y utilización de la glucosa por el músculo esquelético. Además, ésta favorece la reducción del contenido en triglicéridos en hígado y músculo, ya que estimula la oxidación de ácidos grasos y suprime la lipogénesis, procesos relacionados con la patogénesis de la RI. Todos estos efectos de la adiponectina en células hepáticas y musculares están mediados por mecanismo que involucra la activación de las MAPK y del PPAR α ^{173,180}.

Por otro lado, está el papel protector de la adiponectina frente a la inflamación, que parece deberse a sus efectos inhibitorios sobre la secreción y señalización del TNF- α , y mediante la inhibición indirecta de otras moléculas pro-inflamatorias como IL-6 y la PCR así como moléculas de adhesión endotelial como ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1) y VCAM-1 (molécula de citoadhesión vascular-1), ya que la producción de todas ellas esta inducida por TNF- α ¹⁷⁴.

Esto pone de manifiesto que el tejido adiposo no actúa solo como un simple reservorio de energía, sino también como un tejido muy activo que secreta importantes moléculas, que ejercen sus funciones biológicas de manera autocrina, paracrina, o sistémica, e influyen en varios procesos fisiológicos relacionados con el metabolismo energético, el metabolismo de la glucosa, y la inmunidad innata ^{160,181}.

1.1.7. Biomarcadores del estado inflamatorio y diabetes mellitus tipo 2

Existen numerosos estudios sugiriendo que individuos con nuevo diagnóstico de DMT2 ya presentaban evidencia de una inflamación sistémica en el momento del diagnóstico, y que la enfermedad (o la hipertrigliceridemia ¹⁸²) ha estado presente ya, desde hace años hasta desarrollar la condición que predispone a la enfermedad (por ejemplo, el sobrepeso; ver figura 5) ^{6,77,171,183-185}. Estos hallazgos junto a que es sabido que más de un tercio de las personas con DMT2 no están diagnosticadas, indican la necesidad de establecer predictores más sensibles y

específicos de riesgo temprano. En este sentido, datos recientes de estudios transversales y prospectivos, han demostrado que las concentraciones circulantes de IL-6 y PCR, están asociadas con la DMT2 ¹⁸⁶, sugiriéndose como posibles biomarcadores candidatos para la detección temprana del riesgo de DMT2.

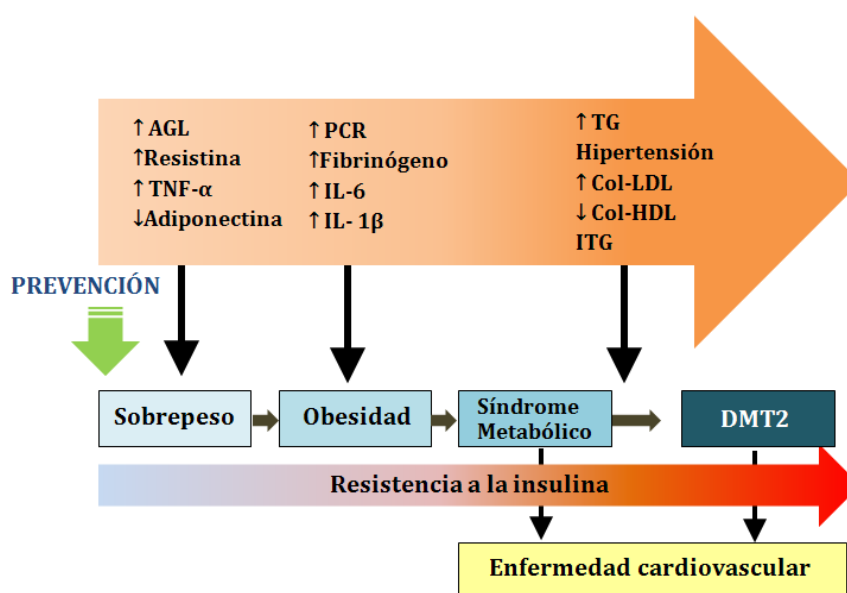


Figura 4. Relación entre marcadores inflamatorios y factores específicos de la enfermedad como una etapa patológica continua, pasando desde el sobrepeso a la DMT2 y a la ECV. Adaptado de: Badawi A, y col., 2010 ¹⁸⁵

Además, son varias las evidencias de estudios prospectivos que también han demostrado de forma convincente una asociación entre las concentraciones circulantes de diversos marcadores de inflamación secretados por el tejido adiposo como PAI-1, ¹⁷¹, IL-6, IL8, angiotensinógeno (AGT), factor de crecimiento TGF-beta 1 (TGF-β1), y la adiponectina ^{177,179,187}, leptina ^{188,189} y la resistina entre otros, con indicadores de aumento de grasa corporal, resistencia a la insulina, enfermedad cardiovascular y la predicción del riesgo de DMT2 ^{6,190,191}.

Introducción

Por otro lado, también cabe destacar, que junto con moléculas derivadas del tejido adiposo, otros marcadores procedentes de diferentes índoles en este contexto de obesidad e inflamación, también están adquiriendo gran interés, ya que han sido relacionados con procesos inflamatorios asociados al desarrollo de RI, factores de riesgo cardiovascular e incidencia de DMT2 ^{6,192}. Estos incluyen a) moléculas de adhesión endotelial: ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1) ¹⁹³, selectina-E ¹⁹⁴, fibrinógeno, PAI-1 ¹⁹⁵ y, RBP4 ¹⁹⁶; b) proteínas de origen hepático: PCR ¹⁷¹, ALT (alanina aminotransferasa), GGT (gamma glutamil transferasa) ^{197,198}; y, c) proteínas implicadas en el metabolismo del hierro como la ferritina y el receptor de transferrina ¹⁹⁹⁻²⁰².

La mayoría de los estudios han investigado los biomarcadores de forma individual o en combinación con algunos otros biomarcadores de interés. Sin embargo, la evidencia hasta el momento es limitada sobre si la determinación de múltiples biomarcadores circulantes en sangre relacionados con las diferentes vías asociadas con el desarrollo de la DMT2 (por ejemplo, inflamación, disfunción endotelial), añaden un valor en la predicción de la DMT2 por encima de los predictores derivadas de los modelos de riesgo tradicionales sin incluir los biomarcadores.

Además, todavía queda por dilucidar el papel de muchos de ellos en la patogénesis de la RI, así como los factores implicados en su regulación. Ya que en algunos casos se postula que estos marcadores pueden ser causa y en otros casos consecuencia de los procesos implicados.

Por lo tanto, son necesarias más investigaciones para determinar un perfil de nuevos posibles biomarcadores candidatos que cubran diversos aspectos de la compleja fisiopatología de los procesos vinculados a la DMT2 y poder así determinar su aplicabilidad en la práctica clínica en la detección temprana del riesgo de DMT2.

A continuación se discuten tres nuevas proteínas relacionadas con el metabolismo de la glucosa y que actualmente están adquiriendo gran interés: el TWEAK, el receptor scavenger CD163 y la osteocalcina.

1.1.8. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

El TWEAK, del inglés “*Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*” es una citocina que pertenece a la superfamilia TNF, que activa al receptor Fn14 (*Fibroblast growth factor-inducible 14*). En humanos, el TWEAK es inicialmente sintetizado como una glicoproteína transmembrana de tipo II con 249 aminoácidos (aa), formada por un dominio C-terminal extracelular de 206 aa, que media la autotrimerización y la unión al receptor, un sitio de N-glicosilación, un dominio transmembrana de 25 aa, y un dominio N-terminal intracelular de 18 aa expuesto a la fosforilación por la PKC ^{203,204}.

Existen dos isoformas de TWEAK, una forma anclada a la membrana (mTWEAK) y otra forma soluble biológicamente activa (sTWEAK) formada tras el procesamiento proteolítico por la endoproteasa furina ²⁰⁴, dando como resultado una secuencia de 156 aa formada básicamente por la región C-terminal, responsable de la trimerización del ligando y la unión al receptor. Las células pueden co-expresar ambas isoformas del TWEAK, el de membrana y el soluble, pero el mecanismo exacto que regula las concentraciones de ambos todavía se desconoce.

Ambas isoformas presentan homología en el dominio C-terminal, son biológicamente activas y pueden unirse al único receptor funcionalmente conocido, el Fn14, y activar diversas cascadas de señalización asociadas a él ^{204,205}. Entre las rutas de señalización que puede ser activadas por el sTWEAK se incluyen a la ruta canónica y no-canónica del NF- κ B y las rutas de las MAPKs, especialmente, ERK, p38 y JNK ^{206,207}. Por ejemplo, la activación de las rutas de NF- κ B por el sTWEAK, promueven múltiples funciones biológicas y a menudo aparentemente opuestas, como puede ser la regulación de proliferación, diferenciación, angiogénesis, migración, supervivencia y, la apoptosis celular, así como la inducción de citocina pro-inflamatoria ^{208,209} (ver figura 5).

Actualmente, todavía queda por dilucidar el mecanismo mediante el cual la unión TWEAK-Fn14 puede producir efectos tan diferentes. Se ha propuesto que la acción específica del TWEAK en la activación diferencial de diversas rutas de señalización intracelular depende del contexto celular y tipo de tejido, así como de circunstancias fisiológicas o patológicas concretas.

Introducción

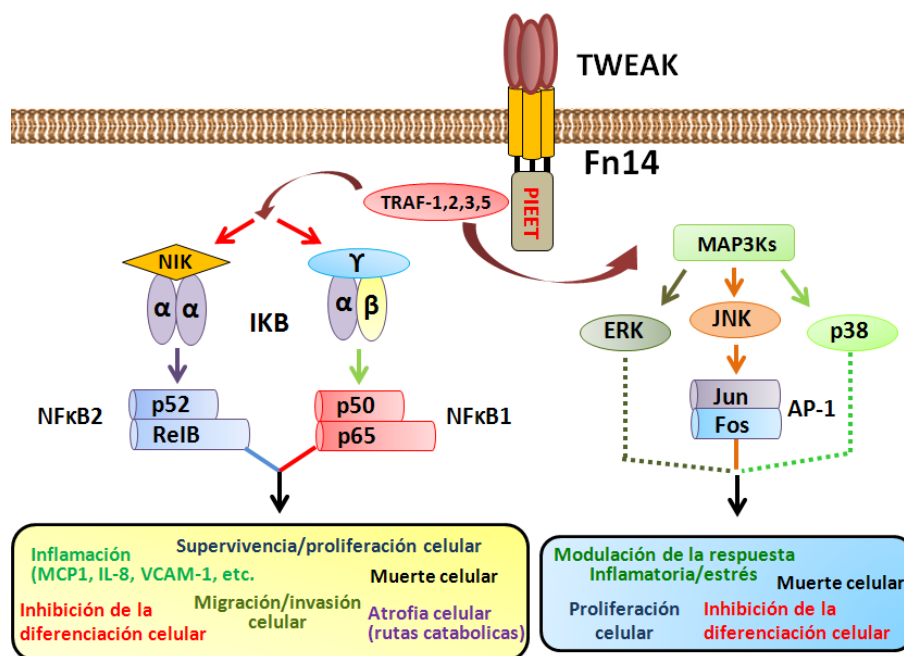


Figura 5. Efectos biológicos inducidos por el sistema TWEAK/Fn14 a través de las vías de señalización intracelulares de NF-κB y MAPK. Adaptado de: Burkly LC. 2011 ²¹⁰

Expresión de TWEAK

El TWEAK es una citocina que se expresa de manera abundante en numerosos tejidos y tipos celulares, sobre todo en células relacionadas con el sistema inmunitario, incluyendo macrófagos, leucocitos entre otras y en varias líneas celulares de origen tumoral y células endoteliales ^{203,204,211-213}.

Han sido descritas diversas situaciones en las que se ha visto una sobre-expresión de TWEAK. Esto ocurre por ejemplo, cuando se tratan monocitos primarios humanos con IFN-γ o acetato de forbol miristato ²¹⁴ o las células monocíticas THP-1 con lipopolisacárido (un potente inductor de la inflamación) ²¹⁵. Además, una sobre-expresión de éste, también se ha detectado localmente en varios tejidos inflamados en modelos animales experimentales y en tejidos humanos afectados

por enfermedades, incluyendo esclerosis múltiple ²¹⁶, artritis reumatoide ²¹⁷, lupus eritematoso sistémico ^{210,218} y aterosclerosis ²¹⁹⁻²²²

Receptor de TWEAK, Fn14

El TWEAK es una citocina multifuncional que ejerce todas sus funciones uniéndose a su receptor. A pesar de que recientemente se ha demostrado que el receptor *scanveger* CD163 puede actuar como receptor para TWEAK en situaciones patológicas ²²³, su único receptor funcionalmente conocido es el pertenece a la superfamilia de los TNFR, el Fn14 ²¹¹.

Al igual que el TWEAK, el Fn14 también se expresa en una gran variedad de tejidos y tipos de celulares ^{203,211,221,224}, y su expresión esta inducida por factores de crecimiento. La expresión del RNAm del Fn14, normalmente se encuentra reducida en los tejidos sanos. Sin embargo, se ha visto una sobre-expresión de este en diferentes condiciones experimentales de estrés oxidativo y/o ambiente inflamatorio ²¹⁰, así como en tejidos lesionados o afectados por diferentes enfermedades tanto en modelos animales como humanos ^{215-217,219,222,225,226}. Por tanto podemos especular que la activación de la vía de TWEAK/Fn14 es altamente controlada por la expresión inducida del receptor del TWEAK.

1.1.8.1. TWEAK y resistencia a la insulina en la obesidad

La obesidad, como ya se ha comentado, está asociada a una inflamación crónica de bajo grado implicada en el desarrollo de aterosclerosis, resistencia a la insulina y la DMT2 ¹⁴⁷.

Recientemente se le ha dado especial interés al TWEAK, debido a su posible papel regulador del equilibrio entre la respuesta pro-inflamatoria/anti-inflamatoria, la cual tiene lugar en un estado de RI asociado a la obesidad y complicaciones asociadas.

Introducción

En un contexto de obesidad, el TWEAK y el TNF- α coexisten en el tejido adiposo y aunque, en principio, ambas citocinas tendrían potencial inflamatorio ²²⁷, el TNF- α parece ser una citocina pro-inflamatoria con un efecto más potente que el TWEAK ²⁰⁵. De hecho, en células de tejido adiposo se ha descrito que el sTWEAK inhibe los efectos pro-inflamatorios del TNF- α por inhibición de la secreción de citocinas pro-inflamatorias inducidas por éste como son la IL-6 y la IL-8 ²²⁸. Estudios *in vitro* han mostrado que el sTWEAK induce la RI en células hepáticas ²⁰⁷. No obstante, recientemente, en tejido adiposo de humanos se ha visto que el sTWEAK inhibe la RI inducida por TNF- α a través de un mecanismo dependiente de PP2A, del inglés "*Protein Phosphatase 2A*" ²²⁹.

Consistente con estos hallazgos, y al contrario de lo que ocurría con el TNF- α , se ha descrito que los niveles circulantes de sTWEAK están reducidos en pacientes con obesidad severa en comparación al grupo control. Asimismo, cuando estos pacientes fueron sometidos a una cirugía bariátrica, los niveles de sTWEAK incrementaron tras la pérdida de peso corporal ²²⁸. En pacientes con DMT1, los niveles del sTWEAK se han relacionado inversamente con la presión arterial sistólica e índices de obesidad central ²³⁰, así como con parámetros clínicos relacionados con homeostasis de la glucosa tal como los niveles de la GPA, HbA1c y con la RI (evaluada por el índice HOMA-IR) en pacientes con DMT2 y con enfermedad renal crónica ²³¹. A su vez, las concentraciones circulantes de sTWEAK también se encuentra reducidas en individuos hipertensos ²³², pacientes con DMT1 ²³⁰, en mujeres con diabetes gestacional ²³³, así como en otras condiciones patológicas de riesgo cardiovascular ²³⁴⁻²³⁹.

Hasta la fecha, no se conocen ni el significado ni el mecanismo mediante el cual los niveles de sTWEAK están reducidos en las patologías asociadas con un perfil pro-aterosclerótico. De igual manera que, aunque al sTWEAK se le ha relacionado con el metabolismo de la glucosa, no existen estudios implicando al sTWEAK como un posible potencial marcador temprano del desarrollo de DMT2, así que en base a todo lo mencionado anteriormente sería interesante estudiar esta relación.

1.1.9. Receptor scavenger CD163

El CD163 es una glicoproteína transmembrana que pertenece a la familia de receptores con dominios *scavenger* ricos en cisteínas (SRCR, del inglés *scavenger receptor cysteine-rich*), y consta de 9 dominios SRCR extracelulares seguidos de una secuencia de 23 aa que constituyen la región transmembrana, y por una cola intracitoplásmica de 49 aa ^{240,241}.

El CD163 es un receptor asociado a un fenotipo fagocítico, cuya función mejor caracterizada es mediar la endocitosis de complejos hemoglobina:haptoglobina (Hp-Hb), protegiendo así a los tejidos del daño oxidativo y la inflamación.

Estudios recientes han revelado que CD163 puede actuar como receptor "señuelo" para TWEAK en situaciones patológicas o servir como un receptor alternativo en células que carecen de Fn14 ²²³. La interacción de CD163 con TWEAK conduce a la neutralización de ambas moléculas, y aunque aún se desconoce, se ha sugerido dicha interacción como un posible mecanismo regulador de procesos inflamatorios.

Además del CD163 de membrana, una forma soluble de CD163 (sCD163) está presente en suero y otros fluidos tisulares, tras la acción catalítica mediada por la metaloproteinasa ADAM17 (en inglés, a disintegrin and metalloproteinase) ²⁴⁰ anclada en la superficie a la membrana plasmática, la cual puede ser inducida por la activación de los receptores TLR (*toll-like receptors*) por LPS o PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), FcγR (receptores Fc-gamma) y el estrés oxidativo ^{241,242}.

Cabe destacar, que ADAM17 media también la liberación de la forma activa del TNF-α mediante estímulos pro-inflamatorios a través de la vía del TLR, de ahí que ADAM17 también se conoce como ADAM17/TACE (enzima convertidora de TNF-α) ²⁴³ (ver Figura 6).

Tanto en estudios *in vitro* como en *in vivo*, se ha mostrado que la liberación del CD163 de la membrana plasmática, responde paralelamente con la liberación del TNF-α a estímulos pro-inflamatorios mediados por LPS. Dichos estímulos producen un fuerte aumento de los niveles

Introducción

circulantes de ambas moléculas. Sin embargo, la vida media del receptor sCD163 en la circulación es mucho más larga en comparación con la de TNF- α . Permaneciendo los niveles de sCD163 elevados durante 1-2 días.

Es probable que el aumento de los niveles circulantes del sCD163 detectados en condiciones inflamatorias sean el resultado de la liberación concomitante de CD163 y TNF- α de los macrófagos por ADAM17/TACE. De ahí que, varios autores han sugerido que el receptor sCD163 pueda ser utilizado como un marcador de larga duración en circulación y fácil de medir, en sustitución a los niveles circulantes del TNF- α ²⁴¹.

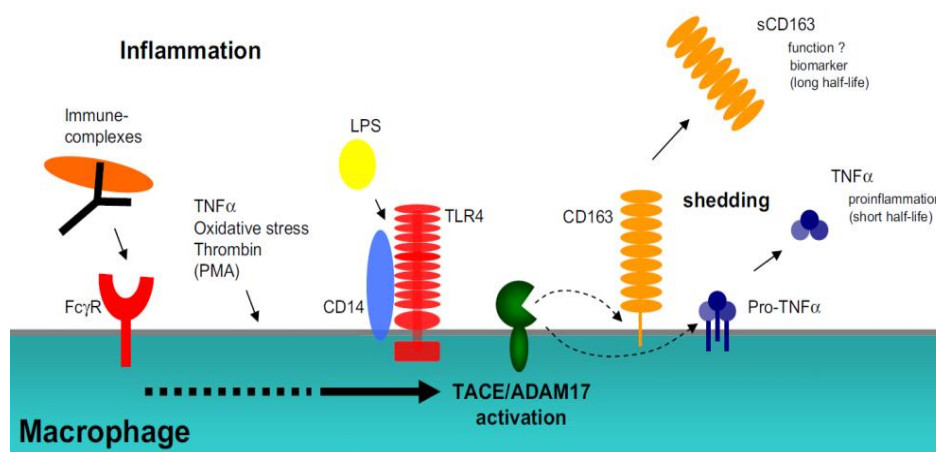


Figura 6. Liberación de CD163 y TNF- α en macrófagos por acción de ADAM17/TACE inducida por activación de TLR en inflamación. Fuente: Møller HJ. 2012 ²⁴¹

Expresión del receptor scavenger CD163

El CD163 se expresa casi exclusivamente en la superficie de los monocitos (donde su expresión es baja) y altamente en los macrófagos ^{244,245}. En estudio *in vitro*, se ha observado un aumento en

la expresión de RNAm de CD163 por acción de los glucocorticoides, la IL-6 y la citocina anti-inflamatoria IL-10. Por el contrario, mediadores pro-inflamatorios como LPS, IFN- γ (interferón-gamma) y TNF- α suprimen su expresión ²⁴⁴. Esta respuesta diferencial a los mediadores pro-y anti-inflamatorios sugiere que el CD163 es más altamente expresado por el fenotipo de macrófagos M2 o “activados alternativamente”. Aunque el papel que juega el CD163 está por dilucidar, este patrón de expresión en células M2 implica un papel funcional de CD163 en la respuesta antiinflamatoria.

En este contexto, se ha visto que la expresión del RNAm del CD163, así como los niveles circulantes del sCD163 están elevados en muchas enfermedades inflamatorias vinculadas con la activación de los macrófagos ²⁴⁶, incluyendo aquellas condiciones que cursa con una inflamación de bajo grado asociada a la obesidad o DMT2 ²⁴⁷⁻²⁵⁰. De hecho, se ha observado una sobre-expresión de RNAm de CD163 en macrófagos infiltrados en el tejido adiposo, y que los niveles de expresión de CD163, se asocian positivamente con los niveles circulantes de sCD163 ^{247,251,252}.

Por lo tanto, todos estos hallazgos han sugerido al CD163 como un marcador de inflamación derivado de macrófagos que refleja la activación de éstos ^{244,246,253}.

1.1.9.1. CD163 y resistencia a la insulina en la obesidad

Recientemente varios autores ha descrito al sCD163 como posible causante de la resistencia a la insulina. Existen numerosos estudios transversales, que han encontrado un incremento de los niveles circulantes del sCD163 en sujetos con sobrepeso y/u obesidad ^{247-249,254,255}, en pacientes con DMT1 ²⁵⁶ y DMT2 ^{257,258}, así como en mujeres con diabetes gestacional ²⁵⁹. Asimismo, en lo que respecta a la RI, los niveles circulantes de sCD163 se han asociado positivamente con parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa que incluyen la glucemia plasmática, insulina y RI evaluada mediante el índice HOMA-IR ^{249,255,260,261} y el método *clamp* hiperinsulinémico-euglucémico ²⁴⁷. Esta asociación ha sido evidenciada tanto en individuos con

Introducción

normopeso como obesos sanos ^{247,249,255}, así como en individuos con tolerancia normal a la glucosa y con DMT2 ²⁶⁰.

A pesar de la clara asociación entre CD163 y la RI, los mecanismos que vinculan esta relación siguen estando sin determinar. Asimismo, tampoco se puede establecer una relación causal, que es una limitación inherente de los estudios transversales.

Hasta la actualidad, solamente existe un estudio de cohortes prospectivo realizado en población general Danesa, el Copenhagen City Heart Study²⁵⁰, donde Møller y colaboradores, encontraron que un aumento de los niveles séricos de sCD163 al inicio del estudio, se asociaron con el riesgo de incidencia de DMT2, sugiriendo al sCD163 como un marcador predictor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad.

La limitación más importante de este estudio fue la falta de las determinaciones de las concentraciones de glucosa en ayunas al inicio del estudio. Al ser la glucosa un fuerte predictor de diabetes, podría enmascarar el efecto de asociación observado entre el sCD163 y el riesgo de DMT2. Otras limitaciones fueron, el diagnóstico de los nuevos casos de diabetes, el cual fue hecho a partir de información obtenida de registros nacionales Daneses, lo que podría falsear los resultados, y la falta de análisis estadísticos ajustando los modelos por potenciales factores de confusión como circunferencia de la cintura, perfil lipídico, toma de medicación entre otros.

Por lo tanto, es prematuro concluir que el sCD163, puede ser considerado un potencial biomarcador de riesgo de diabetes, siendo necesarios más estudios prospectivos teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado para poder concluir que hay un efecto causal del sCD163 en el desarrollo de DMT2.

1.1.10. Osteocalcina

La osteocalcina (OC), también conocida como proteína ósea Gla o BGP (*Bone Gla Proteín*) es la molécula proteica no colágena más abundante de la matriz ósea, que se comporta también como una hormona ²⁶².

La OC es secretada por los osteoblastos durante la fase de mineralización de la osteogénesis. En humanos, el gen de la OC se localiza en el cromosoma 1q.25-q31 de donde se produce la proteína de 49 aa que es específica de hueso y de dentina, la OC. La síntesis de la OC depende tanto de la vitamina D como de la vitamina K. La vitamina D, 1,25-dihidroxi-vitamina D (1,25(OH)2D) induce directamente su síntesis a través de una regulación transcripcional mediante el receptor nuclear de vitamina D. La vitamina K es un cofactor esencial para la enzima glutamato carboxilasa que se requiere para la gamma carboxilación post-traducciona de los tres residuos de ácido glutámico en las posiciones 17, 21 y 24. Esta gamma carboxilación es esencial para que la proteína tenga alta afinidad por los minerales y permita atraer iones de Ca²⁺ e incorporarlos a los cristales de hidroxiapatita que forman el 70% de los huesos.

Cuando la molécula de OC está carboxilada se conoce como OC carboxilada (OCc), y es la forma de OC que se encuentra en la matriz ósea ²⁶³. Sin embargo, una fracción de la OC sintetizada, no se incorpora al hueso por presentar menos de 3 residuos carboxilados. A ésta se la conoce como OC no carboxilada (OCnc). Aunque, las dos formas de OC se encuentran en el hueso y en la circulación, hay un alta proporción de OCnc que se encuentra en la circulación ejerciendo efectos endocrino-metabólicos sobre el metabolismo energético y de la glucosa, actuando principalmente a nivel del tejido adiposo y las células β pancreáticas (ver figura 7) ²⁶⁴⁻²⁶⁶.

La carboxilación o la ausencia de ésta, hace a la OC más susceptible para su liberación desde los osteoblastos a la circulación. Un importante regulador de los niveles de carboxilación de la OC, por mecanismos todavía no determinados, es la proteína tirosina fosfatasa osteotesticular OST-PTP (proteína producto del gen Esp), que se expresa predominantemente en los osteoblastos y en las células de Sertoli del testículo.

Introducción

Se ha identificado que los ratones knockout para Esp (Esp^{-/-}) tienen niveles elevados de OCnc en suero, una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina, y secretan más insulina en respuesta a la glucosa ²⁶³. Además, estos animales están protegidos de la obesidad inducida por la dieta y la intolerancia a la glucosa ²⁶⁴. Curiosamente, se ha visto que el ratón (Esp^{-/-}) y el ratón tratado con OCnc muestran un fenotipo opuesto al modelo (OC^{-/-}), mientras que, la sobreexpresión de OST-PTP origina un fenotipo idéntico al ratón (OC^{-/-}) ²⁶³.

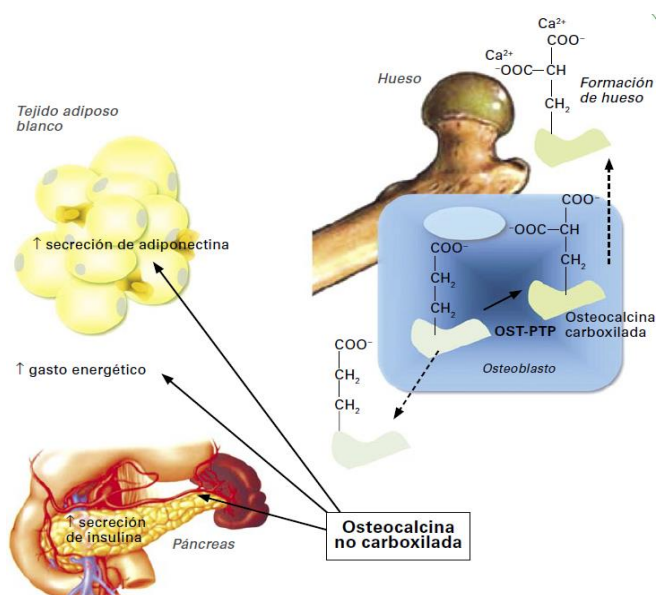


Figura 7. Función endocrina de osteocalcina derivada de los osteoblastos. Fuente: Bonet M.L, Ribot J, Palou A. 2009 ²⁶⁷.

1.1.10.1. Osteocalcina: un nexo de unión entre hueso y metabolismo de la glucosa

La observación de que un ratón knockout para OC (OC^{-/-}), que presentaba un fenotipo con masa ósea elevada y una cantidad anormal de grasa visceral, construyó la primera evidencia de que el

esqueleto podía regular el metabolismo energético ^{265,268}. Posteriormente, Lee y colaboradores ²⁶⁴ en diferentes estudios genéticos y moleculares realizados en ratones, observaron que el ratón (OC-/-) presentaba niveles altos de glucosa y niveles bajos de insulina en comparación con el ratón wild-type, y mostraba un descenso en la proliferación de las células β y un aumento de la masa grasa ²⁶⁴. Por el contrario, en ratones wild-type, estas alteraciones metabólicas se invirtieron mediante la administración exógena de OCnc recombinante ^{269,270}.

Los estudios experimentales *in vitro* realizados en islotes aislados y en adipocitos primarios, han confirmado que la OC ejerce un papel de intermediario en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Ésta, aumenta la secreción y la sensibilidad a la insulina, a través de un aumento de la secreción de adiponectina en los adipocitos, estimula la proliferación de las células β en el páncreas, al mismo tiempo que incrementa el gasto energético y la reducción de la masa grasa. Estos hallazgos también han revelado que la forma de OCc es inactiva y que la OCnc es la forma activa ²⁶⁴. Sin embargo, a pesar que estos resultados demuestran una relación consistentemente entre la OC y la homeostasis de la glucosa, hasta el momento los mecanismos no están claramente determinados.

Se ha sugerido que la regulación del metabolismo de la glucosa y de la RI por la OC ocurre a través de la interacción de ésta con el receptor GPRC6A, un receptor transmembrana acoplado a proteína G, que se expresa en una variedad de tejidos incluyendo hígado, músculo esquelético, cerebro, testículos, hueso y células β pancreáticas ²⁶³. Así, se ha demostrado que la OC estimula la secreción de insulina y promueve la proliferación de células β directamente a través de la vía de señalización MAPK/ERK ^{264,271-273}, e indirectamente promoviendo la secreción de GLP-1 (en inglés, Glucagon-Like Peptide -1) en el intestino, una incretina endógena que potencia la secreción de insulina dependiente de la glucosa en las células β pancreáticas ²⁷⁴.

Una pregunta crítica al respecto, es si los hallazgos relacionando la OC con el metabolismo de la glucosa observados en ratones son extensibles a otros animales y particularmente a los seres humanos.

Introducción

Los datos disponibles de estudios en humanos, parecen confirmar que existe una interacción entre el OC y la secreción y sensibilidad de insulina. A este respecto, varios estudios transversales han descrito una asociación inversa entre las concentraciones séricas de OC y los niveles de HbA1c, glucemia basal en ayunas e insulina, así como con la RI evaluada mediante el índice HOMA-IR ²⁷⁵⁻²⁸⁴. Estos resultados son consistente con otros estudios transversales mostrando una reducción de las concentraciones séricas de OC en individuos con obesidad ^{275,276,284,285}, con SM ^{275,286-289} y con DMT2 ^{281,285,290,291}.

De acuerdo con estas observaciones, en un estudio poblacional longitudinal previo de nuestro grupo, realizado en hombres de edad avanzada con alto riesgo cardiovascular, se observó que los cambios en los niveles séricos de OCc y OCnc se asociaron con una mejoría en la secreción y la sensibilidad de la insulina ²⁹². De la misma manera, las concentraciones séricas de OCc al inicio del estudio se asociaron de forma inversa a cambios en los niveles de HOMA-IR en población adulta ²⁹³. Estos hallazgos sugieren que la OC puede tener un papel determinante en el desarrollo de DMT2.

La mayoría de los estudios en humanos han sido realizados con un diseño transversal, imposibilitando la inferencia de una relación causal entre OC y DMT2. En el mejor de nuestros conocimientos, hasta la fecha sólo 2 estudios ^{294,295} han evaluado el papel de la OC como posible marcador de incidencia de DMT2 en adultos Asiáticos sanos, siendo los resultados de estos estudios contradictorios. Son necesarios más estudios prospectivos teniendo en cuenta potenciales factores confusores para concluir que hay un efecto causal de la OC sobre el desarrollo de DMT2.

2. JUSTIFICACIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

2. JUSTIFICACIÓN

El incremento acelerado de la prevalencia de DMT2, se ha convertido sin duda en uno de los problemas de salud más graves del siglo XXI. La obesidad, es uno de los principales factores de riesgo para la DMT2, ya que ésta, se asocia a un estado de inflamación crónica de bajo grado que cursa con un aumento de la producción de moléculas pro-inflamatorias implicadas en el desarrollo de aterosclerosis y resistencia a la insulina.

En resumen, son varios los estudios intentado delimitar o que han sugiriendo una gama de marcadores circulantes en sangre, que podrían estar etiológicamente relacionados con el desarrollo de la DMT2. Estos últimos años, diferentes grupos de investigación han mostrado especial interés por el sTWEAK y su receptor *scavenger* CD163.

El sTWEAK, es una citocina implicada en múltiples funciones biológicas, que es capaz ejercer un papel regulador entre la respuesta pro-/anti-inflamatoria, la cual tienen lugar en un estado de RI asociado a la obesidad. Existen numerosos estudios trasversales describiendo una asociación inversa entre las concentraciones circulantes del sTWEAK y parámetros relacionados con la homeostasis de la glucosa. También, se han encontrado unas concentraciones séricas disminuidas del sTWEAK en sujetos obesos, así como en pacientes diabéticos. Sin embargo, no existen estudios prospectivos implicando al sTWEAK en el desarrollo de la DMT2.

Por otro lado tenemos el receptor *scavenger* sCD163, el cual puede actuar como receptor para sTWEAK en situaciones patológicas. Al contrario a lo observado con el sTWEAK, las concentraciones séricas de sCD163 se encuentran incrementadas en personas obesas y diabéticas. Aunque, todavía queda por dilucidar los mecanismos, el sCD163 se ha propuesto como un marcador importante de RI. Sin embargo, solamente un estudio prospectivo ha evaluado la asociación entre sCD163 y el riesgo de diabetes, sugiriendo al sCD163 como un posible marcador predictor de riesgo para la incidencia de DMT2, a pesar de sus potenciales limitaciones.

Justificación

Otra molécula a la que recientemente también se le está dando especial interés es a la OC, un componente de la matriz ósea derivada de los osteoblastos. Los datos obtenidos en modelos animales así como en humanos, son concordantes en sugerir que existe una relación entre la OC y la secreción y sensibilidad de insulina. Sin embargo, solamente existen dos estudios prospectivos evaluando el papel de la OC como posible marcador predictor de DMT2, y han mostrado resultados contradictorios.

Así pues, y ante la evidencia expuesta, con esta tesis se ha pretendido estudiar la asociación existente entre estos tres nuevos posibles potenciales biomarcadores, sTWEAK, receptor *scavenger* sCD163 y OC, y el desarrollo de DMT2 en una población adulta de alto riesgo cardiovascular procedente del ensayo de campo PREDIMED. Asimismo, se ha querido explorar la relación entre el sTWEAK y prevalencia de SM, una condición clínica asociada a la obesidad, donde la RI es una condición metabólica central de su etiopatogenia, junto con dislipidemia aterógena, hipertensión arterial e inflamación crónica, que se relaciona con un incremento del riesgo de DMT2 y de enfermedad cardiovascular.

3. HIPÓTESIS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

3. HIPÓTESIS

Para esta Tesis Doctoral han sido planteadas las siguientes hipótesis:

En un grupo de individuos de ambos sexos, edad avanzada, asintomáticos, con alto riesgo de enfermedad cardiovascular y sin diagnóstico de diabetes al inicio del estudio:

Unas concentraciones séricas circulantes reducidas de sTWEAK, y concentraciones séricas del receptor *scanveger* sCD163 aumentadas, se relacionan con una alteración de parámetros del metabolismo de la glucosa tal como la glucemia basal en ayunas, la insulinemia y la resistencia a la insulina, asociándose a un mayor riesgo de incidencia de DMT2.

Unas concentraciones séricas circulantes reducidas de sTWEAK se asocian con un mayor riesgo de prevalencia de síndrome metabólico y de sus componentes, los cuales son factores de riesgo para el desarrollo de la DMT2.

Las concentraciones séricas circulantes de osteocalcina se relacionan con una alteración de la homeostasis de la glucosa y se asocian inversamente con un mayor riesgo de desarrollar DMT2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

4. OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

4. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue determinar si las concentraciones séricas circulantes de nuevos posible potenciales biomarcadores, sTWEAK, receptor *scavenger* sCD163 y osteocalcina, todos ellos relacionados con la homeostasis de la glucosa y el metabolismo lipídico, están asociados con el desarrollo de DMT2 en una población adulta con alto riesgo cardiovascular procedente del ensayo de campo PREDIMED.

Los objetivos específicos que nos hemos propuesto para ello han sido:

Analizar la relación entre las concentraciones séricas circulantes de sTWEAK y receptor *scanveger* sCD163 y parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa, así como la asociación entre los niveles periféricos de estas moléculas y la incidencia de DMT2.

Evaluar la asociación entre las concentraciones séricas circulantes de sTWEAK y el riesgo de prevalencia de síndrome metabólico y sus componentes.

Analizar la relación entre las concentraciones séricas circulantes de osteocalcina carboxilada y osteocalcina no carboxilada y diferentes parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa, así como su asociación con la incidencia de DMT2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

5. MATERIAL Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

5. MATERIAL Y MÉTODOS

La presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el contexto del estudio PREDIMED (“PREvención con Dieta MEDiterránea”).

En esta sección se describen en primer lugar, el diseño del estudio PREDIMED, características de los participantes, la intervención, la recopilación de variables a través de cuestionarios y datos antropométricos, y la obtención y determinación de parámetros bioquímicos. Posteriormente se definen las variables principales de interés, así como la población incluida en los estudios que forman parte de esta Tesis.

Estudio PREDIMED

El estudio PREDIMED es un ensayo de campo nutricional aleatorizado, en paralelo, controlado y multicéntrico realizado en España, cuyo objetivo principal fue evaluar el efecto de la dieta Mediterránea en la prevención primaria de la ECV. Los resultados de las variables primarias fueron publicados en 2013 en la revista *“The New England Journal of Medicine”*, demostrándose que aquellos participantes aleatorizados a una dieta Mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen o frutos secos tuvieron un 30% menor riesgo de desarrollar ECV (la combinación de infarto de miocardio no mortal, accidente vascular cerebral no mortal y muerte cardiovascular) en comparación a aquellos a los que se les recomendó seguir una dieta control, baja en grasa.

Como objetivos secundarios del ensayo PREDIMED, se planteó valorar el efecto de la dieta Mediterránea sobre la incidencia de diferentes otros eventos: infarto de miocardio, accidente vascular cerebral, muerte por enfermedad cardiovascular, muerte por cáncer otras causas, muerte por todas las causas, DMT2 (siendo ésta una de las variables de esta Tesis Doctoral); demencia y otras enfermedades neurodegenerativas; y cáncer y tipos de cáncer específicos en las principales localizaciones (mama, colo-rectal, próstata, pulmón, estómago). Además también se valoraron otras variables intermedias, tal como los cambios en: perfil lipídico, tensión

Material y métodos

arterial, marcadores de inflamación y otros marcadores intermedios de riesgo cardiovascular para entender mejor cómo los cambios en la dieta pueden modificar el riesgo de eventos clínicos.

El protocolo, diseño, objetivos y metodología del ensayo PREDIMED han sido descritos con detalle anteriormente ⁹⁴ y está disponible en <http://www.predimed.es>. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética de investigación del Hospital Clínic de Barcelona y del resto de centros implicados. Este protocolo fue redactado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue registrado en el Registro de ensayos clínicos de Londres (<http://www.controlled-trials.com/ISRCTN35739639>).

Reclutamiento, selección y aleatorización de los participantes del estudio *PREDIMED*

El reclutamiento de participantes (entre octubre del 2003 y julio de 2009) se llevó a cabo en los Centros de Atención Primaria (CAP) afiliados a diferentes nodos o Centros Reclutadores de España.

Los participantes elegibles para el ensayo PREDIMED fueron hombres de 55-80 años y mujeres de 60-80 años de edad, sin ECV previa (cardiopatía isquémica —angina de pecho o infarto de miocardio reciente o antiguo—, accidente vascular cerebral, vasculopatía periférica) y que presentaran además alguna de las dos siguientes condiciones:

- a) DMT2 (paciente tratado con insulina/hipoglucemiantes orales; o glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dl (en ayunas se define como la no ingesta calórica al menos durante 8 horas); o glucemia ≥ 200 mg/dl en dos mediciones después de 2 horas de la PTOG; o bien glucemia esporádica ≥ 200 mg/dl con poliuria, polidipsia, o pérdida de peso inexplicable.
- b) Tres o más de los siguientes factores de riesgo cardiovascular:
 - Fumador activo (al menos 1 cigarrillo/día durante el último mes).

- Hipertensión (presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg o tensión arterial diastólica ≥ 90 mmHg o toma de medicación antihipertensiva).
- Colesterol LDL ≥ 160 mg/dl o toma de medicación hipolipemiente.
- Colesterol HDL ≤ 40 mg/dl en hombres o ≤ 40 mg/dl en mujeres.
- Índice de masa corporal ≥ 25 kg/m².
- Antecedentes familiares de primer grado de enfermedad coronaria precoz (infarto de miocardio, angina de pecho o muerte súbita antes de los 55 años en varones y 65 en mujeres).

Se excluyeron del estudio a todos los participantes que no cumplieran con los requisitos del protocolo o que presentaban alguno de los siguientes criterios:

- Historia documentada de ECV previa, incluyendo enfermedad coronaria (angina de pecho, infarto de miocardio, procedimientos de revascularización coronaria o la existencia de ondas Q anormales en el electrocardiograma (ECG)), ictus, y enfermedad arterial periférica sintomática.
- Condición médica severa que pudiera impedir al sujeto a participar en un estudio de intervención nutricional (enfermedad digestiva grave, alteraciones endocrinas distintas de la diabetes, alteraciones psiquiátricas, enfermedad maligna avanzada).
- Cualquier otra condición médica que limitara la esperanza de vida a menos de un año.
- Inmunodeficiencia o estado VIH positivo.
- Adicción a drogas ilegales o consumo problemático de alcohol o síndrome de dependencia alcohólica (o ingesta total diaria de alcohol > 80 g).
- Índice de masa corporal > 40 kg/m².
- Enfermedad crónica grave.
- Dificultad para asistir a las visitas programadas y baja probabilidad predicha de cambiar los hábitos alimentarios de acuerdo a los estadios de Prochaska y DiClemente del modelo de estadios de cambio ²⁹⁶.

Material y métodos

- Antecedentes de hipersensibilidad o reacciones alérgicas al aceite de oliva o a los frutos secos.
- Analfabetismo.
- Participación en ensayos clínicos con fármacos o toma de cualquier fármaco en investigación durante el último año.
- Pacientes ingresados en instituciones por alguna enfermedad crónica, sin autonomía, incapacidad de andar, imposibilidad de acudir a las reuniones trimestrales.

Los potenciales candidatos fueron seleccionados por los facultativos asociados a los CAP, que mediante la revisión de la historia clínica aseguraban del cumplimiento de los criterios de elegibilidad. Tras el consentimiento de dichos participantes, los facultativos facilitaban los teléfonos de contacto a los investigadores, y tras una breve entrevista telefónica y si estaban interesados, se les invitaba a asistir a su propio CAP para realizar una visita cara a cara (visita de cribado).

La visita de cribado de 30 minutos aproximadamente de duración, permitía verificar si la persona realmente cumplía los criterios de inclusión. En esta visita se cumplimentaba el cuestionario de inclusión y de exclusión (**Anexo 1**). Si la persona cumplía los requisitos para participar y en caso de aceptar, firmaban los consentimientos informados, para la participación en el ensayo. Si el participante cumplía con los criterios en la misma visita o como máximo a la semana, una vez realizada la analítica y comprobado los criterios de inclusión se le indicaba que acudiera a la siguiente visita en ayunas para realizar la visita basal la cual consistía en la realización del cuestionario general (**Anexo 2**) de 26 puntos sobre condiciones médicas y factores de riesgo relacionados con la elegibilidad; se revisaba el último ECG disponible en la historia clínica o en su defecto se realizaba uno de nuevo; se realizaba al potencial participante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos de 137 puntos (**Anexo 3**) y el cuestionario de actividad física en tiempo libre de Minnesota (**Anexo 4**). Posteriormente, los participantes fueron asignados al azar en una proporción 1:1:1 a cada uno de los tres grupos de intervención del que constaba el ensayo PREDIMED. La aleatorización al grupo de intervención se realizó de forma centralizada mediante una secuencia numérica aleatoria generada por

ordenador y estratificada en bloques de 50 personas por nodo reclutador, sexo y grupo de edad (<70 o ≥70 años).

También, se les proporcionó a los participantes una explicación escrita y detallada del estudio. Asimismo se les informó que su retirada del estudio no suponía perjuicio alguno y que los investigadores también podían retirar a un sujeto del estudio si era necesario por cualquier motivo tal como reacciones adversas o incumplimiento del protocolo.

Intervención

Durante el periodo de reclutamiento, un total de 8.713 candidatos fueron seleccionados para la elegibilidad, y de estos, 7.447 fueron asignados aleatoriamente a una de las tres intervenciones:

- Una dieta tipo Mediterránea enriquecida con aceite de oliva virgen extra.
- Una dieta tipo Mediterránea suplementada con frutos secos.
- Recomendaciones para seguir una dieta baja en grasa (grupo control).

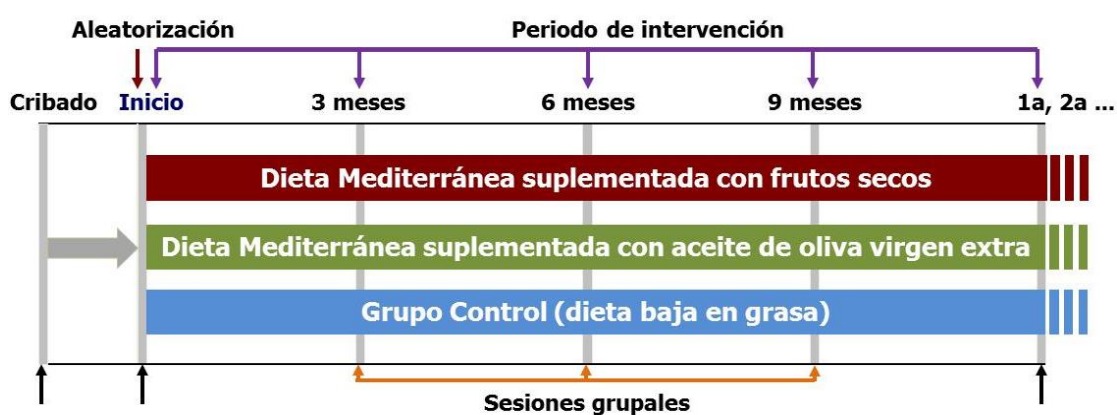


Figure 8. Diseño del estudio *PREDIMED*.

Material y métodos

Grupos de intervención con dieta mediterránea

El principal objetivo fue promover el consumo de un patrón de dietético Mediterráneo en los dos grupos de intervención, sin realizar ninguna restricción energética ni promover la práctica de actividad física. Los dietistas-nutricionistas en cada uno de los centros del estudio PREDIMED fueron los responsables directos de la intervención dietética. En todas las visitas de seguimiento las dietistas daban recomendaciones personalizadas sobre los cambios que debía realizar cada participante para conseguir cumplir con los objetivos de cada intervención

Los participantes incluidos en ambos grupos (dieta Mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra o frutos secos), recibieron una educación intensiva centrada en recomendaciones específicas para estimular el consumo y la frecuencia estipulada de los alimentos típicos de la dieta Mediterránea. Dicha recomendaciones se basaban principalmente en: utilizar del aceite de oliva virgen extra como única fuente de grasa para cocinar y aliñar todos los platos y alimentos; consumir semanalmente frutos secos y semillas (al menos 3 veces/semana); aumentar la ingesta de verduras (2 o más raciones verdura u hortalizas al día), frutas (3 o más porciones al día), legumbres (al menos 3 veces por semana) y pescados o mariscos (al menos 3 veces por semana); consumir carnes blancas (aves sin piel/conejo) en lugar de carnes rojas o procesadas; mantener una ingesta moderada de vino y siendo su consumo principalmente en las comidas; evitar la ingesta de dulces, azúcares, mantequilla, alimentos precocinados y comida rápida; y utilizar el típico sofrito (ajo, cebolla o puerro y tomate) para condimentar los diferentes platos. En ningún caso se limitó la ingesta total de grasa, sino que se dejó *ad libitum*, siempre y cuando ésta fuese procedente del pescado o de origen vegetal, principalmente del aceite de oliva y de los frutos secos.

Para valorar el grado de adscripción de los participantes que seguían un patrón de dieta Mediterráneo, las dietistas utilizaban un cuestionario de 14 puntos (**Anexo 5**). La puntuación obtenida ayudaba a las dietistas a centrar sus objetivos en mejorar de forma individualizada aquellos puntos donde veían que los participantes se desviaban más de las recomendaciones, consiguiendo así aumentar su puntuación total.

Grupo control

A los participantes asignados a este grupo, la intervención nutricional estaba principalmente basada en consejos dietéticos para seguir una dieta baja en grasa según las recomendaciones tradicionales del Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).

Las recomendaciones se centraban especialmente en la reducción de la ingesta de grasa total, tanto de origen animal como vegetal. Esto incluía: utilizar la cantidad mínima de aceite (no más de 2 cucharadas al día) para cocinar o aliñar los alimentos; retirar todo la grasa visible de los alimentos, así como desgrasar los caldos y platos antes de su consumo; evitar el uso de sofrito; en el caso de consumir carne roja optar por las piezas más magras; evitar el consumo de carnes grasas, vísceras, así como derivados cárnicos (salchichas, hamburguesas o carnes picadas comerciales y embutidos); evitar el consumo de mantequilla, margarina, manteca, mahonesas, helados cremosos o nata; promover el consumo de alimentos desnatados o bajos en grasa (leche, yogures desnatados y quesos); consumir solo pescados blancos y marisco; evitar consumir productos enlatados, bollería, alimentos vegetales grasos tal como los frutos secos (nueces, almendras, avellanas, piñones, maíz tostado, pipas de girasol o cacahuetes), y patatas chips u otros aperitivos fritos.

En este grupo, el grado de adherencia a la dieta baja en grasa fue valorado mediante un cuestionario de 9 puntos (**Anexo 6**), cuyo objetivo por parte de las dietistas era conseguir la mayor puntuación.

Sesiones grupales

Durante todo el periodo de duración del estudio, los participantes (independientemente del grupo asignado) recibieron sesiones grupales trimestrales, para reforzar y motivar el

Material y métodos

mantenimiento de las pautas dietéticas indicadas, y así conseguir cumplir con los objetivos de cada intervención. Estas sesiones grupales tenían una 1 hora de duración con un máximo de 20 participantes, y se realizaban separadas por grupos de intervención.

En cada sesión se revisaba la adherencia a la dieta haciendo uso de los cuestionarios de 14 puntos (en los dos grupos de dieta Mediterránea) y de 9 puntos (grupo control), se impartían charlas informativas y se entregaba a los participantes material escrito con descripciones de los alimentos típicos Mediterráneos, listas de la compra, planes de comidas y recetas de cocina. Además, a los participantes de los dos grupos de dieta Mediterránea, se les entregaba aceite de oliva virgen extra (15 L, 1 litro/semana, para el participante y la familia) o frutos secos (1.350 g, 30 g/día: 15 g de nueces, 7,5 g de avellanas y 7,5 g de almendras, para el participante) de forma gratuita. Los participantes asignados al grupo control recibieron artículos o incentivos no alimentarios durante todo el estudio para aumentar su adscripción a la intervención.

Asimismo, los participantes durante todo el periodo de duración del estudio tuvieron la posibilidad de contactar vía telefónica para la resolución de dudas en relación al seguimiento e intervención.

Recopilación de datos

Los participantes del estudio eran invitados a acudir a la visita de inicio y a las visitas de seguimiento anuales que se realizaban en los CAP durante el periodo de duración del estudio. En cada visita, las dietistas y el equipo de enfermería revisaban y cumplimentaban distintos cuestionarios, realizaban determinaciones antropométricas, de presión arterial y un ECG. Además se obtuvieron muestras biológicas de los participantes.

Recopilación de datos mediante cuestionarios

- *Cuestionario general (Anexo 2)* que recoge datos demográficos y socio-económicos de los participantes. También incluye antecedentes patológicos, tratamiento farmacológico, consumo de alcohol, y antecedentes familiares de cardiopatía isquémica, hipercolesterolemia, hipertensión y cáncer.
- *Cuestionario semi-cuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos (Anexo 3)* de 137 alimentos que incluye la frecuencia de consumo diaria, semanal o mensual durante el último año, el cual fue validado en la población estudiada ²⁹⁷.
- *Cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos (Anexo 5)* validado en población estudiada ²⁹⁸.
- *Cuestionario de actividad física en el tiempo libre (Anexo 4)*, versión validada para población española del Cuestionario de Actividad Física durante el Tiempo Libre de Minnesota ²⁹⁹.
- *Cuestionario de tolerancia y efectos adversos (Anexo 7)* para valorar posibles efectos no deseados de las 3 intervenciones.
- *Cuestionario de seguimiento (Anexo 8)*, similar al cuestionario general pero incluye información sobre los cambios producidos desde la última visita, así como nuevo diagnóstico de diabetes, hipercolesterolemia, hipertensión u otras condiciones médicas o cambios en la medicación, y recogida de eventos de ECV.

Determinaciones antropométricas y presión arterial

El personal de enfermería entrenado determinó diferentes parámetros antropométricos tal como el peso (kg) usando una báscula calibrada (precisión de 100 g) y la talla (m) con un tallímetro de pared calibrado, con el participante descalzo y en ropa interior; a partir de estos dos parámetros se calculó el IMC (kg/m²), y perímetro de la cintura (cm).

Material y métodos

También se determinó la tensión arterial por duplicado mediante un oscilómetro semiautomático (Omron HEM-705CP, Holanda). Toda esta información se registraba tanto en el cuestionario general como en el de seguimiento.

Obtención de muestras biológicas y determinaciones bioquímicas

Cuando se contactaba con el participante se le informaba que debía asistir a la visita en ayunas (mínimo de 12 horas), con una muestra de la primera orina matutina y una muestra de las uñas del pie, en recipientes esterilizados apropiados. Un vez en consulta, se procedía a la extracción de sangre periférica por medio de venopunción con técnica estandarizada (en la visita basal y en las visitas de seguimiento de los años 1, 3, 5 y 7/o la visita final de seguimiento). Se obtuvieron muestras de plasma-EDTA (tubos K3E de 4,5 ml con EDTA) y suero (tubos SST de 4 ml con gel separador) y se procesaron inmediatamente. Cada uno de los tubos de extracción de sangre se centrifugaron a 2.500 rpm durante 15 minutos, y a continuación las muestras fueron fraccionadas formando alícuotas en criotubos de 500 y 200 μ l. A partir de la muestra de orina, se realizaron alícuotas de 650 μ l.

Todas las alícuotas fueron identificadas con el código asignado al participante, colocadas en criocajas, y transportadas en una nevera portátil con hielo (4°C) para no romper con la cadena de frío al laboratorio central para ser almacenadas a -80°C hasta su posterior determinación. El tiempo transcurrido entre la extracción de muestras de sangre y la congelación no fue superior a una hora.

Con las muestras de plasma, suero y orina se realizaron determinaciones bioquímicas básicas, como es un análisis bioquímico de rutina, y determinaciones específicas de interés a partir de las alícuotas almacenadas. Nos centraremos en las que se van a utilizar en la presente Tesis Doctoral:

- *Determinaciones bioquímicas básicas*

La glucosa plasmáticas en ayunas y las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol total y lipoproteína de alta densidad (HDL-col) fueron determinadas mediante métodos enzimáticos estandarizados. La lipoproteína de baja densidad (LDL-col) fue obtenida mediante la aplicación de la fórmula de Friedewald ($LDL\text{-col} = \text{colesterol total} - ((\text{Triglicéridos}/5) + HDL\text{-col})$). También se obtuvieron las concentraciones séricas de urea y creatinina mediante el método de la ureasa y el colorimétrico de Jaffé, respectivamente. Con las muestra de orina matutina se determinaron los parámetros analíticos de albúmina y creatinina urinaria mediante la técnica verde bromocresol y el método colorimétrico de Jaffé, respectivamente. A partir de la creatinina plasmática fue estimada la tasa de filtración glomerular mediante la ecuación CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) ³⁰⁰.

- *Determinaciones bioquímicas específicas de interés*

Las alícuotas de plasma y suero que fueron obtenidas de cada participante y que se mantenían conservadas a -80°C sin haber sufrido ninguna descongelación previa, se extrajeron y fueron descongeladas a una temperatura de entre 2-4°C. El propósito de esto, era obtener una descongelación más lenta de las muestras y no alterar el estado de sus componentes, para posteriormente realizar las siguientes determinaciones:

- Insulina y adiponectina. Las concentraciones plasmáticas de insulina y adiponectina fueron determinadas mediante kits de ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas tipo sándwich (ELISA), (Millipore, St. Charles, Missouri, USA), con un coeficiente de variación intra e inter-ensayo de < 5 % y < 10 % para ambos kits. Posteriormente, la resistencia a la insulina se estimó por el modelo de homeostasis de valoración de RI (HOMA) utilizando la fórmula: $\text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucosa en ayunas } (\text{mmol/L})/22,5$.
- sTWEAK y receptor *scavenger* sCD163. Las concentraciones séricas de las formas solubles del TWEAK y del receptor *scavenger* CD163 fueron determinadas mediante los

Material y métodos

kits ELISA human TWEAK/TNFSF12 y el human CD163 (R&D Systems Europe, Abingdon, Oxon, United Kingdom), respectivamente. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 2,5-7,0% para la sTWEAK y de 2,4-6,4 % para el sCD163.

- Se determinaron las concentraciones séricas de ambas formas de osteocalcinas. La osteocalcina carboxilada se determinó mediante un kit de inmuno-ensayo enzimático de sensibilidad amplificada de fase sólida (EASIA) (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). El límite de detección, definido como la concentración aparente de dos desviaciones estándar por encima de la densidad óptica promedio en unión cero, fue de 0,08 ng/ml y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores del 6%. Para la osteocalcina no carboxilada se utilizó un kit de inmuno-ensayo enzimático de fase sólida (EIA) (Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan) con una sensibilidad de 0,25 ng/ml y unos coeficientes de variación intra e inter-ensayo de 5,2- 8,3%.

Todos los análisis fueron realizados por duplicado y en ciego, siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial.

Definición de diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2

La incidencia de DMT2 fue un objetivo secundario específico del ensayo PREDIMED. Se consideraba que un participante presentaba DMT2 al inicio del estudio cuando existía un diagnóstico médico y/o la persona tomaba algún tipo de medicación antidiabética.

El diagnóstico de nuevos casos de DMT2 se realizó según los criterios establecidos por la ADA ⁷, concretamente por la presencia de los niveles de glucosa plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dl o glucemia plasmática a las dos horas después de la PTOG (con 75 de glucosa) ≥ 200 mg/dl.

Anualmente en cada centro del estudio PREDIMED se realizaba una exhaustiva revisión de las historias clínicas de todos los participantes por los médicos-investigadores. Cuando era identificado un nuevo caso de DMT2, en base a un diagnóstico médico reportado en las

historias clínica o en la glucemia plasmática en ayunas obtenida durante los análisis bioquímicos de rutina (hecho al menos una vez al año), éste nuevo evento debía ser justificado. Para ello, se enviaban estos informes y toda la documentación pertinente, a los miembros del Comité de Adjudicación de Eventos Clínicos PREDIMED, los cuales fueron ciegos a la intervención y a los biomarcadores evaluados en esta Tesis Doctoral. Solamente cuando una segunda determinación analítica se había hecho dentro de los siguientes 3 meses, y se cumplían los criterios de glucemia plasmática mencionados anteriormente, el nuevo caso de DMT2 fue confirmado por el Comité de Adjudicación como evento de diabetes. Cabe destacar, que el único centro que realizó de forma anual una PTOG a todos los sujetos no diabéticos fue el nodo de Reus-Tarragona. Sólo los eventos de DMT2 que se confirmaron entre el 01 de octubre del 2003 y 01 de diciembre del 2010 fueron los que se incluyeron en los análisis.

Definición de diagnóstico de síndrome metabólico

En el presente trabajo, el diagnóstico de SM fue definido en base a los criterios armonizados actualizados de la IDF en conjunto con Asociación Americana del Corazón/Instituto Nacional del Corazón, Sangre y Pulmón (AHA/NHLBI, en inglés) en el año 2009 ³⁰¹. Se consideró que un participante tenía SM, si presentaba tres o más de los siguientes 5 factores de riesgo:

- a) Glucosa en ayunas elevada (≥ 100 mg/dl (5,5 mmol/L)) o toma de medicación para la diabetes.
- b) Obesidad abdominal definida por el perímetro de la cintura basándose en los puntos de corte utilizados para población Europea (≥ 102 cm en hombre y ≥ 88 cm en mujeres).
- c) Concentraciones altas de triglicéridos (≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/L)) o toma de medicación para los triglicéridos.
- d) Concentraciones bajas de HDL (< 40 mg/dl (1,0 mmol/L en hombres y < 50 mg/dl (1,3 mmol/L) en mujeres) o en tratamiento con medicación.
- e) Tensión arterial alta ($\geq 130/85$ mmHg) o toma de medicación para tratar la hipertensión.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

6. POBLACIÓN DE ESTUDIO

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

6. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Población y selección de la muestra estudiada

Estudio 1. *Serum sTWEAK concentrations and risk of developing type 2 diabetes in a high cardiovascular risk population: a nested case-control study.*

Estudio 3. *Reduced serum concentrations of carboxylated and undercarboxylated osteocalcin are associated with risk of developing type 2 diabetes mellitus in a high cardiovascular risk population: a nested case-control study.*

Para llevar a cabo estos dos análisis, se realizó un estudio con un diseño de casos y controles (1:2) anidado, con un total de 459 participantes no diabéticos seleccionados de una submuestra de 1.378 participantes no diabéticos al inicio del estudio pertenecientes a la cohorte PREDIMED, los cuales fueron reclutados en 3 nodos, Reus-Tarragona, Barcelona y Pamplona.

Durante el periodo de seguimiento (mediana, 5,9 años, mínimo 1,2 meses y máximo 8,2 años), 153 individuos de la submuestra desarrollaron DMT2 (casos). Para cada nuevo caso de DMT2 identificado, fueron seleccionados aleatoriamente dos controles (n=306) entre esos 1.225 participantes restantes que no habían desarrollado la enfermedad durante el periodo de seguimiento. Los controles fueron emparejados a los casos por: edad, sexo, IMC, y grupo de intervención, de tal forma que como grupo fueran comparables en estas características a los casos.

La selección al azar de los controles se realizó de la siguiente manera: los 1.225 individuos no diabéticos que fueron candidatos a ser incluidos en el grupo control, fueron clasificados de acuerdo a las categorías de las variables de emparejamiento: edad (≤ 67 o > 67 años), sexo (0= hombre o 1= mujer), IMC (≤ 27 o > 27 kg/m²), y grupo de intervención (1= dieta Mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra o 2= dieta Mediterránea suplementada con frutos secos o 3= grupo control). En total se crearon 24 grupos ($2 \times 2 \times 2 \times 3 = 24$ grupos), y de cada grupo, 2 controles fueron seleccionados al azar para cada caso que pertenecía al mismo grupo. Ésta

Población de estudio

selección se realizó mediante números aleatorios generados con la función “uniform (1)” del SPSS y la rutina descrita en <http://kb.iu.edu/data/acwb.html>.

Estudio 2. *Reduced circulating sTWEAK levels are associated with metabolic syndrome in elderly individuals at high cardiovascular risk.*

Para el propósito de este análisis, con un diseño de estudio trasversal, se incluyeron 452 participantes no diabéticos al inicio del estudio, que habían sido seleccionados previamente de la submuestra de los 1.378 participantes de la cohorte PREDIMED reclutados en los 3 nodos mencionados anteriormente, y de los cuales se disponían de las determinaciones bioquímicas de sTWEAK.

7. PUBLICACIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

7. PUBLICACIONES

Publicación 1.

Título: *Serum sTWEAK concentrations and risk of developing type 2 diabetes in a high cardiovascular risk population: a nested case-control study.*

Autores: Díaz-López A, Chacón MR, Bulló M, Maymó-Masip E, Martínez-González MA, Estruch R, Vendrell J, Basora J, Díez-Espino J, Covas MI, Salas-Salvadó J.

Año: 2013

Revista: J Clin Endocrinol Metab

Volumen: 98

Páginas: 3482-3490

PMID: 23760626

Factor de impacto: 6,31

Resumen:

Introducción y objetivo: El sTWEAK es una citocina multifuncional implicada en la regulación de muchas actividades celulares tal como proliferación, migración, diferenciación, apoptosis, angiogénesis e inflamación. Recientemente, se ha descrito una relación entre el sTWEAK y el receptor *scavenger* sCD163, al cual éste puede unirse, y la resistencia a la insulina. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar la asociación entre las concentraciones séricas de sTWEAK y sCD163 con el desarrollo de diabetes tipo 2 (DMT2) en sujetos de edad avanzada con alto riesgo cardiovascular.

Diseño, escenario y participantes: Se realizó un estudio de casos y controles anidado, prospectivo, incluyendo 153 sujetos con nuevo diagnóstico de diabetes (casos) y 306 controles emparejados individualmente con casos (1:2) por edad, sexo, IMC y grupo de intervención, y que no desarrollaron diabetes durante un promedio de 5 años de seguimiento. Mediante modelos de regresión logística condicional se estimaron las Odds Ratios (ORs) para la incidencia de DMT2

Publicaciones

según categorías de concentraciones de sTWEAK y de sCD163, ambos determinados en suero mediante kits ELISA.

Resultados: Al inicio del estudio, las concentraciones séricas de sTWEAK fueron más bajas en los nuevos casos de DMT2 en comparación con los controles. No se observaron diferencias entre casos y controles en cuanto a las concentraciones séricas de sCD163. Después de ajustar por varios factores de confusión, las ORs para la incidencia de DMT2 en sujetos localizados en el cuartil más alto de las concentraciones de sTWEAK y del ratio sCD163/sTWEAK respecto a los sujetos localizados en el cuartil de referencia (primero) fueron 0,49 (IC del 95%, 0,31-0,76; *P* para la tendencia <0,01) y 1,67 (1,06-2,63; *P* para la tendencia =0,05), respectivamente. Un ajuste adicional por otras variables confusoras de estilo de vida, tuvo poco impacto sobre las estimaciones observadas. Mientras que el ajuste adicional por los componentes del síndrome metabólico y los niveles de insulina atenuó la magnitud de las asociaciones y sólo el sTWEAK permaneció asociado con el riesgo de incidencia de diabetes (OR: 0,63 (0,40-0,98); *P* para la tendencia =0,05).

Conclusión: En una población de alto riesgo cardiovascular, unas concentraciones séricas de sTWEAK reducidas al inicio del estudio, se asociaron con un mayor riesgo de incidencia de diabetes. Este estudio describe por primera vez al sTWEAK, como un potencial biomarcador candidato para predecir el desarrollo de DMT2.

Serum sTWEAK Concentrations and Risk of Developing Type 2 Diabetes in a High Cardiovascular Risk Population: A Nested Case-Control Study

Andrés Díaz-López, Matilde R. Chacón, Mònica Bulló, Elsa Maymó-Masip, Miguel A. Martínez-González, Ramón Estruch, Joan Vendrell, Josep Basora, Javier Díez-Espino, María-Isabel Covas, and Jordi Salas-Salvadó

Human Nutrition Unit (A.D.-L., M.B., J.B., J.S.-S.), Faculty of Medicine and Health Sciences, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Tarragona, Spain; CIBERobn Physiopathology of Obesity and Nutrition (A.D.-L., M.B., M.A.M.-G., R.E., J.B., M.-I.C., J.S.-S.), Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain; The Biomedical Research Centres Network for Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM) (E.M.-M., M.R.C., J.V.), University Hospital of Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain; Department of Preventive Medicine and Public Health (M.A.M.-G.), University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain; Department of Internal Medicine (R.E.), Hospital Clínic, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; Primary Health Care Centre of Tafalla (J.D.-E.), 31300 Tafalla, Spain; and Lipids and Cardiovascular Epidemiology Research Unit (M.-I.C.), Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), 08003 Barcelona, Spain

Context and Objective: Because serum concentrations of soluble forms of TNF-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) and scavenger receptor CD163 (sCD163) have been associated with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus (T2D), we tested the associations of sTWEAK and sCD163 with the future development of T2D in elderly subjects at high cardiovascular risk.

Design, Setting, and Participants: A prospective, matched case-control study of 153 cases of newly diagnosed diabetic subjects and 306 individually matched controls who did not develop diabetes during a mean 5-year follow-up was conducted using data from the PREDIMED study. Conditional logistic regression was used to estimate the matched odds ratio (OR) for incident T2D according to categories of baseline sTWEAK and sCD163 concentrations measured by ELISA.

Results: Baseline sTWEAK concentrations were lower in cases than controls. There were no case-control differences in sCD163 concentrations. In the conditional logistic model that took into account the matching factors, the ORs for T2D incidence in the highest vs the lowest quartile of sTWEAK and the sCD163/sTWEAK ratio were 0.49 (95% confidence interval [CI], 0.31–0.76; *P* for trend <.01) and 1.67 (95% CI, 1.06–2.63; *P* for trend = .05), respectively. Further adjustment for potential lifestyle confounding factors had little impact on these estimates, whereas adjustment for metabolic syndrome components and fasting insulin levels attenuated the magnitude of associations and only the sTWEAK remained statistically significant (OR = 0.63; 95% CI, 0.40–0.98; *P* for trend = .05).

Conclusion: These findings indicate that in a population at high cardiovascular risk, reduced circulating levels of sTWEAK are associated with an increased risk of diabetes incidence. (*J Clin Endocrinol Metab* 98: 3482–3490, 2013)

Type 2 diabetes (T2D) is a growing public health issue that has a major effect on morbidity and premature mortality worldwide (1, 2). Obesity, a major risk factor for diabetes (3), induces chronic low-grade inflammation in adipose tissue, characterized by an infiltration of activated macrophages, increased expression of cytokines, and a greater predisposition to obesity-related insulin resistance (4), a necessary step in the pathogenesis of diabetes (5). Concordantly, many cytokines have been implicated in multiple pathways modulating the inflammation associated with glucose metabolism, insulin sensitivity, and T2D (6, 7). One of these pathways could be mediated by the TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), a molecule of the TNF superfamily of cytokines mainly produced by macrophages. TWEAK is synthesized as a type II transmembrane glycoprotein and subsequently released into the circulation as a soluble bioactive form (sTWEAK) (8). In recent years, TWEAK has emerged as a new player in inflammatory processes (9). The binding of TWEAK to its receptor, fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14), is responsible for a variety of biological activities, including stimulation of cell growth, angiogenesis, induction of pro-inflammatory cytokines, and apoptosis (10).

Cross-sectional studies have shown that serum sTWEAK concentrations are decreased in type 1 diabetes (T1D) and T2D patients (11, 12). Furthermore, an inverse association between sTWEAK concentrations and both fasting glucose and homeostasis model of assessment (HOMA) for insulin resistance (HOMA-IR) have been cross-sectionally reported in T2D patients on chronic hemodialysis (12). Similarly, sTWEAK concentrations were negatively associated with fasting glucose levels in asymptomatic subjects (13).

Another TWEAK binding membrane protein, the scavenger receptor CD163, has been identified. CD163 is expressed as a membrane-bound protein in macrophages and monocytes, which is highly expressed in human adipose tissue. It circulates in blood as a soluble form (sCD163) generated by a proteolytic cleavage of the membrane CD163 (14, 15). However, the functional role of sCD163 remains to be fully characterized. Surprisingly, cross-sectional studies have shown that serum sCD163 concentrations are increased in obese subjects and are strongly positively associated with HOMA-IR in both normal-weight and overweight individuals with T2D or impaired glucose tolerance (13–18). Furthermore, in a recent prospective study with 18-year follow-up, it has been shown that increased concentrations of serum sCD163 are a risk factor for developing T2D (19).

Altogether, these data suggest that soluble forms of TWEAK and CD163 could play an intermediary role in

the pathogenesis of T2D by directly inducing insulin resistance or through inflammatory mechanisms.

To our knowledge, the relationship between the concentrations of both biomarkers and the development of T2D has yet to be evaluated. Therefore, to address the associations of sTWEAK and sCD163 with the future development of diabetes, we tested the hypothesis that decreased concentrations of sTWEAK and increased concentrations of sCD163 are related to a higher risk of T2D. For this purpose, we identified new cases of diabetes occurring during the follow-up of a cohort of nondiabetic individuals from the PREvención con Dieta MEDiterránea (PREDIMED) study and measured baseline serum sTWEAK and sCD163 concentrations in these cases and matched controls.

Subjects and Methods

Study design and population

The PREDIMED study is a multicenter, randomized, parallel group primary prevention trial conducted in Spain to assess the effects of the Mediterranean diet (MedDiet) on cardiovascular disease (CVD). The protocol, design, objectives, and methods of the PREDIMED trial (<http://www.controlled-trials.com/ISRCTN35739639>) have been reported in detail elsewhere (20, 21), and are available at <http://www.predimed.org> and www.predimed.es. Briefly, recruitment took place between 2003 and 2009, and 7447 asymptomatic individuals at high risk for coronary heart disease (CHD) complied with inclusion criteria and were randomly assigned in a 1:1:1 ratio to 1 of 3 nutrition intervention groups: 2 MedDiet groups (supplemented with virgin olive oil or nuts) or a control low-fat diet group consisting of advice to reduce intake of all types of fat. Randomization was performed centrally by means of a computer-generated random-number sequence. The Institutional Review Boards of the recruitment centers approved the study protocol, and participants gave their written informed consent.

The present report describes a nested case-control study within the longitudinal study, to assess the associations between baseline serum concentrations of sTWEAK and sCD163 and the future development of T2D.

For the nested case-control study, we used data from 459 individuals of the total 1378 Caucasian nondiabetic individuals recruited from 3 Spanish centers of the PREDIMED study (Reus-Tarragona, Pamplona, and Barcelona Clinic). Subjects were community-dwelling men aged 55–80 years and women aged 60–80 years without prior CVD at baseline but with at least 3 of the following cardiovascular risk factors: smoking, hypertension, dyslipidemia, overweight/obesity, or family history of premature CHD. The exclusion criteria for the PREDIMED study were any severe chronic illness, alcohol or drug addiction, and history of food allergy to olive oil or nuts. All participants with baseline-prevalent diabetes were excluded from the present analysis.

Of the 1378 individuals recruited, we selected all the individuals who developed T2D during follow-up ($n = 153$). The median follow-up was 5.9 years (minimum, 1.2 mo; maximum,

8.2 y). For each subject who developed diabetes, 2 controls were selected at random among those who had not developed diabetes during the follow-up ($n = 306$). Controls were matched for dietary intervention group (MedDiet+virgin olive oil, MedDiet+nuts, or control group), age (≤ 67 vs > 67 y), sex, and body mass index (BMI) (≤ 27 vs > 27 kg/m²).

Ascertainment of incident diabetes

The primary outcome was new-onset diabetes, diagnosed according to American Diabetes Association criteria (22): namely, fasting plasma glucose ≥ 126 mg/dL (7 mmol/L) or 2-hour plasma glucose ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) after a 75-g oral glucose tolerance test measured yearly. A second test using the same criteria as above was required for confirmation. Cases were ascertained by the PREDIMED Clinical Event Committee, whose members were blinded to the intervention and to the assessed biomarkers.

Measurements

At baseline and each annual visit, all participants completed: 1) a general questionnaire about education, lifestyle, comorbidities, and medication use; 2) a validated 137-item food frequency questionnaire (20); 3) a validated physical activity questionnaire (23); and 4) a validated 14-point questionnaire to assess adherence to the MedDiet (24). In addition, anthropometric variables and blood pressure measured in triplicate using a validated semiautomatic oscillometer (Omron HEM-705CP; Omron Corp., Hoofddorp, The Netherlands) were determined (25).

Biochemical determinations

Blood samples were collected after an overnight fast. The aliquots of serum and EDTA plasma were immediately processed, coded, and shipped to a central laboratory in a portable cooler (-4°C), and stored at -80°C until analysis. The time between blood sampling and freezing was less than 1 hour. Plasma levels of fasting glucose and serum levels of total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, and triglycerides were measured by standard enzymatic methods. Low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol concentrations were calculated using Friedewald's equation. Plasma insulin concentrations were measured by ELISA (EZHI-14K; Millipore, St Charles, Missouri) with intra- and interassay coefficients of variation of 5.9 and 10.3%, respectively. Insulin resistance was estimated by the HOMA method: $\text{HOMA-IR} = [\text{fasting insulin } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{fasting glucose (mmol/L)}] / 22.5$.

Serum concentrations of sTWEAK and sCD163 were determined in duplicate by ELISA using the commercially available human TWEAK/TNFSF12 kit DY1090 and human CD163 kit DY1607 (R&D Systems Europe, Abingdon, Oxon, United Kingdom), respectively. The intra- and interassay coefficients of variation were 2.5 and 7.0% for sTWEAK and 2.4 and 6.4% for sCD163, respectively.

Statistical analysis

The baseline characteristics of participants were described using mean \pm SD values or median and interquartile range (IQR) for continuous variables, and numbers and percentage for categorical variables. The normality of variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Fasting glucose, insulin, sTWEAK, sCD163, and the sCD163/sTWEAK ratio were log-

transformed to approximately normalize their distributions before the analyses. Student's *t* test for continuous variables and χ^2 test for categorical variables were used to assess differences according to baseline characteristics between participants who developed diabetes or not. BMI, age- and sex-adjusted partial correlation coefficients were used to assess the relationship between biomarkers measured at baseline and components of the insulin resistance syndrome.

To assess the risk of diabetes for each of the serum concentration categories of the biomarkers, participants were categorized according to their quartiles of baseline sex-adjusted sTWEAK and sCD163 concentrations (or the sCD163/sTWEAK ratio). We used conditional logistic regression models to estimate the matched odds ratios (ORs) and the 95% confidence interval (CI) for incident diabetes for the 3 upper quartiles using the lowest quartile as the reference category.

An unadjusted model and 2 other adjusted models were fitted. Model 1 was adjusted for known diabetes risk factors: family history of diabetes (yes/no), educational level, alcohol consumption (≥ 3 standard drink units for men or ≥ 1.5 for women or less than these amounts), smoking (current/not current), leisure-time physical activity (sedentary, ≤ 200 metabolic equivalents [METs]-min/d; vs active, > 200 METs-min/d), and the PREDIMED 14-item MedDiet score (0–14). Model 2 was additionally adjusted for the metabolic syndrome (MetS) components: waist circumference > 102 cm in men/ > 88 cm in women (yes/no); serum triglycerides ≥ 150 mg/dL (1.6 mmol/L) (yes/no); HDL-cholesterol < 40 mg/dL (1 mmol/L) in men/ < 50 mg/dL (1.2 mmol/L) in women (yes/no); high blood pressure ($\geq 130/85$ mm Hg) or treatment with antihypertensive medication (yes/no); fasting plasma glucose level ≥ 100 mg/dL (5.5 mmol/L) (yes/no); and fasting insulin levels (log_e-transformed continuous variable). Linear-trend tests were conducted across categories by assigning the medians to each category and treating it as a continuous variable. All statistical tests were 2-tailed, and the significance level was set at $P \leq .05$. Analyses were performed using SPSS software version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

Results

Of the 459 participants, 7 were excluded because no blood samples were available to determine sTWEAK or sCD163 concentrations. Thus, analyses were carried out in a sample of 452 individuals.

Table 1 shows the selected baseline characteristics and biomarker concentrations of those participants who developed incident T2D (cases, $n = 148$) and those who remained free of diabetes (matched controls, $n = 304$) during the follow-up. As expected, the percentage of men and individuals in each of the intervention groups, average age, and BMI were similar between both groups. Individuals who developed diabetes were more likely to have a family history of diabetes (36.0 vs 24.5%), had higher baseline mean systolic blood pressure and triglyceride concentrations, and had lower baseline HDL-cholesterol levels than their matched control individuals. Cases had higher baseline levels of fasting glucose, insulin, and

Table 1. Baseline Characteristics of Participants

Baseline Variable	Incident Diabetics (cases)	Matched Controls ^a	P Value ^b
n	148	304	
Age, y	66.3 ± 5.8	66.3 ± 6.0	.96
MedDiet+VOO/MedDiet+Nuts/control intervention groups, n	49/43/56	100/89/115	1.00
Men	72 (47)	144 (47)	1.00
Body weight, kg	78.49 ± 11.25	76.81 ± 10.88	.12
BMI, kg/m ²	30.20 ± 3.18	29.79 ± 3.00	.18
Overweight/obesity (BMI ≥ 25 kg/m ²)	148 (97)	293 (96)	.61
Smoking habits			.20
Current smoker	40 (26)	64 (21)	
Non-smoker	113 (74)	242 (79)	
Physical activity, METs-min/d	276.9 ± 229.0	267.4 ± 238.9	.68
Educational level			.88
Primary education or illiterate	106 (69)	214 (70)	
Secondary or higher education	47 (31)	92 (30)	
Family history of diabetes	55 (36.0)	75 (24.5)	.01
Family history of premature CHD	33 (21.6)	46 (15.0)	.08
Medication use			
Statins	67 (43.8)	122 (39.9)	.42
Fibrates	2 (1.3)	8 (2.6)	.51
Antihypertensive drugs	118 (77.1)	234 (76.5)	.91
Diastolic blood pressure, mm Hg	87.50 ± 10.97	85.99 ± 10.23	.14
Systolic blood pressure, mm Hg	154.89 ± 20.93	151.20 ± 19.80	.06
Triglyceride, mg/dL	156.2 ± 113.2	136.4 ± 70.3	.02
Total cholesterol, mg/dL	219.9 ± 42.1	224.6 ± 35.2	.21
LDL-cholesterol, mg/dL	136.1 ± 33.0	140.7 ± 32.1	.15
HDL-cholesterol, mg/dL	53.21 ± 12.49	56.27 ± 14.15	.02
Fasting glucose, mg/dL ^c	110.0 (100.0, 123.0)	93.0 (87.0, 99.0)	<.001
Fasting insulin, μU/mL ^c	5.32 (3.44, 7.34)	4.32 (3.08, 6.69)	.021
HOMA-IR	1.70 ± 1.08	1.23 ± 0.79	<.001
sTWEAK, pg/mL ^c	538.7 (303.9, 745.4)	591.5 (419.5, 837.9)	.04
sCD163, ng/mL ^c	225.9 (171.4, 308.0)	223.3 (166.9, 305.8)	.99
sCD163/sTWEAK ratio ^c	0.43 (0.27, 0.74)	0.38 (0.22, 0.61)	.08
MedDiet score (0 to 14)	8.56 ± 1.76	8.64 ± 1.88	.64

Abbreviations: MedDiet+VOO, MedDiet supplemented with virgin olive oil; MedDiet+nuts, MedDiet supplemented with nuts. Data are expressed as mean ± SD or number (%), unless otherwise specified. SI conversion factors: triglycerides, mg/dL × 0.01129 = mmol/L; cholesterol, HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol, mg/dL × 0.02586 = mmol/L; glucose, mg/dL × 0.0556 = mmol/L; insulin, μU/mL × 6.945 = pmol/L.

^a Matched for dietary intervention group (MedDiet+VOO, MedDiet+Nuts, or control group), age (≤67 vs >67 y), sex, and BMI (≤27 vs >27 kg/m²).

^b P value for comparisons between 2 groups was tested by χ² test for categorical variables or Student's *t* test for continuous variables.

^c Values expressed as median (IQR).

HOMA-IR. Compared to matched controls, incident cases had lower median serum sTWEAK concentrations (538.7 vs 591.5 pg/mL; *P* = .04) and a nonsignificantly higher sCD163/sTWEAK ratio (0.43 vs 0.38; *P* = .08), whereas median levels of sCD163 concentrations were similar in cases and controls.

Serum concentrations of sTWEAK and sCD163 and their sCD163/sTWEAK ratio according to the baseline characteristics of the case-control sample are summarized in Table 2. The median serum concentrations of sTWEAK were significantly lower in men than in women, in current smokers vs nonsmokers, in individuals that had impaired fasting glucose (≥110 mg/dL [6 mmol/L]), and in individuals with MetS (*P* values < .05, all). There were no significant differences between serum sTWEAK concentrations and other selected characteristics. Similarly, no

significant differences were observed in serum sCD163 concentrations in the different subgroups. The sCD163/sTWEAK ratio was significantly higher in men vs women, in individuals that had impaired fasting glucose, and in individuals with MetS (*P* values < .05, all). We calculated BMI, age- and sex-adjusted partial correlation coefficients between baseline serum concentrations of sTWEAK and sCD163, or the sCD163/sTWEAK ratio and components of the insulin resistance syndrome (Table 3). No relationship between sTWEAK and sCD163 was found (data not shown). However, statistically significant negative relationships were found between sTWEAK and HOMA-IR (*r* = −0.17, *P* < .05 in cases; *r* = −0.12, *P* < .05 in controls). In contrast, the sCD163/sTWEAK ratio was also positively related to HOMA-IR (*r* = 0.23, *P* < .01 in cases; *r* = 0.16, *P* < .01 in controls).

Table 2. Serum Concentrations of sTWEAK and sCD163 and sCD163/sTWEAK Ratio According to Baseline Characteristics of Participants Included in the Study

Baseline Variable	sTWEAK, pg/mL	P Value	sCD163, ng/mL	P Value	sCD163/sTWEAK Ratio	P Value
Age		.49		.76		.44
≤67 y (n = 267)	549.4 (391.6, 788.5)		224.8 (174.1, 303.2)		0.39 (0.25, 0.67)	
>67 y (n = 185)	586.5 (388.4, 840.7)		221.8 (164.3, 313.5)		0.38 (0.23, 0.66)	
Sex		.01		.78		.04
Men (n = 214)	537.7 (375.5, 684.9)		227.7 (166.8, 303.7)		0.44 (0.27, 0.69)	
Women (n = 238)	631.9 (411.3, 951.4)		221.0 (171.1, 313.5)		0.36 (0.21, 0.58)	
Obesity (BMI > 30 kg/m ²)		.12		.65		.11
With (n = 208)	536.3 (368.5, 795.2)		226.7 (169.7, 307.6)		0.40 (0.25, 0.70)	
Without (n = 244)	594.8 (421.3, 820.5)		223.0 (167.5, 305.7)		0.38 (0.23, 0.61)	
Current smoker		.04		.26		.29
Yes (n = 104)	530.0 (373.3, 632.0)		224.9 (165.0, 289.5)		0.41 (0.29, 0.59)	
No (n = 348)	599.5 (401.7, 850.9)		224.5 (171.1, 311.9)		0.39 (0.22, 0.68)	
Physical activity (>200 METs-min/d)		.51		.58		.37
Active (n = 221)	592.5 (394.0, 844.5)		214.4 (168.9, 292.3)		0.36 (0.22, 0.62)	
Sedentary (n = 231)	545.6 (383.2, 789.4)		234.2 (168.5, 308.9)		0.42 (0.26, 0.68)	
Hypertension		.79		.78		.94
With (n = 437)	563.3 (388.4, 815.1)		226.5 (169.1, 308.1)		0.39 (0.25, 0.66)	
Without (n = 14)	616.9 (537.7, 706.4)		213.1 (164.7, 277.4)		0.38 (0.26, 0.54)	
Family history of diabetes		.69		.71		.90
With (n = 128)	573.7 (366.9, 908.6)		232.3 (171.4, 305.8)		0.39 (0.21, 0.74)	
Without (n = 324)	562.7 (397.9, 787.6)		217.6 (168.6, 307.2)		0.39 (0.25, 0.65)	
Fasting glucose		<.01		.21		<.01
>110 mg/dL (n = 97)	485.7 (289.9, 726.3)		242.3 (169.1, 310.0)		0.48 (0.29, 0.85)	
≤110 mg/dL (n = 349)	581.6 (417.2, 811.3)		219.3 (168.3, 304.2)		0.37 (0.22, 0.58)	
MetS		.02		.08		<.01
With (n = 232)	541.8 (366.1, 749.9)		240.1 (171.4, 317.2)		0.42 (0.26, 0.75)	
Without (n = 220)	598.2 (426.8, 864.8)		215.8 (165.1, 291.0)		0.36 (0.21, 0.54)	

Data are expressed as median (IQR). P value for comparisons between the different subgroups was tested by Student's *t* test.

Table 4 shows the results of the conditional logistic regression models, in which we assessed the associations of baseline serum concentrations of the biomarkers with incident T2D. In the crude analyses conditioned on matching for dietary intervention group, age, sex, and BMI, there was a statistically significant association between increased sTWEAK concentrations and a decreased risk of incident T2D in individuals in the top quartile vs those in the lowest quartile (OR, 0.49; 95% CI, 0.31–0.76; *P* for linear trend < .01). This association was similar after fur-

ther adjustment for family history of diabetes and different lifestyle risk factors (model 1). Additional control for MetS components and insulin concentrations considerably attenuated but did not eliminate this association, although the linear trend across the quartiles of sTWEAK concentrations was borderline significant (OR, 0.63; 95% CI, 0.40–0.98; *P* for linear trend = .05) (model 2). No significant associations were observed between sCD163 concentrations and incident diabetes in either of the adjusted models tested. As expected, like the results obtained

Table 3. BMI-, Age-, and Gender-Adjusted Partial Correlation Coefficients Between Serum Concentrations of sTWEAK and sCD163 or the sCD163/sTWEAK Ratio and Components of the Insulin Resistance Syndrome

	All (n = 452)			Incident Diabetics (cases) (n = 148)			Matched controls (n = 304) [#]		
	Glucose	Insulin	HOMA-IR	Glucose	Insulin	HOMA-IR	Glucose	Insulin	HOMA-IR
sTWEAK, pg/mL	−0.13 ^b	−0.15 ^b	−0.16 ^c	−0.18 ^a	−0.15 ^a	−0.17 ^a	−0.04	−0.14 ^b	−0.12 ^a
sCD163, ng/mL	0.01	0.09 ^a	0.11 ^a	−0.04	0.14	0.14	0.06	0.07	0.09
sCD163/sTWEAK ratio	0.12 ^b	0.18 ^c	0.20 ^c	0.12	0.20 ^b	0.23 ^b	0.07	0.16 ^b	0.16 ^b

Data are correlation coefficients.

[#] Matched for dietary intervention group (MedDiet supplemented with virgin olive oil, MedDiet supplemented with nuts, or control group), age (≤67 vs >67 yr), sex, and BMI (≤27 vs >27 kg/m²).

^a *P* < .05; ^b *P* < .01; ^c *P* < .001.

Table 4. Crude and Adjusted Risk of T2D According to Sex-Adjusted Quartiles of Serum Concentrations of sTWEAK and sCD163 or the sCD163/sTWEAK Ratio

	Quartiles (Q) of Biomarkers				P for Linear Trend
	Q1	Q2	Q3	Q4	
n	112	114	114	112	
sTWEAK, median (IQR), pg/mL	275.4 (227.4, 327.9)	489.7 (440.4, 536.4)	668.5 (598.8, 760.7)	1276.2 (910.1, 1996.4)	
Crude (matched) ^a model	1 (Ref.)	0.40 (0.25–0.63)	0.46 (0.29–0.71)	0.49 (0.31–0.76)	<.01
Model 1	1 (Ref.)	0.43 (0.27–0.69)	0.46 (0.30–0.73)	0.52 (0.33–0.81)	<.01
Model 2	1 (Ref.)	0.45 (0.29–0.72)	0.58 (0.37–0.91)	0.63 (0.40–0.98)	.05
sCD163, median (IQR), ng/mL	134.0 (108.5, 155.3)	195.0 (184.2, 207.7)	258.8 (245.1, 284.7)	401.6 (334.1, 494.8)	
Crude (matched) ^a model	1 (Ref.)	1.01 (0.69–1.76)	1.04 (0.66–1.65)	1.07 (0.66–1.72)	.82
Model 1	1 (Ref.)	1.15 (0.72–1.83)	0.94 (0.58–1.49)	1.06 (0.64–1.73)	.99
Model 2	1 (Ref.)	1.15 (0.72–1.84)	0.93 (0.58–1.50)	1.07 (0.65–1.75)	.99
sCD163/sTWEAK ratio, median (IQR)	0.16 (0.10, 0.20)	0.31 (0.28, 0.35)	0.48 (0.43, 0.56)	0.98 (0.77, 1.28)	
Crude (matched) ^a model	1 (Ref.)	1.26 (0.79–2.02)	0.94 (0.57–1.53)	1.67 (1.06–2.63)	.05
Model 1	1 (Ref.)	1.21 (0.75–1.95)	0.92 (0.56–1.52)	1.65 (1.04–2.61)	.05
Model 2	1 (Ref.)	1.25 (0.76–2.05)	0.98 (0.58–1.65)	1.52 (0.94–2.46)	.12

Results are expressed as matched ORs (95% CI), unless otherwise specified.

^a Matched for dietary intervention group (MedDiet supplemented with olive oil, MedDiet supplemented with nuts or control group), age (≤ 67 vs > 67 yr), sex, and BMI (≤ 27 vs > 27 kg/m²).

Model 1: Adjusted for family history of diabetes (yes/no); educational level (primary education/illiterate vs secondary/higher education); alcohol consumption (≥ 3 standard drink units for men, ≥ 1.5 for women, or less than these amounts); smoking (current/not current); physical activity (sedentary vs active); and MedDiet score (0–14).

Model 2: Further adjusted for MetS components—waist circumference > 102 cm in men/ > 88 cm in women (yes/no); serum triglyceride ≥ 150 mg/dL (yes/no); HDL-cholesterol < 40 mg/dL in men/ < 50 mg/dL in women (yes/no); high blood pressure ($\geq 130/85$ mm Hg) or medication use (yes/no); fasting plasma glucose level ≥ 100 mg/dL (yes/no); and fasting insulin levels (\log_e -transformed continuous variable).

with sTWEAK concentrations, the sCD163/sTWEAK ratio was borderline significantly associated with diabetes incidence, in both crude and adjusted model 1 (*P* for linear trend = .05, both). This association disappeared after adjustment for other MetS components and insulin concentrations as confounders.

Discussion

In this large prospective nested case-control study conducted in participants in the PREDIMED study, we used fully adjusted analyses to show that those individuals in the highest baseline quartile of sTWEAK concentrations had a 37% lower risk of eventually developing T2D than those in the lowest quartile. Thus, decreased serum levels of sTWEAK are significantly and independently associated with an increased risk of T2D. These findings highlight a possible role of sTWEAK on the pathogenesis of T2D.

As far as we know, there is no prospective epidemiological evidence to suggest that serum sTWEAK concentrations are linked to diabetes incidence. However, some cross-sectional studies point to a link between sTWEAK

concentrations and diabetes (11, 12). Thus, in a recently published case-control study, T1D patients showed decreased concentrations of serum sTWEAK compared with controls (11). In this context, Kralisch et al (12) determined sTWEAK serum concentrations in 60 chronic hemodialysis patients (32 had T2D) and 60 controls (30 had T2D). In that study, mean serum sTWEAK concentrations were significantly decreased in those individuals with T2D or hemodialysis and were lowest in subjects with both conditions (12). These data are in agreement with the results of our study, which indicate that decreased serum concentrations of sTWEAK could be viewed as a surrogate biomarker for T2D.

In accordance with previous reports on glucose metabolism (12, 13, 26), in our study serum sTWEAK concentrations were inversely associated with HOMA-IR levels, independently of the case-control status. Elucidating the mechanisms responsible for improvement of insulin sensitivity might enhance the understanding of the pathophysiology of T2D, being a prerequisite for the development of preventive strategies. Thus, taking into account these data altogether, the sTWEAK may be considered as

an indicative biomarker for obesity-associated insulin resistance, which can be measured easily in blood samples and may prove to be of clinical value for the early identification of individuals at risk of diabetes.

There is no consensus as to whether there are sex differences in the peripheral blood levels of sTWEAK. The results of our study agree with those of previous reports, which show that females had higher concentrations of sTWEAK than males (12, 27) and, therefore, that there may be a sex dimorphism. Smokers in our study showed decreased peripheral concentrations of sTWEAK. The negative association between smoking and sTWEAK has also been recently observed by our research group in individuals with T1D (11). However, the potential influence of smoking on the sTWEAK concentration appears to be a complex issue that remains to be fully elucidated. Cigarette smoke-mediated oxidative stress will induce an inflammatory response, which leads to producing proinflammatory, chemotactic mediators and oxygen radicals (28). TWEAK has been proposed to be evolved as a protection against the development of potential harmful inflammatory responses (29). Furthermore, it has also been reported that under proinflammatory conditions, TWEAK expression is down-regulated (30). Therefore, we can speculate that smoking could decrease TWEAK levels, inducing an inflammatory response and thus increasing the risk of diabetes as observed in our study.

In our study, we found that decreased concentrations of sTWEAK were related not only to insulin resistance and diabetes, but also to the MetS, a cluster of metabolic abnormalities that increases the risk of CVD (31). Thus, the results of our study are in accordance with those of other studies that demonstrate an association between low sTWEAK concentrations and the risk of CVD (32, 33).

Although our data support the existence of etiological associations, the biological mechanisms through which low circulating levels of sTWEAK increase the risk of diabetes remain speculative and require further study. TWEAK is a multifunctional cytokine whose effects depend on the type of cell and the stage of the disease (9). Recently, we have demonstrated that the TWEAK/Fn14 axis may be a new component of the network that participates in the inflammatory imbalance of the pathogenesis of insulin resistance in obesity and T2D (34). Interestingly, TWEAK acts by binding to Fn14, a highly inducible cell-surface receptor that is linked to several intracellular signaling pathways, including the nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway, which is associated with its proinflammatory effect (35–37). In addition, several studies have demonstrated that in both monocytes and adipocytes from patients with obesity or T2D, the activation of the proinflammatory transcription factor NF- κ B can release

proinflammatory mediators that may interfere with insulin signaling and cause insulin resistance (35, 37–39). On the other hand, it has been demonstrated that Fn14 expression was up-regulated in human adipose tissues in severe obesity and that the presence of T2D did not affect the expression of TWEAK according to the obesity status (36). However, Fn14 expression was increased mainly in morbidly obese T2D women (34). Thus, the decreased concentrations of sTWEAK in those participants who developed T2D (96% of whom were obese) observed in our study may reflect the uptake of this molecule by its receptor (Fn14), which leads to peripheral decreased serum concentrations. Our study found no relation between the serum concentrations of sTWEAK and sCD163. Despite this, it is also possible that sTWEAK levels may also be decreased by clearance via its scavenger receptor CD163. In fact, previous data from other groups have shown that CD163-expressing macrophages can sequester and internalize sTWEAK, thus leading to reduced serum concentrations (40, 41).

In the present study, serum sCD163 concentrations are not a useful marker for T2D. This contrasts with results reported by Møller et al (19) in a general population. Differences in the design and the study population could explain the discrepancies between the results. Our population was older and at higher cardiovascular risk than the population of the Copenhagen City Heart Study (CCHS) enrolled from the general population and aged 20 years and older. More importantly, data on fasting glucose measurements at baseline were not available in the CCHS, so adjustments could not be made for glucose, an important predictor of diabetes that tends to attenuate the association between sCD163 and diabetes. Importantly, in our study we also observed a significant direct association between sCD163 concentrations and HOMA-IR in the whole population, which suggests a direct relationship between the level of insulin resistance and the peripheral concentrations of this molecule, as shown in previously reported studies (17, 18).

Finally, some authors have demonstrated a relationship between the sCD163/sTWEAK ratio and the presence of atherosclerotic diseases (40, 41), suggesting that this ratio could be a biomarker of clinical and subclinical atherosclerosis. To the best of our knowledge, our study is the first to have tested the extent to which this ratio can be considered a biomarker of diabetes risk. Although the sCD163/sTWEAK ratio was associated with HOMA-IR, it was not found to be independently associated with the risk of diabetes.

We are aware that our study has limitations, but it also has strengths that should be mentioned. First, a major limitation is that the population studied was composed of

elderly individuals with insulin resistance or other CVD risk factors. Therefore, our findings cannot be extrapolated to young and healthy individuals. Another limitation of our study is inherent to the study design. In nested case-control studies, nondiseased persons from whom the controls are selected may not be fully representative of the original cohort. So, it will be important in the future to assess prospectively the association between serum levels of both biomarkers and risk of developing T2D in other cohorts assessing all the cohort members at baseline. One of the strengths of our study over previous studies is that the diagnosis of diabetes was not self-reported and was verified by a second analytical test, thus making the identification of new incident cases more reliable. In addition, in our study, cases were ascertained by an independent Clinical End-Point Adjudication Committee, whose members were unaware of the study-group assignments and other clinical data. Other strengths of our study include the relatively large number of incident cases, a long follow-up period, inclusion of individuals of both sexes, and detailed standardized assessment of and control for a large number of potential confounding variables.

In summary, in the present study we demonstrated that decreased serum levels of sTWEAK are independently associated with T2D development. Further studies are warranted to confirm these findings in different populations and to elucidate the mechanisms explaining these findings.

Acknowledgments

The authors thank the participants for their enthusiastic collaboration, the PREDIMED personnel for excellent assistance, and the personnel of all affiliated primary care centers. We thank Joan Vila from the Institut Municipal d'Investigació Mèdica for his statistical assessment.

Address all correspondence and requests for reprints to: Jordi Salas-Salvadó, Human Nutrition Unit, Faculty of Medicine and Healthy Sciences, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç, 21, 43201 Reus, Spain. E-mail: jordi.salas@urv.cat. Or Matilde R. Chacón, Research Unit, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, c/o Dr Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain. E-mail: mrodriguez.hj23.ics@gencat.cat.

Clinical Trial Registry no. ISRCTN35739639.

This study was funded in part by the Spanish Ministry of Health (ISCIII), PI11/00049, PI1001407, G03/140, RD06/0045, FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional). None of the funding sources played a role in the design, collection, analysis, or interpretation of the data or in the decision to submit the manuscript for publication. The Human Nutrition Unit belongs to the Centre Català de la Nutrició, Institut d'Estudis Catalans, Catalunya. M.R.C. is supported by a research stabilization program (CP06/00119) from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), cofinanced by the Institut Català de Salut (ICS) from

Catalonia. CIBERobn and CIBERDEM is an initiative of ISCIII, Madrid, Spain.

A.D.-L. and J.S.-S. had full access to all the data in the study and take full responsibility for the integrity and accuracy of the data analysis. Author contributions included: study concept and design—M.A.M.-G., M.-I.C., R.E., and J.S.-S.; analysis and interpretation of data—A.D.-L., M.B., E.M.-M., M.R.C., J.V., and J.S.-S.; drafting of the manuscript—A.D.-L. and J.S.-S.; statistical analysis—A.D.-L., M.B., and J.S.-S. All authors critically revised and approved the final version of the manuscript.

Disclosure Summary: The authors have no conflict of interest affecting the conduct or reporting of the work submitted.

References

1. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87:4–14.
2. Roglic G, Unwin N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87:15–19.
3. Sanada H, Yokokawa H, Yoneda M, et al. High body mass index is an important risk factor for the development of type 2 diabetes. *Intern Med.* 2012;51:1821–1826.
4. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280:E745–E751.
5. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haefen TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005;365:1333–1346.
6. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116:1793–1801.
7. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:3171–3182.
8. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:32401–32410.
9. Burkly LC, Michaelson JS, Hahm K, Jakubowski A, Zheng TS. TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine.* 2007;40:1–16.
10. Wiley SR, Winkles JA. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:2412–2449.
11. Llauro G, Gonzalez-Clemente JM, Mayo-Masip E, Subias D, Vendrell J, Chacon MR. Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: relationship with cardiovascular risk factors. A case-control study. *PLoS One.* 2012;7:e43919.
12. Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, et al. Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis.* 2008;199:440–444.
13. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, et al. Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:916–922.
14. Bover LC, Cardó-Vila M, Kuniyasu A, et al. A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J Immunol.* 2007;178:8183–8194.
15. Moller HJ, Peterslund NA, Graversen JH, Moestrup SK. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood.* 2002;99:378–380.
16. Axelsson J, Møller HJ, Witasap A, et al. Changes in fat mass correlate

- with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD. *Am J Kidney Dis*. 2006;48:916–925.
17. Zanni MV, Burdo TH, Makimura H, Williams KC, Grinspoon SK. Relationship between monocyte/macrophage activation marker soluble CD163 and insulin resistance in obese and normal-weight subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77:385–390.
 18. Parkner T, Sørensen LP, Nielsen AR, et al. Soluble CD163: a biomarker linking macrophages and insulin resistance. *Diabetologia*. 2012;55:1856–1862.
 19. Møller HJ, Frikke-Schmidt R, Moestrup SK, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Serum soluble CD163 predicts risk of type 2 diabetes in the general population. *Clin Chem*. 2011;57:291–297.
 20. Martínez-González MÁ, Corella D, Salas-Salvadó J, et al. Cohort profile: design and methods of the PREDIMED study. *Int J Epidemiol*. 2012;41:377–385.
 21. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013;368:1279–1290.
 22. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013;36(suppl 1):S67–S74.
 23. Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E. Validation of the Minnesota leisure time physical activity questionnaire in Spanish men. The MARATHOM Investigators. *Am J Epidemiol*. 1994;139:1197–1209.
 24. Schröder H, Fitó M, Estruch R, et al. A short screener is valid for assessing Mediterranean diet adherence among older Spanish men and women. *J Nutr*. 2011;141:1140–1145.
 25. Redon J, Coca A. Guidelines for the diagnosis, evaluation and treatment of hypertension: the point of view of the Spanish Society of Hypertension [in Spanish]. *Med Clin (Barc)*. 2003;121:739–740.
 26. Yilmaz MI, Carrero JJ, Ortiz A, et al. Soluble TWEAK plasma levels as a novel biomarker of endothelial function in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:1716–1723.
 27. Chorianopoulos E, Jarr K, Steen H, Giannitsis E, Frey N, Katus HA. Soluble TWEAK is markedly upregulated in patients with ST-elevation myocardial infarction and related to an adverse short-term outcome. *Atherosclerosis*. 2010;211:322–326.
 28. Gonçalves RB, Coletta RD, Silvério KG, et al. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res*. 2011;60:409–424.
 29. Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, et al. TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell*. 2005;123:931–944.
 30. Chicheportiche Y, Fossati-Jimack L, Moll S, Ibnou-Zekri N, Izui S. Down-regulated expression of TWEAK mRNA in acute and chronic inflammatory pathologies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279:162–165.
 31. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112:2735–2752.
 32. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Carrero JJ, et al. Vascular proteomics and the discovery process of clinical biomarkers: the case of TWEAK. *Proteomics Clin Appl*. 2011;5:281–288.
 33. Yilmaz MI, Sonmez A, Ortiz A, et al. Soluble TWEAK and PTX3 in nondialysis CKD patients: impact on endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:785–792.
 34. Chacón MR, Richart C, Gómez JM, et al. Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine*. 2006;33:129–137.
 35. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:411–425.
 36. Vendrell J, Maymó-Masip E, Tinahones F, et al. Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:2983–2992.
 37. Zhong L, Luo Y, Huang C, Liu L. Effect of NF- κ B decoy on insulin resistance of adipocytes from patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab*. 2011;37:520–526.
 38. Austin RL, Rune A, Bouzakri K, Zierath JR, Krook A. siRNA-mediated reduction of inhibitor of nuclear factor- κ B kinase prevents tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetes*. 2008;57:2066–2073.
 39. Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK β /I κ B/NF- κ B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27(suppl 3):S49–S52.
 40. Urbonaviciene G, Martín-Ventura JL, Lindholt JS, et al. Impact of soluble TWEAK and CD163/TWEAK ratio on long-term cardiovascular mortality in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*. 2011;219:892–899.
 41. Moreno JA, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, et al. The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009;207:103–110.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

Publicación 2.

Título: *Reduced circulating sTWEAK levels are associated with metabolic syndrome in elderly individuals at high cardiovascular risk.*

Autores: Díaz-López A, Bulló M, Chacón MR, Estruch R, Vendrell J, Díez-Espino J, Fitó M, Corella D, Salas-Salvadó J.

Año: 2014

Revista: Cardiovasc Diabetol

Volumen: 13

Páginas: 51

PMID: 2456471

Factor de impacto: 4,015

Resumen:

Introducción y objetivo: Recientemente, se ha descrito al sTWEAK como una citocina implicada en la modulación de procesos inflamatorios y aterogénicos relacionados con el riesgo cardiometabólico. El presente estudio se realizó con el objetivo de analizar la asociación entre las concentraciones séricas de sTWEAK y prevalencia del síndrome metabólico (SM), y sus componentes en individuos de edad avanzada con alto riesgo cardiovascular.

Diseño, escenario y participantes: Se realizó un análisis transversal con 452 individuos no diabéticos — hombres y mujeres con un rango de edad entre 55 y 80 años — con alto riesgo cardiovascular reclutados en el estudio PREDIMED, de los cuales 234 fueron diagnosticados de SM. El diagnóstico de SM se definió en base a los criterios armonizados actualizados de la IDF-AHA/NHLBI en el año 2009. Se utilizaron análisis de regresión logística para estimar las Odds Ratios (ORs) para el SM y sus componentes según los terciles de las concentraciones séricas de sTWEAK determinadas mediante kits ELISA.

Publicaciones

Resultados: Los sujetos con diagnóstico de SM presentaron menores concentraciones séricas circulantes de sTWEAK que aquellos sujetos sin SM. Los análisis de regresión ajustados por edad y sexo, mostraron que aquellos sujetos localizados en el tercil más bajo de las concentraciones séricas del sTWEAK presentaron un mayor riesgo de tener SM [OR: 1,71 (IC de 95%, 1,07-2,72)], y un mayor riesgo de tener obesidad abdominal [2,01 (1,15-3,52)], hiperglucemia [1,94 (1,20-3,11)], e hipertrigliceridemia [1,73 (1,05-2,82)], con respecto aquellos sujetos situados en tercil superior. Estas asociaciones persistieron después de controlar por factores de confusión tales como antecedentes familiares de diabetes, enfermedad coronaria prematura, factores de estilo de vida, función renal y otros componentes del SM. Las concentraciones séricas de sTWEAK fueron significativamente más bajas a medida que aumentaba el número de componentes del SM. Aquellos sujetos localizados en el tercil más bajo de las concentraciones séricas de sTWEAK presentaron un mayor riesgo de tener un mayor número de componentes del SM respecto aquellos sujetos localizados en el tercil superior. Las ORs ajustadas para sujetos con 2 vs ≤ 1 , 3 vs ≤ 1 , y ≥ 4 vs ≤ 1 componentes del SM fueron 2,60 (01,09-06,22), 2,83 (1,16-6,87) y 6,39 (2,42-16,85), respectivamente.

Conclusión: En pacientes de edad avanzada con alto riesgo cardiovascular, unos niveles séricos bajos de sTWEAK se asociaron con una mayor prevalencia de SM; siendo la obesidad abdominal, la hipertrigliceridemia y la hiperglucemia los principales contribuyentes de esta asociación. Estos resultados sugieren que los niveles circulantes de sTWEAK podrían desempeñar un papel modulador de estas alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad y el riesgo de DMT2 y enfermedad cardiovascular.

ORIGINAL INVESTIGATION

Open Access

Reduced circulating sTWEAK levels are associated with metabolic syndrome in elderly individuals at high cardiovascular risk

Andrés Díaz-López^{1,2}, Mònica Bulló^{1,2}, Matilde R Chacón³, Ramón Estruch^{2,4}, Joan Vendrell³, Javier Díez-Espino⁵, Montserrat Fito^{2,6}, Dolores Corella⁷ and Jordi Salas-Salvadó^{1,2*}

Abstract

Background: The circulating soluble TNF-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) is a cytokine that modulates inflammatory and atherogenic reactions related to cardiometabolic risk. We investigated the association between sTWEAK levels and metabolic syndrome (MetS) and its components in older subjects at high cardiovascular risk.

Methods: Cross-sectional analysis of 452 non-diabetic individuals (men and women aged 55–80 years) at high cardiovascular risk. MetS was defined by AHA/NHLBI and IDF criteria. Logistic regression analyses were used to estimate odds ratios (ORs) for MetS and its components by tertiles of serum sTWEAK concentrations measured by ELISA.

Results: sTWEAK concentrations were lower in subjects with MetS than in those without. In gender- and age-adjusted analyses, subjects in the lowest sTWEAK tertile had higher ORs for overall MetS [1.71 (95% CI, 1.07-2.72)] and its components abdominal obesity [2.01 (1.15-3.52)], hyperglycemia [1.94 (1.20-3.11)], and hypertriglyceridemia [1.73 (1.05-2.82)] than those in the upper tertile. These associations persisted after controlling for family history of diabetes and premature coronary heart disease, lifestyle, kidney function and other MetS components. sTWEAK concentrations decreased as the number of MetS components increased. Individuals in the lowest vs the upper sTWEAK tertile had an increased risk of disclosing greater number of MetS features. Adjusted ORs for individuals with 2 vs ≤ 1 , 3 vs ≤ 1 , and 4 vs ≤ 1 MetS components were 2.60 (1.09-6.22), 2.83 (1.16-6.87) and 6.39 (2.42-16.85), respectively.

Conclusion: In older subjects at high cardiovascular risk, reduced sTWEAK levels are associated with MetS: abdominal obesity, hypertriglyceridemia and hyperglycemia are the main contributors to this association.

Keywords: sTWEAK, Metabolic syndrome, Cardiovascular risk, Biomarkers, Insulin resistance

Background

The TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a molecule of the TNF superfamily [1,2]. It is initially expressed as a type-II trans-membrane protein (mTWEAK), but a smaller biologically active form can also be shed into the circulation as a soluble form (sTWEAK). TWEAK is ubiquitously expressed in a variety of organs, tissues and cell types, with high levels in heart, brain, pancreas,

skeletal muscle and adipose tissues, and lower levels in liver and kidney. The binding of sTWEAK to its receptor, the fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14), mediates multiple biological effects, including proinflammatory cytokine induction, angiogenesis, and the regulation of cell survival, proliferation and death [3,4].

In recent years, cross-sectional studies investigating the associations between sTWEAK and diseases and/or metabolic disorders have been widely reported. In this context, Blanco-Colio et al. reported lower levels of sTWEAK in patients with atherosclerosis and a negative correlation between circulating TWEAK levels and the intima/media thickness in asymptomatic subjects [5]. Similarly, circulating sTWEAK levels have been found to

* Correspondence: jordi.salas@urv.cat

¹Human Nutrition Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç, 21, Reus, Tarragona 43201, Spain

²CIBERobn Physiopathology of Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

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

be reduced in various cardiovascular and metabolic disorders [6-11]. Decreased sTWEAK levels have also been related to a higher risk of endothelial dysfunction in subjects with chronic kidney disease [12], and to long-term cardiovascular mortality in patients with peripheral artery disease (PAD) [13]. And circulating sTWEAK concentrations have been negatively correlated with such other laboratory and clinical parameters as fasting plasma glucose levels, insulin resistance assessed by homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and systolic or diastolic blood pressure in patients with type 2 diabetes (T2D) and in chronic kidney disease [10,14]. Finally, our group has demonstrated that patients with type 1 diabetes (T1D) had lower sTWEAK levels than healthy subjects [15], and a negative association between sTWEAK levels, glucose metabolism-related parameters and T2D incidence has been reported [16].

To date, the relationship between circulating sTWEAK levels and Metabolic Syndrome (MetS) has not been explored. Based on recent researches, we hypothesized that low serum sTWEAK levels are associated with MetS, a common metabolic disorder, resulting from abdominal obesity and insulin resistance [17]. Thus, the present study aimed to explore whether circulating sTWEAK concentrations are associated with MetS and its individual components in elderly subjects at high cardiovascular risk.

Methods

Study design and participants

The present cross-sectional study was carried out on 452 Caucasian individuals at high risk for coronary heart disease (CHD), recruited by their medical practitioners from three Spanish centers (Reus, Barcelona and Pamplona) within the framework of the PREDIMED study [18], which were randomly selected from those without diabetes at baseline. The participants studied were community-dwelling men and women aged 55–80 years. The exclusion criteria included: prior cardiovascular disease (CVD) (including coronary heart disease [angina, myocardial infarction, coronary revascularization procedures or existence of abnormal Q waves in the electrocardiogram], stroke [either ischemic or hemorrhagic, including transient ischemic attacks], or clinical peripheral artery disease with symptoms of intermittent claudication), prevalent diabetes or treatment with insulin or oral hypoglycemic drugs, immunodeficiency or HIV-positive status, illegal drug use or chronic alcoholism, and/or body mass index (BMI) >40 kg/m². All participants had at least three of the following cardiovascular risk factors: smoking, hypertension (systolic blood pressure ≥140 mmHg or diastolic blood pressure ≥90 mmHg or under antihypertensive medication), high low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol (≥160 mg/dl), low high-density lipoprotein (HDL)-

cholesterol (≤40 mg/dl independently of lipid-lowering therapy), overweight/obesity (BMI ≥25 kg/m²), or family history of early-onset CHD.

The study was conducted in agreement with the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the institutional review boards of the three centers involved, and all subjects agreed to participate in the study and gave their informed consent.

Clinical and anthropometric information

Medical information was collected on subjects' medical record of a 47-item questionnaire about education, lifestyle, history of illnesses and medication use. We also administered a semiquantitative 137-item validated food frequency questionnaire [19] and a validated Spanish version of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire to assess physical activity [20]. In addition, anthropometric variables such as weight, height and waist circumference (midway between the lower rib and the superior border of the iliac crest) and blood pressure measured in triplicate using a validated semi-automatic oscillometer (Omron HEM-705CP, Hoofddorp, Netherlands) were determined by trained staff [21].

Laboratory measurements

Blood samples were collected from all participants after an overnight fast. The aliquots of serum and EDTA plasma were immediately processed at 4°C, coded, and shipped to a central laboratory in a portable cooler, and stored at -80°C until analysis. The time between blood sampling and freezing was less than one hour. Plasma levels of fasting glucose and serum levels of total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides were measured by routine laboratory tests using standard enzymatic methods. LDL-cholesterol concentrations were calculated using Friedewald's equation. Serum and urinary creatinine, and urinary albumin concentrations were determined by the modified Jaffé colorimetric method and by the Bromocresol green albumin (BCG) method, respectively.

The urinary albumin (mg/L)-to-creatinine (mg/dL) ratio (ACR) was calculated and is reported in milligrams per gram. On the basis of serum creatinine concentration measurements, the glomerular filtration rate was estimated (eGFR) by the CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) equation for Caucasians [22] as a measure of kidney function. sTWEAK concentrations were determined in duplicate, in serum samples that had never suffered any previous thaw cycle, by ELISA using the commercially available, human TWEAK/TNFSF12 kit #DY1090 (R&D Systems Europe, Abingdon, Oxon, UK). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.5% and 7.0%, respectively.

Definition of metabolic syndrome

The definition of MetS that we used was the new one by the International Diabetes Federation (IDF) and the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute (AHA/NHLBI), which has harmonized previous definitions [23]. According to this definition, a diagnosis of MetS requires the presence of at least three of the following five components or risk factors: (1) abdominal obesity measured by waist circumference according to different ethnic groups by gender; (2) hypertension (systolic and/or diastolic blood pressures $\geq 130/85$ mmHg or antihypertensive drug treatment); (3) low HDL-cholesterol levels [fasting serum HDL-cholesterol levels < 40 mg/dL (1.03 mmol/L) in men and < 50 mg/dL (1.3 mmol/L) in women or drug treatment for reduced HDL-C; (4) hypertriglyceridemia [fasting serum triglycerides ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) or taking triglyceride-lowering medication]; and (5) hyperglycemia [fasting plasma glucose level ≥ 100 mg/dL (≥ 5.5 mmol/L) or drug treatment for elevated glucose levels].

Statistical analysis

Analyses were performed using the SPSS software version 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). General characteristics of the study population are presented by MetS status and were compared using independent *t*-tests for continuous variables and Pearson χ^2 tests for dichotomous variables. The distribution of variables was tested using the Kolmogorov–Smirnov tests. Skewed variables (sTWEAK, triglyceride and plasma fasting glucose levels) were log_e-transformed prior to statistical analyses to approximate a normal distribution. All the data are presented either as means \pm standard deviation (SD) for symmetric continuous variables, median and inter quartile range for skewed continuous variables, or numbers and percentages for dichotomous variables. Age- and gender-adjusted partial Pearson correlation analysis was used to study the relationships between serum sTWEAK concentration and each of the MetS components (all as continuous variables).

Binary logistic regression analysis was used to estimate the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CI) for the prevalence of MetS, its components separately, and the MetS score [sum of MetS components for each individual (≤ 1 to ≥ 4)] by sTWEAK tertiles. The upper sTWEAK tertile was considered as the reference category. For the regression analyses several models were fitted, controlling for the following potential confounders: Model 1 was adjusted for gender and age. Model 2 was additionally adjusted for family history of diabetes and premature CHD (yes/no), educational level (primary education vs secondary/higher education), alcohol intake (g/d), smoking (current/not current), physical activity [sedentary (≤ 200 METs-min/d) vs active (> 200 METs-min/d)] and eGFR. A third model was also fitted

to assess the associations between tertiles of sTWEAK concentrations and each individual component of the MetS. This model was additionally adjusted for the above-mentioned model 2 and for the other components of MetS as dichotomized variables (model 3). Effect modification by gender was evaluated and tested by adding the product term of serum sTWEAK concentration*gender to the univariate model. The models were not stratified by gender because no significant interactions between sTWEAK and gender on MetS or its components were detected (all *P*-values > 0.05). Linear trend tests were calculated using the median serum sTWEAK concentrations of each category, which were then introduced into the models as a continuous variable. All statistical tests were two-tailed and the significance level was set at *P* < 0.05 .

Results

Table 1 presents the general characteristics of the study populations stratified by MetS status. In all the individuals (*n* = 452; mean age, 66 ± 6 year) – 214 men and 238 women – the prevalence of MetS was 51.8% (234/452). Those with MetS exhibited significantly higher mean BMI, waist circumference, and systolic and/or diastolic blood pressure than those without. They also had significantly higher levels of serum triglycerides and plasma glucose. In contrast, individuals with MetS had significantly lower HDL-cholesterol levels and serum sTWEAK concentrations than those subjects without MetS (Table 1). The age- and gender-adjusted partial correlation analysis in the whole population showed that sTWEAK concentrations were negatively related to waist circumference (*r* = -0.13 , *p* = 0.005), fasting plasma glucose (*r* = -0.16 , *p* < 0.001), and serum triglyceride levels (*r* = -0.10 , *p* = 0.03). No relationship between sTWEAK concentrations and HDL-cholesterol levels, or systolic and/or diastolic blood pressure was found (data not shown). We also used the same partial correlation analysis to assess the relationship between sTWEAK concentrations and such markers of kidney function as urinary ACR (ACR data was available for only 246 participants) and eGFR. No relationship was found between sTWEAK and ACR (*r* = 0.05; *P* = 0.42). However, a weak inverse relationship was observed between sTWEAK and eGFR (*r* = -0.14 ; *P* = 0.003). Even so, we included this variable in the model as a confounder.

Binary logistic regression analyses are reported in Tables 2, 3 and 4. The prevalence of MetS according to sTWEAK levels in the lowest, middle, and highest tertile decreased from 59.3 to 49.7 and 46.4%, respectively. In the crude analysis, individuals in the lower sTWEAK tertile had a significant higher risk of MetS than subjects in the upper tertile [OR, 1.69 (95% CI, 1.06 - 2.66); *P* for trend = 0.024]. After adjustments for relevant confounders (such as gender, age, family history of diabetes and premature CHD, education, smoking, alcohol intake,

Table 1 General characteristics of the study population stratified for the presence and absence of MetS

Baseline variable	MetS	Non-MetS	P value*
n	234	218	
Age, years	66 ± 6	67 ± 6	0.30
Men, % (n)	47 (103)	47 (111)	1.00
BMI, kg/m ²	30.6 ± 2.9	29.2 ± 3.0	<0.001
Overweight/obesity (BMI ≥25 kg/m ²), % (n)	97 (228)	94 (206)	0.14
Waist circumference, cm	102.6 ± 8.8	96.5 ± 9.8	<0.001
Smoking habits			
Current smoker, % (n)	23 (54)	22 (48)	0.82
Non-smoker, % (n)	77 (180)	78 (170)	
Physical activity, METS-min/d	255.2 ± 205.8	289.0 ± 265.0	0.13
Educational level			
Primary education, % (n)	69 (160)	71 (154)	0.61
Secondary or higher education, % (n)	31 (74)	29 (64)	
Family history of diabetes, % (n)	31 (73)	25 (55)	0.17
Family history of premature CHD, % (n)	16 (38)	18 (41)	0.49
Diastolic blood pressure, mmHg	88.6 ± 10.4	84.2 ± 10.0	<0.001
Systolic blood pressure, mmHg	155.5 ± 20.5	149.0 ± 19.2	<0.001
LDL-cholesterol, mg/dL	137.8 ± 32.2	140.6 ± 31.8	0.35
HDL-cholesterol, mg/dL	50.8 ± 12.0	59.4 ± 14.0	<0.001
Triglyceride, mg/dL [†]	159.0 (116.0, 208.0)	107.0 (82.0, 130.0)	<0.001
Fasting glucose, mg/dL [†]	105.3 (97.0, 117.6)	91.0 (86.0, 97.0)	<0.001
sTWEAK, pg/mL [†]	543.0 (367.3, 751.2)	595.6 (418.6, 844.5)	0.014
Urinary ACR (mg/g)	18.1 ± 31.9	12.7 ± 30.3	0.17
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	74.0 ± 14.9	75.5 ± 15.3	0.29
Metabolic syndrome components			
Abdominal obesity, % (n)	88 (207)	53 (115)	<0.001
Hyperglycemia, % (n)	69 (161)	10 (22)	<0.001
Hypertriglyceridemia, % (n)	60 (141)	6 (14)	<0.001
Low HDL-cholesterol level, % (n)	37 (88)	5 (12)	<0.001
Hypertension, % (n)	99 (233)	94 (206)	0.001

Data expressed as mean ± SD, or % (number). Abbreviations: MetS Metabolic Syndrome, BMI body mass index, METs Metabolic Equivalents, CHD coronary heart disease, LDL low-density lipoprotein, HDL high-density lipoprotein, sTWEAK soluble TNF-like weak inducer of apoptosis, ACR Albumin-creatinine ratio (ACR data was available only for 246 participants; n = 129 in MetS group and n = 117 in Non-MetS group), eGFR estimated glomerular filtration rate. [†]Values expressed as median with inter quartile range. *P value for comparisons between two groups was tested by χ^2 test for categorical variables or Student's t-test for continuous variables.

physical activity and eGFR) the magnitude of these associations did not appreciably change [1.85 (1.15 - 3.00); P for trend = 0.011]. A similar and significant inverse association between sTWEAK and prevalence of MetS was observed when the sTWEAK was analyzed as a continuous variable [1.49 (1.13 - 1.98) per unit decrease in estimated log sTWEAK] (Table 2).

Similarly, after adjusting for model 2 mentioned above, compared to the subjects in the upper sTWEAK tertile, those in the lower tertile had an increased risk of the abdominal obesity, hyperglycemia, and hypertriglyceridemia components of the MetS [2.03 (1.14 - 3.60), P for trend 0.013; 1.95 (1.20- 3.19), P for trend 0.007; 1.97 (1.18-3.30),

P for trend 0.041, respectively]. These associations were slightly attenuated but remained significant after additional adjustment for the others MetS components (model 3). Nevertheless, sTWEAK was not associated with the prevalence of such components of the MetS as low HDL-cholesterol and hypertension (Table 3).

A total of 13.7% of the total study population had one or no components of the MetS, 34.5% had two, 28.8% had three, and 23.0% had four or more. Serum sTWEAK concentrations decreased when the number of MetS components (MetS score) was increased. The median sTWEAK concentrations in the following categories: ≤1, 2, 3, and ≥4 MetS components were 615.6, 587.5, 555.7,

Table 2 Odds ratio and 95% CI for MetS according to tertiles of serum sTWEAK concentrations

No. of MetS/No. of non-MetS	Continuous [‡]	Tertiles of sTWEAK concentrations			P value for trend*
		1st tertile <453.1 ng/mL	2nd tertile 453.1 to 706.4 < ng/mL	3rd tertile ≥706.4 ng/mL	
Crude model	1.39 (1.06 - 1.82)	1.69 (1.06 - 2.66)	1.14 (0.73 - 1.79)	1.00 [Ref.]	0.024
Model 1	1.40 (1.07 - 1.84)	1.71 (1.07 - 2.72)	1.15 (0.72 - 1.82)	1.00 [Ref.]	0.022
Model 2	1.49 (1.13 - 1.98)	1.85 (1.15 - 3.00)	1.21 (0.75 - 1.94)	1.00 [Ref.]	0.011

Results expressed as odds ratios (95% CI) for MetS from logistic regression analysis. *Abbreviations:* MetS Metabolic Syndrome, sTWEAK soluble TNF-like weak inducer of apoptosis.

Crude model: unadjusted; Model 1: Adjusted for gender and age; Model 2: Additionally adjusted for family history of diabetes and premature CHD (yes/no), educational level (primary education vs secondary/higher education), alcohol intake (g alcohol/d), smoking (current/not-current), physical activity (sedentary vs active) and eGFR. [‡]Per unit decrease in log sTWEAK. *Linear trend tests were calculated using the median serum sTWEAK concentrations of each category and using them as a new continuous variable in the models.

and 522.1 pg/mL, respectively (P for trend = 0.001). Table 4 shows the ORs for the MetS score associated with the presence of two, three, and four or more MetS components compared with the presence of one or no components, according to sTWEAK tertiles. In the full model (model 2), individuals in the lowest vs the upper sTWEAK tertile had an increased risk of having a greater number of MetS components.

Discussion

In this cross-sectional study conducted on community-dwelling elderly subjects at high cardiovascular risk, we report for the first time that low sTWEAK concentrations were associated with increased risk of MetS, independent of several confounders. Abdominal obesity, hyperglycemia and hypertriglyceridemia were the main contributors to this association. These findings add new knowledge to the current scientific literature, and suggest that sTWEAK may have a role in metabolic disorders such as MetS.

Overall, almost all the available studies have confirmed that patients with CVD or CVD-related diseases have decreased sTWEAK concentrations. In previous studies, a reduced concentration of sTWEAK has been described in patients with such pathological conditions as chronic heart failure [6], coronary and peripheral arterial disease [7-9], hypertension [11], T1D and T2D, and/or end-stage renal failure [10,15,16]. These data are in agreement with the findings of our study, which indicated a link between low sTWEAK concentrations and MetS, a cluster of metabolic disorders which predispose to the development of T2D and atherosclerosis, and increase the risk of CVD [24]. In line with this, several authors have suggested that reduced levels of sTWEAK might serve as a novel biomarker of atherosclerosis [5,10]. In fact, it has recently been reported that low sTWEAK levels were associated with long-term cardiovascular mortality in symptomatic PAD patients [13], and could be considered as a predictor of future cardiovascular outcomes in non-dialysis CKD patients [25]. It is also important to mention

that in our study as the number of MetS components increased, the sTWEAK values gradually decreased. In keeping with these observations, we found that individuals with lower sTWEAK levels were more likely to have more MetS components. Thus, the consideration of sTWEAK as an indicative biomarker of risk factors for CVD is reinforced by our findings in MetS patients. Although our data support the possible existence of etiological associations, the biological mechanisms through which low sTWEAK levels were related to MetS remain speculative. Obesity-induced inflammation might be one of the mechanisms explaining the observed association in our study.

Vendrell et al. [26] reported that TWEAK and Fn14 gene expression were higher in the adipose tissue of severely obese patients than in controls, and that inflammatory stimuli in vitro induced by lipopolysaccharide and TNF α up-regulated TWEAK in THP-1 macrophages and Fn14 expression in SGBS adipocyte cells, respectively [26]. Despite the moderate inflammatory capacity of the sTWEAK cytokine over the adipocyte, a competitive interfering activity with TNF α signalling in the adipocyte has been described [27,28]. An imbalance of sTWEAK forms (membrane bound mTWEAK and soluble sTWEAK) in the obese state may help potentiate the inflammatory effect of TNF α over the adipocyte.

Our finding that lower sTWEAK concentrations were related with abdominal obesity agrees with the data obtained by Maymó-Masip et al. [27], which show that sTWEAK levels in severely obese patients are lower than in controls, and that their concentration increases after weight loss. This may suggest that sTWEAK plays an anti-inflammatory role in this setting, although additional in vivo and in vitro studies are required. Moreover, in the case of severely obese individuals they found that the main determinant of the sTWEAK circulating levels was BMI, in an inverse-dependent manner [27].

There is no clear explanation for the mechanisms leading to lower levels of sTWEAK in individuals with MetS. The rationale that low levels of sTWEAK, unlike other

Table 3 Odds ratio and 95% CI for the individual components of the MetS according to tertiles of serum sTWEAK concentrations

Effects on components of the MetS	Tertiles of sTWEAK concentrations			P value for trend*
	1st tertile <453.1 ng/mL	2nd tertile 453.1 to <706.4 ng/mL	3rd tertile ≥706.4 ng/mL	
Abdominal obesity				
No. abdominal obesity/No. non abdominal obesity	120/30	94/57	108/43	
Crude model	1.60 (0.93 - 2.71)	0.65 (0.40 - 1.06)	1.00 [Ref.]	0.091
Model 1	2.01 (1.15 - 3.52)	0.86 (0.51 - 1.43)	1.00 [Ref.]	0.012
Model 2	2.03 (1.14 - 3.60)	0.88 (0.52 - 1.47)	1.00 [Ref.]	0.013
Model 3	1.85 (1.03 - 3.33)	0.87 (0.51 - 1.47)	1.00 [Ref.]	0.036
Hyperglycemia				
No. hyperglycemia/No. non hyperglycemia	74/76	60/91	49/102	
Crude model	2.03 (1.27 - 3.23)	1.37 (0.86 - 2.19)	1.00 [Ref.]	0.003
Model 1	1.94 (1.20 - 3.11)	1.29 (0.80 - 2.09)	1.00 [Ref.]	0.006
Model 2	1.95 (1.20 - 3.19)	1.37 (0.84 - 2.24)	1.00 [Ref.]	0.007
Model 3	1.71 (1.04 - 2.83)	1.37 (0.82 - 2.27)	1.00 [Ref.]	0.037
Hypertriglyceridemia				
No. hypertriglyceridemia/No. nonhypertriglyceridemia	60/90	54/97	41/110	
Crude model	1.79 (1.10 - 2.90)	1.49 (0.92 - 2.46)	1.00 [Ref.]	0.021
Model 1	1.73 (1.05 - 2.82)	1.40 (0.85 - 2.31)	1.00 [Ref.]	0.031
Model 2	1.97 (1.18 - 3.30)	1.44 (0.86 - 2.42)	1.00 [Ref.]	0.010
Model 3	1.68 (1.02 - 2.79)	1.36 (0.82 - 2.26)	1.00 [Ref.]	0.041
Low HDL-cholesterol				
No. low HDL-cholesterol/No. non low HDL-cholesterol	31/119	31/120	38/113	
Crude model	0.77 (0.45 - 1.33)	0.76 (0.44 - 1.31)	1.00 [Ref.]	0.355
Model 1	0.81 (0.47 - 1.41)	0.81 (0.47 - 1.42)	1.00 [Ref.]	0.478
Model 2	0.86 (0.48 - 1.52)	0.82 (0.46 - 1.46)	1.00 [Ref.]	0.614
Model 3	0.67 (0.36 - 1.24)	0.71 (0.39 - 1.29)	1.00 [Ref.]	0.207
Hypertension				
No. hypertension/No. non hypertension	148/2	143/8	148/3	
Crude model	1.50 (0.25 - 9.10)	0.36 (0.09 - 1.39)	1.00 [Ref.]	0.697
Model 1	1.51 (0.25 - 9.30)	0.37 (0.09 - 1.47)	1.00 [Ref.]	0.653
Model 2	1.67 (0.25 - 11.26)	0.33 (0.08 - 1.36)	1.00 [Ref.]	0.619
Model 3	1.22 (0.18 - 8.42)	0.33 (0.07 - 1.41)	1.00 [Ref.]	0.929

Results expressed as odds ratios (95% CI) for MetS components from logistic regression analysis. *Abbreviations:* MetS Metabolic Syndrome, sTWEAK soluble TNF-like weak inducer of apoptosis.

Crude model: unadjusted; Model 1: Adjusted for gender and age; Model 2: Additionally adjusted for family history of diabetes and premature CHD (yes/no), educational level (primary education vs secondary/higher education), alcohol intake (g alcohol/d), smoking (current/not-current), physical activity (sedentary vs active) and eGFR; Model 3: Additionally adjusted for the presence of abdominal obesity (except for abdominal obesity), hyperglycemia (except for hyperglycemia), hypertriglyceridemia (except for hypertriglyceridemia), low HDL-cholesterol (except for low HDL-cholesterol), hypertension (except for hypertension). *Linear trend tests were calculated using the median serum sTWEAK concentrations of each category and using them as a new continuous variable in the models.

cytokines, appear to protect against pathological conditions associated with increased chronic inflammatory activity is incompletely understood. Several conceivable explanations have been proposed. For instance, sTWEAK may have a beneficial effect on the regulation of the immune response because it has been shown that TWEAK-deficiency in mice leads to overabundant natural killer

cells and hypersensitivity to bacterial endotoxin, with an excess of interferon- γ and IL-12 production from innate immune cells. Furthermore, sTWEAK inhibits the activation of the transcriptional stimulator signal transducer and activator of transcription (STAT)-1, and induces the association of p65 NF- κ B with histone deacetylase 1, thus repressing cytokine production [29]. A reduction of

Table 4 Odds ratio and 95% CI for MetS score (number of MetS components) according to tertiles of serum sTWEAK concentrations

MetS score	Tertiles of sTWEAK concentrations		
	1st tertile <453.1 ng/mL	2nd tertile 453.1 to <706.4 ng/mL	3rd tertile ≥706.4 ng/mL
Crude model:			
2 vs ≤1	2.15 (0.96 - 4.79)	0.96 (0.49 - 1.88)	1.00 [Ref.]
3 vs ≤1	2.42 (1.06 - 5.51)	1.11 (0.56 - 2.22)	1.00 [Ref.]
≥4 vs ≤1	3.88 (1.66 - 9.06)	1.11 (0.52 - 2.36)	1.00 [Ref.]
Model 1:			
2 vs ≤1	2.84 (1.22 - 6.62)	1.26 (0.62 - 2.58)	1.00 [Ref.]
3 vs ≤1	2.90 (1.23 - 6.81)	1.39 (0.66 - 2.90)	1.00 [Ref.]
≥4 vs ≤1	4.50 (1.87 - 10.82)	1.33 (0.61 - 2.93)	1.00 [Ref.]
Model 2:			
2 vs ≤1	2.60 (1.09 - 6.22)	1.24 (0.60 - 2.58)	1.00 [Ref.]
3 vs ≤1	2.83 (1.16 - 6.87)	1.45 (0.67 - 3.01)	1.00 [Ref.]
≥4 vs ≤1	6.39 (2.42 - 16.85)	1.92 (0.80 - 4.61)	1.00 [Ref.]

Results expressed as odds ratios (95% CI) for the number of MetS components from logistic regression analysis. Sample size of each group of MetS components score is as follows: ≤1, n = 62; 2, n = 156; 3, n = 130; ≥4, n = 104. *Abbreviations:* MetS Metabolic Syndrome, sTWEAK soluble TNF-like weak inducer of apoptosis. Crude model: unadjusted; Model 1: Adjusted for gender and age; Model 2: Additionally adjusted for family history of diabetes and premature CHD (yes/no), educational level (primary education vs secondary/higher education), alcohol intake (g alcohol/d), smoking (current/not-current), physical activity (sedentary vs active) and eGFR.

sTWEAK in serum, due to uptake by the Fn14 receptor, has also been postulated. Endothelial dysfunction is the initial pathophysiological step in the progression of vascular damage that precedes and leads to clinically visible CVD [30]. Under these conditions, Fn14 expression is increased in the endothelium. Recently, we reported increased Fn14 expression in human adipocytes from severely obese subjects [31]. These cells also showed an increase in Fn14 expression after inflammatory stimulation, thus increasing availability for the sTWEAK ligand, which could lead to a peripheral reduction in serum sTWEAK [26,27]. An alternative hypothesis proposes the involvement of CD163, a monocyte-macrophage surface receptor which seems to act as a scavenger receptor for sTWEAK [32]. Thus, the reduction in sTWEAK could be related to the presence of sCD163, which is up-regulated in patients with CKD and also in obese subjects [33-35]. This incremental increase could enable sTWEAK degradation by inflammatory macrophages, leading to decreased sTWEAK levels and the reduction in the sTWEAK/sCD163 ratio observed in such diseases as CKD [35]. Thus, low sTWEAK levels may be related to the degree of macrophage activation.

In our study, we found that reduced levels of sTWEAK were not only related to abdominal obesity, but also to

such other MetS components as hyperglycemia and hypertriglyceridemia. In this regard, we also found that in human studies, changes in circulating free fatty acids can influence circulating levels of sTWEAK, indicating that lipotoxicity could be an important factor that regulates sTWEAK levels in an inverse manner [27]. Our findings with regard to hyperglycemia are in line with previous studies reporting an inverse association between sTWEAK and such glucose metabolism-related parameters as fasting glucose and HOMA-IR [5,10,15,16]. In fact, impaired fasting plasma glucose levels are recognized risk factors for the development of T2D [36]. Interestingly, in a large prospective nested case-control study we found that reduced sTWEAK levels were associated with T2D incidence [16]. Consistent with our findings, in a study of 60 individuals with chronic hemodialysis (32 had T2D) and 60 controls (30 had T2D), the sTWEAK concentrations in T2D patients on hemodialysis were lower [10]. Conversely, in vitro studies showed that NF-κB activation affects TWEAK-induced insulin resistance by attenuating the action of insulin in hepatocytes [37]. Anyhow, in vivo experiments or animal models may help to clarify the effect of TWEAK on insulin resistance.

At the present time, how TWEAK binding to Fn14 can have such diverse cell-type specific biological effects is not understood, but the differential activation of intracellular signalling cascades is likely to be one explanation. TWEAK can have either positive (beneficial) or negative (detrimental) biological effects, depending on the type of cell, tissue injury and/or the stage of the disease [3,4].

Thus, considering these observations as a whole, we suggest that TWEAK contributes to the inflammatory/anti-inflammatory imbalance observed in obesity, particularly abdominal-visceral obesity and the insulin resistance state, and largely explains the association of TWEAK with hyperglycemia [38] and the future development of T2D. The examination of the biological mechanisms through which sTWEAK improves insulin sensitivity has demonstrated that, in visceral adipocytes, treatment with sTWEAK ameliorates TNFα-induced insulin resistance on glucose uptake [39,40]. This occurs because it abolishes the stimulatory effect of TNFα on JNK1/2 kinase, which is directly involved in the development of insulin resistance [41]. This effect is at least partly produced by a reduction in the cellular concentration of TRAF2, leading to a curbing of TNFα intracellular signalling events. Furthermore, this modulation of TNFα-induced changes in insulin sensitivity was found to be associated with an increase in the activity of PP2A, a Ser/Thr phosphatase, known to negatively regulate cytokine signaling [39]. Additionally, in human subcutaneous adipocytes, sTWEAK exerts a modulatory effect on TNFα-induced cytokine production by inhibiting the MAPK and NF-κB signalling cascades commonly used by TNFα [27].

This protective/modulatory effect of sTWEAK on TNF α activity has been observed in such pathologies as rheumatoid arthritis [42], ischemic stroke [43] and several tumour epithelial cell lines [44], suggesting general competitive behaviour between sTWEAK and TNF α .

Lower levels of sTWEAK have been reported in young individuals with primary hypertension [11]. However, our study conducted in an older population did not provide any evidence to support that reduced levels of sTWEAK are associated with hypertension. The fact that the majority of subjects (90%) were hypertensive might partly explain the lack of associations observed between sTWEAK and the hypertension component of the MetS.

Notwithstanding the results observed, we should point out that our study has several limitations that should be kept in mind. Firstly, a major limitation is that the population studied consisted of elderly Mediterranean Caucasian individuals at high risk for CVD, so our findings cannot be extrapolated to other age groups or ethnicities. Secondly, although rare, we could not completely discard the presence of coronary heart disease in our population explaining the associations observed, given that neither echocardiography nor stress testing were systematically performed in our cohort. Finally, another limitation of our study is inherent to the study design. Because of the cross-sectional nature, conclusions on a cause/effect relationship cannot be drawn.

In conclusion, in the present study we have demonstrated that low TWEAK concentrations are associated with increased risk of MetS, and this relationship was mainly mediated by abdominal obesity, hyperglycemia and hypertriglyceridemia. These findings suggest that sTWEAK may have a key role in the development of these metabolic disturbances, supporting the concept that sTWEAK may be considered as a potential novel biomarker of MetS with a putative protective effect. Further longitudinal studies are warranted to confirm these results in different populations.

Abbreviations

TWEAK: Soluble TNF-like weak inducer of apoptosis; mTWEAK: Full length TWEAK isoform; sTWEAK: Soluble TWEAK isoform; Fn14: Fibroblast growth factor-inducible 14; PAD: Peripheral artery disease; HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance; T1D: Type 1 diabetes; T2D: Type 2 diabetes; MetS: Metabolic syndrome; CHD: Coronary heart disease; CVD: Cardiovascular disease; BMI: Body mass index; LDL: Low-density lipoprotein; HDL: High-density lipoprotein; IDF: International Diabetes Federation; AHA/NHLBI: American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute; METs: Metabolic Equivalents; NF- κ B: Nuclear factor kappa B.

Competing interests

The authors have no conflict of interest affecting the conduct or reporting of the work submitted.

Authors' contributions

AD-L and JS-S had full access to all the data in the study and take full responsibility for the integrity and accuracy of the data analysis. *Study concept and design:* MAM-G, RE, and JS-S *Analysis and interpretation of data:* AD-L, MB, MRCH, JV, MAM-G, and JS-S *Drafting of the manuscript:*

AD-L, MRCH, and JS-S *Statistical analysis:* AD-L, MB, and JS-S *Critical revision of the manuscript for important intellectual content:* All authors critically revised and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

CIBERobn and CIBERdem is an initiative of ISCIII, Madrid, Spain. This study was funded in part by the Spanish Ministry of Health (ISCIII), PI11/00049, PI1001407, G03/140, RD06/0045, FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional). None of the funding sources played a role in the design, collection, analysis or interpretation of the data or in the decision to submit the manuscript for publication. The Human Nutrition Unit belongs to the Centre Català de la Nutrició, Institut d'Estudis Catalans, Catalonia. Matilde Rodríguez Chacon is supported by a research stabilization program (CP06/00119) from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), co-financed by the Institut Català de Salut (ICS) of Catalonia.

Author details

¹Human Nutrition Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç, 21, Reus, Tarragona 43201, Spain. ²CIBERobn Physiopathology of Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain. ³The Biomedical Research Centres Network for Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), University Hospital of Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain. ⁴Department of Internal Medicine, Hospital Clinic, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁵Primary Health Care Centre of Tafalla, Tafalla, Spain. ⁶Cardiovascular Risk and Nutrition Research Group (CARIN), Research Programme in Inflammatory and Cardiovascular Disorders (RICAD), IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain. ⁷Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

Received: 4 December 2013 Accepted: 20 February 2014

Published: 24 February 2014

References

- Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL: **TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis.** *J Biol Chem* 1997, **272**(51):32401–32410.
- Sanchez-Niño MD, Benito-Martin A, Gonçalves S, Sanz AB, Uceros AC, Izquierdo MC, Ramos AM, Berzal S, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A: **TNF superfamily: a growing saga of kidney injury modulators.** *Mediators Inflamm* 2010, doi:10.1155/2010/182958.
- Wiley SR, Winkles JA: **TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2003, **14**(3–4):241–249.
- Winkles JA: **The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting.** *Nat Rev Drug Discov* 2008, **7**(5):411–425.
- Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, Orbe J, Paramo JA, Michel JB, Ortiz A, Meilhac O, Egido J: **Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**(4):916–922.
- Chorianopoulos E, Rosenberg M, Zugck C, Wolf J, Katus HA, Frey N: **Decreased soluble TWEAK levels predict an adverse prognosis in patients with chronic stable heart failure.** *Eur J Heart Fail* 2009, **11**(11):1050–1056.
- Jelic-Ivanovic Z, Bujisic N, Spasic S, Bogavac-Stanojevic N, Spasojevic-Kalimanovska V, Kotur-Stevuljjevic J: **Circulating sTWEAK improves the prediction of coronary artery disease.** *Clin Biochem* 2009, **42**(13–14):1381–1386.
- Chorianopoulos E, Jarr K, Steen H, Giannitsis E, Frey N, Katus HA: **Soluble TWEAK is markedly upregulated in patients with ST-elevation myocardial infarction and related to an adverse short-term outcome.** *Atherosclerosis* 2010, **211**(1):322–326.
- Moreno JA, Dejouvencel T, Labreuche J, Smadja DM, Dussiot M, Martin-Ventura JL, Egido J, Gaussem P, Emmerich J, Michel JB, Blanco-Colio LM, Meilhac O: **Peripheral artery disease is associated with a high CD163/TWEAK plasma ratio.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**(6):1253–1262.
- Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lossner U, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M: **Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease.** *Atherosclerosis* 2008, **199**(2):440–444.

11. Karadurmus N, Tapan S, Cakar M, Naharci I, Celik T, Tasci I, Sayin S, Dogan T, Turker T, Erbil MK, Saglam K: **Lower plasma soluble TWEAK concentration in patients with newly diagnosed hypertension.** *Clin Invest Med* 2012, **35**(1):E20–E26.
12. Yilmaz MI, Carrero JJ, Ortiz A, Martin-Ventura JL, Sonmez A, Saglam M, Yaman H, Yenicesu M, Egido J, Blanco-Colio LM: **Soluble TWEAK plasma levels as a novel biomarker of endothelial function in patients with chronic kidney disease.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2009, **4**(11):1716–1723.
13. Urbonaviciene G, Martin-Ventura JL, Lindholt JS, Urbonavicius S, Moreno JA, Egido J, Blanco-Colio LM: **Impact of soluble TWEAK and CD163/TWEAK ratio on long-term cardiovascular mortality in patients with peripheral arterial disease.** *Atherosclerosis* 2011, **219**(2):892–899.
14. Hassan SB, El-demery AB, Ahmed AI, Abukhalil RE: **Soluble TWEAK and cardiovascular morbidity and mortality in chronic kidney disease patients.** *Arab J Nephrol Transplant* 2012, **5**(1):27–32.
15. Llaurodo G, Gonzalez-Clemente JM, Maymo-Masip E, Subias D, Vendrell J, Chacon MR: **Serum Levels of TWEAK and Scavenger Receptor CD163 in Type 1 Diabetes Mellitus: Relationship with Cardiovascular Risk Factors. A case-control Study.** *PLoS One* 2012, **7**(8):e43919.
16. Diaz-Lopez A, Maymo-Masip E, Bullo M, Chacon MR, Martinez-Gonzalez MA, Estruch R, Vendrell J, Basora J, Diez-Espino J, Covas MI, Salas-Salvado J: **Serum sTWEAK concentrations and risk of developing type 2 diabetes in a high cardiovascular risk population: a nested case-control study.** *J Clin Endocrinol Metab* 2013, **98**(8):3482–3490.
17. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R: **Metabolic syndrome a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation.** *Circulation* 2005, **111**(11):1448–1454.
18. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA, PREDIMED Study Investigators: **Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet.** *N Engl J Med* 2013, **368**(14):1279–1290.
19. Fernandez-Ballart JD, Pinol JL, Zazpe I, Corella D, Carrasco P, Toledo E, Perez-Bauer M, Martinez-Gonzalez MA, Salas-Salvado J, Martin-Moreno JM: **Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain.** *Br J Nutr* 2010, **103**(12):1808–1816.
20. Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E: **Validation of the Minnesota leisure time physical activity questionnaire in Spanish men. The MARATHOM investigators.** *Am J Epidemiol* 1994, **139**(12):1197–1209.
21. Redon J, Coca A: **Guidelines for the diagnosis, evaluation and treatment of hypertension: the point of view of the Spanish Society of Hypertension.** *Med Clin (Barc)* 2003, **121**(19):739–740.
22. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J, CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration): **A new equation to estimate glomerular filtration rate.** *Ann Intern Med* 2009, **150**(9):604–612.
23. Alberti K, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JJ, Donato KA, Fruchart J, James WPT, Loria CM, Smith SC: **Harmonizing the metabolic syndrome a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity.** *Circulation* 2009, **120**(16):1640–1645.
24. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, Montori VM: **Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies.** *J Am Coll Cardiol* 2007, **49**(4):403–414.
25. Yilmaz MI, Sonmez A, Ortiz A, Saglam M, Kilic S, Eyleten T, Caglar K, Oguz Y, Vural A, Çakar M: **Soluble TWEAK and PTX3 in nondialysis CKD patients: impact on endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2011, **6**(4):785–792.
26. Vendrell J, Maymo-Masip E, Tinahones F, García-España A, Megia A, Caubet E, García-Fuentes E, Chacon MR: **Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia.** *J Clin Endocrinol Metab* 2010, **95**(6):2983–2992.
27. Maymó-Masip E, Fernández-Veledo S, García-España A, Vázquez-Carballo A, Tinahones FJ, García-Fuentes E, Garrido-Sánchez L, Rodríguez MM, Vendrell J, Chacón MR: **The rise of soluble TWEAK levels in severely obese subjects after bariatric surgery May affect adipocyte-cytokine production induced by TNFα.** *J Clin Endocrinol Metab* 2013, **98**(8):E1323–E1333.
28. Tiller G, Fischer-Posovszky P, Laumen H, Finck A, Skurk T, Keuper M, Brinkmann U, Wabitsch M, Link D, Hauner H: **Effects of TWEAK (TNF superfamily member 12) on differentiation, metabolism, and secretory function of human primary preadipocytes and adipocytes.** *Endocrinology* 2009, **150**(12):5373–5383.
29. Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, Lawrence D, LeBlanc H, Lee W, Hurst S, Danilenko D, Li J, Filvaroff E: **TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity.** *Cell* 2005, **123**(5):931–944.
30. Vita JA, Keaney JF: **Endothelial function a barometer for cardiovascular risk?** *Circulation* 2002, **106**(6):640–642.
31. Chacon MR, Richart C, Gomez JM, Megia A, Vilarrasa N, Fernandez-Real JM, Garcia-Espana A, Miranda M, Masdevall C, Ricard W, Caubet E, Soler J, Vendrell J: **Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity.** *Cytokine* 2006, **33**(3):129–137.
32. Bover LC, Cardo-Vila M, Kuniyasu A, Sun J, Rangel R, Takeya M, Aggarwal BB, Arap W, Pasqualini R: **A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications.** *J Immunol* 2007, **178**(12):8183–8194.
33. Fjeldborg K, Christiansen T, Bennetzen M, Møller HJ, Pedersen SB, Richelsen B: **The macrophage specific serum marker, soluble CD163, is increased in obesity and reduced after dietary induced weight loss.** *Obesity* 2013. doi:10.1002/oby.20376. [Epub ahead of print].
34. Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Bindahman LS, Alkhalaf KM, Draz HM, Yakout S, McTernan PG, Sabico S, Chrousos GP: **Soluble CD163 is associated with body mass index and blood pressure in hypertensive obese Saudi patients.** *Eur J Clin Invest* 2012, **42**(11):1221–1226.
35. Valdivielso JM, Coll B, Martín-Ventura JL, Moreno JA, Egido J, Fernández E, Blanco-Colio LM: **Soluble TWEAK is associated with atherosclerotic burden in patients with chronic kidney disease.** *J Nephrol* 2013, **28**:0. doi:10.5301/jn.5000245. [Epub ahead of print].
36. Tirosh A, Shai I, Tekes-Manova D, Israeli E, Perog D, Shochat T, Kochba I, Rudich A: **Normal fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes in young men.** *N Engl J Med* 2005, **353**(14):1454–1462.
37. Feng F, Wang L, Albanese N, Holmes A, Xia P: **Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis attenuates the action of insulin in hepatocytes.** *Endocrinology* 2008, **149**(4):1505–1513.
38. Chu CS, Lee KT, Cheng KH, Lee MY, Kuo HF, Lin TH, Su HM, Voon WC, Sheu SH, Lai WT: **Postchallenge responses of nitrotyrosine and TNF-alpha during 75-g oral glucose tolerance test are associated with the presence of coronary artery diseases in patients with prediabetes.** *Cardiovasc Diabetol* 2012, **11**:21.
39. Vazquez-Carballo A, Ceperuelo-Mallafre V, Chacon MR, Maymo-Masip E, Lorenzo M, Porras A, Vendrell J, Fernandez-Veledo S: **Tweak prevents TNF-α-induced insulin resistance through PP2A activation in human adipocytes.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013, **305**(1):E101–112.
40. Leguisamo NM, Lehnen AM, Machado UF, Okamoto MM, Markoski MM, Pinto GH, Schaan BD: **GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome.** *Cardiovasc Diabetol* 2012, **11**:100.
41. Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Nieto-Vazquez I, Lorenzo M: **c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor-α induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists.** *J Clin Endocrinol Metab* 2009, **94**(9):3583–3593.
42. Yamana J, Morand EF, Manabu T, Sunahori K, Takasugi K, Makino H, Yamamura M: **Inhibition of TNF-induced IL-6 by the TWEAK-Fn14 interaction in rheumatoid arthritis fibroblast like synoviocytes.** *Cell Immunol* 2012, **272**(2):293–298.
43. Echeverry R, Wu F, Haile WB, Wu J, Yepes M: **The cytokine tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 have a neuroprotective effect in the central nervous system.** *J Neuroinflammation* 2012, **9**(1):45.
44. Wicovsky A, Salzmann S, Roos C, Ehrenschwender M, Rosenthal T, Siegmund D, Henkler F, Gohlke F, Kneitz C, Wajant H: **TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling.** *Cell Death Differ* 2009, **16**(11):1445–1459.

doi:10.1186/1475-2840-13-51

Cite this article as: Díaz-López et al.: Reduced circulating sTWEAK levels are associated with metabolic syndrome in elderly individuals at high cardiovascular risk. *Cardiovascular Diabetology* 2014 **13**:51.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

Publicación 3.

Título: *Reduced serum concentrations of carboxylated and undercarboxylated osteocalcin are associated with risk of developing type 2 diabetes mellitus in a high cardiovascular risk population: a nested case-control study.*

Autores: Díaz-López A, Bulló M, Juanola-Falgarona M, Martínez-González MA, Estruch R, Covas MI, Arós F, Salas-Salvadó J.

Año: 2013

Revista: J Clin Endocrinol Metab

Volumen: 98

Páginas: 4524-4531

PMID: 24037881

Factor de impacto: 6,31

Resumen:

Introducción y objetivo: Recientemente se ha descrito a la osteocalcina (OC), una hormona derivada de los osteoblastos, como un nexo de unión entre el hueso y el metabolismo de la glucosa. El objetivo del presente estudio fue evaluar si las concentraciones séricas de osteocalcina carboxilada (OCc) y osteocalcina no carboxilada (COnc) están asociadas con el desarrollo de diabetes tipo 2 (DMT2) en sujetos de edad avanzada con alto riesgo cardiovascular.

Diseño, escenario y participantes: Se realizó un estudio de casos y controles anidado, prospectivo, incluyendo un total de 459 sujetos no diabéticos reclutados en tres centros del estudio PREDIMED (Reus-Tarragona, Barcelona y Pamplona). Tras una media de 5 años de seguimiento, 153 sujetos desarrollaron diabetes (casos). 306 controles fueron escogidos al azar de los que permanecieron sin diagnóstico de diabetes durante el estudio. Éstos fueron seleccionados y emparejados individualmente con los casos (1:2) por edad, sexo, IMC y grupo de

Publicaciones

intervención. Se utilizaron modelos de regresión logística condicional para estimar las Odds Ratios (ORs) para la incidencia de DMT2 según categorías de ambas formas de OC, las cuales fueron determinadas en suero mediante kits ELISA.

Resultados: Al inicio del estudio, las concentraciones séricas de ambas formas de OC fueron significativamente menores en los sujetos que desarrollaron diabetes (casos) en comparación con los sujetos controles. En los nuevos casos de diabetes, las concentraciones séricas de COc, pero no de COnc, fueron inversamente y significativamente ($\beta = -0,335$) asociadas con la resistencia a la insulina, definida por el modelo homeostático (HOMA) y, con las concentraciones de glucosa en ayunas ($\beta = -0,044$) en los sujetos controles, independiente de otros factores confusores. En los modelos de regresión logística condicional teniendo en cuenta las variables de emparejamiento, las ORs para la incidencia de la DMT2 en el tercil más bajo respecto al más alto de concentraciones séricas de COc y COnc fueron de 2,03 (IC del 95%, 1,32-3,13) y 1,88 (1,23-2,85), respectivamente. Un posterior ajuste de los modelos por historia familiar de diabetes, estilos de vida y otros factores de confusión no cambiaron la magnitud de las asociaciones observadas.

Conclusión: En una población de alto riesgo cardiovascular, unas concentraciones séricas circulantes de COc y COnc reducidas al inicio del estudio, fueron fuertemente e independientemente asociadas con un mayor riesgo de desarrollar DMT2. Estos resultados, apoyan el concepto de la OC como un nexo de unión entre el hueso y el metabolismo de la glucosa, y sugieren a la OC como un potencial biomarcador del riesgo de DMT2.

Reduced Serum Concentrations of Carboxylated and Undercarboxylated Osteocalcin Are Associated With Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus in a High Cardiovascular Risk Population: A Nested Case-Control Study

Andrés Díaz-López, Mònica Bulló, Marti Juanola-Falgarona, Miguel A. Martínez-González, Ramón Estruch, Maria-Isabel Covas, Fernando Arós, and Jordi Salas-Salvadó

Human Nutrition Unit (A.D.-L., M.B., M.J.-F., J.S.-S.), Faculty of Medicine and Health Sciences, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Tarragona, Spain; CIBERObn Physiopathology of Obesity and Nutrition (A.D.-L., M.B., M.J.-F., M.A.M.-G., R.E., M.-I.C., J.S.-S.) and Redes Temáticas de Investigación Cooperativa RD06/0045 (F.A.), Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain; Department of Preventive Medicine and Public Health (M.A.M.-G.), University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain; Department of Internal Medicine (R.E.), Hospital Clínic, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; Lipids and Cardiovascular Epidemiology Research Unit (M.-I.C.), Institut Municipal d'Investigació Mèdica, 08003 Barcelona, Spain; and Department of Cardiology (F.A.), Hospital Txagorritxu, 01009 Vitoria, Spain

Context and Objective: Because it has been suggested that osteocalcin (OC), an osteoblast-derived hormone, is a new link between bone and glucose metabolism, we tested whether serum carboxylated osteocalcin (cOC) and undercarboxylated osteocalcin (ucOC) levels are independently associated with the development of type 2 diabetes in subjects at high cardiovascular risk.

Design, Setting, and Participants: A prospective, nested case-control study was conducted using data from the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) study. We included 153 case subjects with newly diagnosed diabetes and 306 individually matched control subjects free of diabetes identified during a mean 5-year follow-up. Conditional logistic regression models were used to estimate matched odds ratios for incident diabetes according to categories of both forms of OC measured by ELISAs.

Results: Baseline serum concentrations of both forms of OC were significantly lower in case subjects than in control subjects. In subjects with incident cases of diabetes, concentrations of cOC, but not of ucOC, were inversely and significantly associated with homeostasis model assessment of insulin resistance levels ($\beta = -0.335$) and with fasting glucose concentrations ($\beta = -0.044$) in control subjects, independent of other relevant confounders. In the conditional logistic model that took into account the matching factors, the odds ratios for diabetes incidence in the lowest vs the highest tertile of cOC and ucOC were 2.03 (95% confidence interval, 1.32–3.13) and 1.88 (1.23–2.85), respectively. Further adjustment for family history of diabetes, lifestyle, and other confounding factors did not appreciably change the magnitude of these associations.

Conclusion: In a population at high cardiovascular risk, low concentrations of serum cOC and ucOC were strongly associated with an increased risk of incident diabetes. (*J Clin Endocrinol Metab* 98: 4524–4531, 2013)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2013 by The Endocrine Society

Received June 7, 2013. Accepted September 5, 2013.

First Published Online September 13, 2013

Abbreviations: BMI, body mass index; CI, confidence interval; cOC, carboxylated osteocalcin; CV, coefficient of variation; CVD, cardiovascular disease; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IQR, interquartile range; MedDiet, Mediterranean diet; MET, metabolic equivalents; MetS, metabolic syndrome; OC, osteocalcin; OR, odds ratio; PREDIMED, Prevención con Dieta Mediterránea; T2D, type 2 diabetes mellitus; ucOC, undercarboxylated osteocalcin; VOO, virgin olive oil.

Type 2 diabetes mellitus (T2D) is a growing public health problem that is associated with an increased risk of cardiovascular and other socially relevant complications (1, 2). T2D is often a silent disease, which begins to develop several years before it is clinically diagnosed. Therefore, a better understanding of its pathophysiology is a prerequisite to detect individuals at high risk of diabetes earlier and, consequently, to design and develop preventive strategies (3).

Interestingly, in recent years, an accumulating body of evidence has suggested that osteocalcin (OC), an osteoblast-derived hormone, plays an intermediary role in the regulation of glucose and fat metabolism, linking bone metabolism with energy homeostasis (4).

Osteocalcin is a molecule synthesized as a prepro-OC. After proteolytic cleavage and vitamin K-dependent γ -carboxylation processes, it is released and circulates in the blood as carboxylated osteocalcin (cOC) or undercarboxylated osteocalcin (ucOC) (5). In animal studies, genetic OC deficiency (*Ocn*^{-/-} mice) has been associated with decreased pancreatic β -cell proliferation, glucose intolerance, and insulin resistance (6). However, in wild-type mice, these metabolic alterations are reversed by administering exogenous recombinant ucOC (7, 8). Data collected in human studies seem to confirm that there is an interplay between OC and insulin secretion and sensitivity. To date, in almost all the available cross-sectional studies, concentrations of OC have been negatively associated with glycated hemoglobin, fasting plasma glucose, fasting insulin, and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) (9–14). Similarly, serum OC concentrations have been reported to be diminished in patients with T2D (9, 13–16) and in subjects with metabolic syndrome (MetS) (10, 17).

In accordance with these observations, in a larger longitudinal study conducted in older men, we found that changes in serum cOC and ucOC were associated with an improvement in insulin secretion and sensitivity (18). Similarly, higher concentrations of cOC at baseline have been inversely associated with 3-year changes in HOMA-IR levels in older adults (19). However, few studies to date have been conducted to determine the association between serum OC levels and the future development of diabetes. To the best of our knowledge, only 2 studies conducted in healthy adults from Asian populations have explored these associations (20, 21), and the results were contradictory.

Therefore, we conducted a prospective, nested case-control study to further elucidate the role of both forms of OC in determining T2D incidence. The aim of the present study was to prospectively assess the association between

cOC and ucOC and the future development of diabetes in elderly Mediterranean individuals at high cardiovascular risk who are usually seen by primary care clinicians.

Research Design and Methods

Study design and population

The present prospective nested case-control study was performed on Caucasian nondiabetic individuals recruited from 3 Spanish centers (Reus-Tarragona, Navarra, and Barcelona clinics) within the framework of the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) trial. The PREDIMED study is a large, multicenter, randomized, parallel-group clinical trial with the aim of assessing the effects of the Mediterranean diet (MedDiet) on the primary prevention of cardiovascular disease (CVD). The protocol, design, objectives, and methods of the PREDIMED trial (<http://www.controlled-trials.com/ISRCTN35739639>) were reported in detail elsewhere (22, 23) and are available at <http://www.predimed.es>. In brief, recruitment took place between 2003 and 2009, and 7447 asymptomatic individuals at high risk of coronary heart disease met the inclusion criteria and were randomly assigned in a 1:1:1 ratio to 1 of 3 nutrition intervention groups: 2 MedDiet groups (supplemented with virgin olive oil [VOO] or nuts) or a control low-fat diet group with advice to reduce intake of all types of fat. The respective institutional review boards of the recruitment centers approved the study protocol, and participants gave their written informed consent.

For this nested case-control study, the participants studied were community-dwelling men aged 55 to 80 years and women aged 60 to 80 years without prior CVD or prevalent diabetes at baseline, because our purpose was to assess new-onset diabetes during follow-up. They all had at least 3 of the following cardiovascular risk factors: smoking, hypertension, dyslipidemia, overweight/obesity, or family history of early-onset coronary heart disease.

Of the 1378 individuals recruited in the aforementioned PREDIMED centers, for the present study we selected as cases all the individuals ($n = 153$) who developed T2D during a median of 5.9 years of follow-up (minimum 1.2 months and maximum 8.2 years).

Incident (new-onset) diabetes was diagnosed using the American Diabetes Association criteria (24), namely, fasting plasma glucose ≥ 126 mg/dL (≥ 7 mmol/L) or 2-hour plasma glucose ≥ 200 mg/dL (≥ 11.1 mmol/L) after a 75-g oral glucose tolerance test measured yearly. A second test using the same criteria was required for confirmation. Cases were ascertained by the PREDIMED End-point Adjudication Committee, whose members were blinded to the intervention and to the biomarkers assessed. For each individual who developed diabetes during the follow-up, 2 control subjects were selected ($n = 306$). Control subjects were matched to the case subjects by age, sex, body mass index (BMI), and dietary intervention group. (The 1225 nondiabetic subjects who were candidates for inclusion in the control group were classified according to categories of matching variables: age [≤ 67 or > 67 years], sex, BMI [≤ 27 or > 27 kg/m²], and intervention group [MedDiet + VOO, MedDiet + nuts, or control group]). In total, 24 groups were created [$2 \times 2 \times 2 \times 3 = 24$ groups]. Then, out of each of the 24 groups, 2 control subjects

were randomly selected for every case subject belonging to the same group).

At the baseline examination and yearly at follow-up visits, trained staff obtained anthropometric measurements, such as weight, height, and waist circumference, as well as blood pressure in triplicate using a validated semiautomatic oscillometer (HEM-705CP; Omron). We also administered a 47-item questionnaire about education, lifestyle, history of illnesses, and medication use; a semiquantitative 137-item validated food frequency questionnaire (25); a validated 14-point questionnaire to assess adherence to the MedDiet (26); and a validated Spanish version of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire to assess physical activity (27).

Biochemical measurements

After an overnight fast, blood samples were collected. Aliquots of serum and EDTA plasma were immediately processed, coded, and shipped to a central laboratory in a portable cooler (-4°C), and stored at -80°C until analysis. The time between blood sampling and freezing was <1 hour. Plasma levels of fasting glucose, serum levels of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and triglycerides were measured by standard enzymatic automated methods. Plasma concentrations of insulin and adiponectin were determined in duplicate by ELISAs (EZHI-14K and EZHADP-61K; Millipore, respectively). The intra-assay and interassay coefficients of variation (CVs) were $<5\%$ and $<10\%$ for both. Insulin resistance was estimated by the HOMA method using the following equation: $\text{HOMA-IR} = (\text{fasting insulin} [\text{micro-international units per milliliter}] \times \text{fasting glucose} [\text{millimoles per liter}]) / 22.5$. Total cOC and ucOC concentrations were determined in serum samples in duplicate. The cOC was measured by an Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay Kit (DRG Instruments GmbH). The detection limit, defined as the apparent concentration 2 SD values above the average optical density at zero binding, was 0.08 ng/mL , and the intra-assay and interassay CVs were $<6\%$. The ucOC was measured by a solid-phase enzyme immunoassay kit (Takara Bio) with a sensitivity of 0.25 ng/mL and intra-assay and interassay CVs of 5.2% and 8.3% , respectively.

Statistical analysis

Analyses were performed using SPSS software (version 19.0; SPSS Inc). We compared the baseline characteristics between case and control subjects using t tests for the continuous variables and χ^2 tests for categorical variables. The distribution of variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Variables such as serum cOC and ucOC concentrations, fasting plasma glucose and insulin, and HOMA-IR levels were \log_e -transformed before statistical analyses to approximate a normal distribution. All data are presented as means \pm SD values or medians and interquartile ranges (IQRs) for continuous variables and percentages and numbers for categorical variables.

Multiple linear regression analysis was performed to examine the associations between both forms of OC and glucose metabolism-related parameters separately (ie, fasting plasma glucose and HOMA-IR levels), controlling for potential confounding variables. These analyses were done in case and control subjects separately. Subsequently, participants were categorized according to tertiles of baseline sex-adjusted cOC and ucOC concentrations based on the distribution of control subjects. We used conditional logistic regression models to estimate the matched

odds ratios (ORs) and the 95% confidence interval (CI) for incident diabetes for the 2 lowest tertiles and the upper tertile as the reference category. An unadjusted model and 3 other adjusted models were fitted. Model 1 was adjusted for known diabetes risk factors: family history of diabetes (yes/no), educational level (primary education vs secondary/higher education), alcohol intake (grams per day), smoking (current/not current), physical activity (sedentary [≤ 200 metabolic equivalents [MET]-min/d] vs active [>200 MET-min/d]), the PREDIMED 14-item Med-Diet score, and statin, bisphosphonate, and $1-\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 use (yes/no). Model 2 was also adjusted for the baseline MetS components (waist circumference >102 cm in men/ >88 cm in women [yes/no], serum triglyceride ≥ 150 mg/dL [yes/no], HDL cholesterol <40 mg/dL in men/ <50 mg/dL in women [yes/no], high BP [$\geq 130/85$ mm Hg] or medication use [yes/no], and fasting plasma glucose level ≥ 100 mg/dL [yes/no]) and baseline fasting insulin concentrations (continuous variables). Moreover, a third model was also adjusted for plasma adiponectin and dietary vitamin K intake (both continuous variables). Linear-trend tests were conducted across categories by assigning the medians to each category and treating it as a continuous variable. All statistical tests were 2-tailed, and the significance level was set at $P \leq .05$.

Results

Table 1 shows the baseline characteristics of the participants who developed incident T2D (case subjects, $n = 153$) and their matched control subjects ($n = 306$). Compared with the matched control subjects, individuals who developed diabetes during follow-up had higher values of waist circumference at baseline and were more likely to have had a family history of diabetes. Furthermore, they had a higher baseline prevalence of MetS and some of its components, such as central obesity, hypertriglyceridemia, and hyperglycemia, than their matched control subjects. Baseline fasting glucose and insulin concentrations, and HOMA-IR levels were significantly higher in case subjects than in control subjects, whereas plasma concentrations of adiponectin and serum concentrations of cOC and ucOC were significantly lower in subjects with incident cases of diabetes than in control subjects. After adjustment for age, sex, BMI, intervention group, presence of MetS (yes/no), HOMA-IR levels, and other confounding factors (the above-mentioned model 1), concentrations of cOC and ucOC remained significantly lower in subjects with incident cases of diabetes than in control subjects ($P = .003$ for cOC and $P = .013$ for ucOC).

To assess the association between serum concentrations of cOC and ucOC and glucose metabolism-related parameters, multiple linear regression analyses were computed in case subjects and control subjects separately (Table 2). In individuals who developed diabetes during the follow-up, the serum cOC concentrations measured at baseline were inversely and significantly associated with

Table 1. Baseline Characteristics of Participants

Baseline Variable	Incident Diabetes (Case Subjects) (n = 153)	Matched Control Subjects (n = 306) ^a	P Value ^b
Age, y, mean ± SD	66.3 ± 5.8	66.3 ± 6.1	.96
MedDiet + VOO/MedDiet + nuts/Control intervention groups, n	50/45/58	100/90/116	1.00
Men, % (n)	47 (72)	47 (144)	1.00
Body weight, kg, mean ± SD	78.5 ± 11.2	76.8 ± 10.9	.12
BMI, kg/m ² , mean ± SD	30.2 ± 3.9	29.8 ± 3.0	.18
Overweight/obesity (BMI ≥25 kg/m ²), % (n)	97 (148)	96 (293)	.80
Waist circumference, cm, mean ± SD	101.7 ± 9.5	98.5 ± 10.0	.001
Current smoker, % (n)	26 (40)	21 (64)	.23
Physical activity, MET-min/d, mean ± SD	276.9 ± 229.0	267.4 ± 238.9	.68
Educational level, % (n)			
Primary education	69 (106)	70 (214)	.91
Secondary or higher education	31 (47)	30 (92)	
Medication use, % (n)			
Statins	41 (63)	37 (113)	.41
Biphosphonates	4 (5)	6 (16)	.47
1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃	2 (3)	4 (12)	.15
Family history of diabetes, % (n)	35 (54)	24 (75)	.02
Metabolic syndrome, % (n)	74 (114)	40 (123)	<.001
Central obesity	84 (128)	66 (201)	<.001
Hypertriglyceridemia	42 (65)	31 (94)	.017
Low HDL cholesterol level	23 (36)	20 (61)	.39
Hypertension	97 (148)	96 (293)	.80
Fasting plasma glucose level ≥100	76 (116)	24 (75)	<.001
MedDiet score (0 to 14), mean ± SD	8.56 ± 1.76	8.64 ± 1.88	.64
Fasting glucose, mg/dL, median (IQR)	110.0 (100.5–122.0)	93.0 (87.0–99.0)	<.001
Fasting insulin, μ U/mL, median (IQR)	5.32 (3.48–7.34)	4.38 (3.11–6.65)	.005
HOMA-IR, median (IQR) ^b	1.51 (0.94–2.01)	0.98 (0.71–1.48)	<.001
Adiponectin, μ g/mL, median (IQR)	7.23 (4.92–11.23)	8.98 (5.76–14.06)	.004
cOC, ng/mL, median (IQR)	7.53 (5.75–9.45)	8.48 (6.49–11.53)	<.001
ucOC, ng/mL, median (IQR)	3.57 (2.33–5.35)	4.45 (2.62–6.47)	.009

^a Matched for age (≤ 67 vs > 67 years), sex, BMI (≤ 27 vs > 27 kg/m²), and dietary intervention group (MedDiet + VOO, MedDiet + nuts, or control group).

^b P value for comparisons between 2 groups was tested by the χ^2 test for categorical variables or the Student *t* test for continuous variables.

insulin resistance as measured by HOMA-IR ($\beta = -0.335$ [95% CI, -0.538 to -0.133]) after adjustment for sex, age, BMI, intervention group, presence of MetS (yes/no), and other confounding factors included in model 1. Similarly, after adjustment for insulin and the above-mentioned confounders, the cOC concentration was independently and inversely associated with fasting glucose ($\beta = -0.044$ [95% CI, -0.081 to -0.007]) in control subjects. However, no significant association was observed between ucOC and any of the glucose metabolism parameters in either case or control subjects (Table 2).

Low concentrations of both forms of OC measured at baseline were strongly associated with an increased risk of incident T2D (Table 3). Compared with subjects in the top tertile, subjects in the lowest tertile of cOC and ucOC had an increased risk of diabetes incidence (2.03 [95% CI, 1.32–3.13], *P* for trend = 0.001 and 1.88 [95% CI, 1.23–2.85], *P* for trend = .004, respectively). Adjustment for family history of diabetes, lifestyle, and other confounding factors (model 1) did not appreciably alter the ORs (Table 3). These ORs were slightly attenuated but remained sta-

tistically significant after additional adjustment for other diabetes risk factors, including MetS components and fasting insulin (model 2) (1.60 [95% CI, 1.02–2.50], *P* for trend = .04 for cOC and 1.69 [95% CI, 1.09–2.60], *P* for trend = .01 for ucOC). To examine whether the association between cOC and ucOC with the risk of incident diabetes was mediated by dietary vitamin K or adiponectin, we included these variables in model 2. In this multivariate analysis, low levels of total cOC and ucOC at baseline were still significantly and independently associated with an increased risk of diabetes incidence (ORs of cOC and ucOC for the lowest vs the highest tertile were 1.58 [95% CI, 1.01–2.48], *P* for trend = .05 and 1.73 [95% CI, 1.12–2.67], *P* for trend = .008, respectively).

Discussion

In this large prospective, nested case-control study conducted in elderly Mediterranean individuals at high-risk of CVD, we found that low concentrations of both serum

Table 2. Association Between Glucose Metabolism–Related Parameters and Serum cOC and ucOC Concentrations in Case and Control Subjects Separately

	Glucose, mg/dL			HOMA-IR Levels		
	β	95% CI	<i>P</i> Value	β	95% CI	<i>P</i> Value
Incident diabetes (case subjects) (n = 153)						
Unadjusted						
cOC, ng/mL	0.014	−0.045 to 0.072	.64	−0.309	− 0.531 to − 0.086	.007
ucOC, ng/mL	−0.007	−0.046 to 0.031	.70	0.053	−0.094 to 0.199	.47
Adjusted for age, sex, and BMI						
cOC, ng/mL	0.011	−0.048 to 0.071	.71	−0.323	− 0.527 to − 0.120	.002
ucOC, ng/mL	−0.012	−0.051 to 0.028	.56	0.013	−0.121 to 0.147	.85
Fully adjusted model ^a						
cOC, ng/mL	0.018	−0.038 to 0.075	.52	−0.335	− 0.538 to − 0.133	.001
ucOC, ng/mL	−0.007	−0.045 to 0.030	.70	−0.017	−0.158 to 0.124	.80
Matched control subjects (n = 306)						
Unadjusted						
cOC, ng/mL	− 0.070	− 0.104 to − 0.028	.001	−0.174	−0.353 to 0.005	.056
ucOC, ng/mL	0.002	−0.021 to 0.025	.86	0.042	−0.067 to 0.151	.45
Adjusted for age, sex, and BMI						
cOC, ng/mL	−0.058	− 0.096 to − 0.019	.003	−0.116	−0.292 to 0.061	.19
ucOC, ng/mL	0.005	−0.018 to 0.027	.69	0.043	−0.062 to 0.149	.41
Fully adjusted model ^a						
cOC, ng/mL	−0.044	− 0.081 to − 0.007	.019	−0.104	−0.178 to 0.070	.24
ucOC, ng/mL	0.001	−0.021 to 0.022	.96	0.064	−0.039 to 0.167	.22

Unstandardized β values (95% CI) and *P* values are presented. Results are based on \log_e -transformed values of serum cOC and ucOC concentrations, fasting plasma glucose, and HOMA-IR levels.

^a Adjusted for age, sex, BMI, intervention group, the presence of MetS (yes/no), family history of diabetes (yes/no), educational level (primary education vs secondary/higher education), alcohol intake (grams per day), smoking (current/not current), physical activity (sedentary vs active), MedDiet score (0–14), statins, bisphosphonates, and 1- α ,25-dihydroxyvitamin D₃ use (yes/no), and fasting insulin level (except for HOMA-IR).

cOC and ucOC at baseline were significantly and independently associated with an increased risk of developing T2D after adjustment for major confounders. These findings suggest that OC is implicated in the pathogenesis of diabetes, thus extending its role beyond bone metabolism.

As far as we know, only 2 studies have explored the relationship between serum OC levels and the future development of T2D, and their results were inconsistent. In agreement with our observation, in a prospective nested case-control study with a 10-year follow-up conducted on a small cohort of middle-aged men, low serum concentrations of cOC, but not of ucOC, were independently associated with an increased risk of diabetes (20). Unlike our results, in a retrospective study performed on 1229 apparently healthy men aged 25- to 60 years, no association between total cOC and diabetes risk after a mean follow-up of 8.5 years was found (21). Some factors that might partly explain the discrepancies between our study and this previous retrospective study (21) are differences in age and in the prevalence of cardiovascular risk factors between populations at baseline and, more importantly, the different design used in the 2 studies.

It should be pointed out that, in our study, the association between baseline levels of both forms of OC and the development of diabetes was independent of the presence

of recognized risk factors for diabetes, including the components of MetS, which have been inversely associated with OC concentrations in previous reports (10, 17).

The findings of the present study extend the observations made by other studies, which have shown that subjects with prevalent diabetes have lower concentrations of OC (9, 13–16) because OC levels were already decreased before the onset of overt clinical diabetes. Therefore, it is plausible to consider OC as a promising candidate for the early identification of individuals at risk of diabetes. In the future, it needs to be studied in well-designed investigations and in other cohorts.

The mechanisms explaining the association between OC and risk of diabetes are still poorly understood. Several recent studies have indicated that OC is an important molecule modeling glucose metabolism. However, animal and in vitro studies have shown that only ucOC is able to regulate glucose homeostasis and energy metabolism (6–8). Whether ucOC is the metabolically active form of circulating OC in humans is still mere speculation, given that both OC forms have been shown to be involved in glucose homeostasis. For example, accumulating evidence based on the general population has shown inverse associations between circulating concentrations of both the carboxylated and uncarboxylated forms of OC and glycated he-

Table 3. Crude and Adjusted Risk of Developing T2D According to Sex-Adjusted Tertile of Serum Concentrations of cOC and ucOC

	Tertiles of OC Concentrations			P for Trend
	1st Tertile	2nd Tertile	3rd Tertile	
cOC				
Men, concentration, ng/mL	<6.4	6.4 to <9.3	≥9.3	<.001 ^a
No. of case subjects/no. of control subjects	36/48	24/48	12/48	.001 ^a
Women, concentration, ng/mL	<7.8	7.8 to <11.5	≥11.5	<.001 ^a
No. of case subjects/no. of control subjects	37/54	27/54	17/54	.08 ^a
Crude (matched ^b) model	2.03 (1.32–3.13)	1.60 (1.02–2.53)	1.00 (reference)	.001
Model 1	2.07 (1.34–3.20)	1.63 (1.03–2.57)	1.00 (reference)	.001
Model 2	1.60 (1.02–2.50)	1.54 (0.97–2.45)	1.00 (reference)	.045
ucOC				
Men, concentration, ng/mL	<2.8	2.8–<5.6	≥5.6	<.001 ^a
No. of case subjects/no. of control subjects	34/48	26/48	12/48	.025 ^a
Women, concentration, ng/mL	<4.1	4.1–<5.10	≥5.10	<.001 ^a
No. of case subjects/no. of control subjects	37/54	24/54	20/54	.15 ^a
Crude (matched ^b) model	1.88 (1.23–2.85)	1.55 (1.01–2.42)	1.00 (reference)	.004
Model 1	2.00 (1.29–3.03)	1.62 (1.03–2.55)	1.00 (reference)	.002
Model 2	1.68 (1.09–2.59)	1.20 (0.76–1.88)	1.00 (reference)	.011

Results are expressed as ORs (95% CI) for diabetes from conditional logistic regressions.

^a P value for comparisons between tertiles was tested by the χ^2 test for categorical variables or one-way ANOVA for continuous variables.

^b Matched for age (≤ 67 vs > 67 years), sex, BMI (≤ 27 vs > 27 kg/m²), and dietary intervention group (MedDiet + VOO, MedDiet + Nuts, or control group). Model 1: adjusted for family history of diabetes (yes/no), educational level (primary education vs secondary/higher education), alcohol intake (grams per day), smoking (current/not current), physical activity (sedentary vs active), MedDiet score (0–14), and statins, bisphosphonates, and 1- α ,25-dihydroxyvitamin D₃ use (yes/no). Model 2: Further adjusted for MetS components: waist circumference > 102 cm in men/ > 88 cm in women (yes/no), serum triglycerides ≥ 150 mg/dL (yes/no), HDL cholesterol < 40 mg/dL in men/ < 50 mg/dL in women (yes/no), hypertension ($\geq 130/85$ mm Hg) or medication use (yes/no), fasting plasma glucose level ≥ 100 mg/dL (yes/no), and fasting insulin level (log_e-transformed continuous variables).

moglobin A_{1c}, fasting plasma glucose, or insulin resistance (HOMA-IR) (9–14). Elevated levels of both forms of OC have also been found to be associated with improved glucose tolerance (11, 16, 28). Moreover, in a longitudinal analysis of the PREDIMED study conducted by our group, increased cOC and ucOC concentrations in serum have been directly associated with HOMA β cell function and inversely with insulin resistance determined by HOMA-IR, respectively (18). Thus, it is not clear which of the 2 forms of OC is most closely linked with insulin secretion and sensitivity (11, 28). In the present study, although both forms of OC were inversely associated with the risk of developing diabetes, only cOC showed an inverse relationship with glucose metabolism-related parameters. Therefore, these results combined with the above-mentioned observations suggested that cOC may play an intermediary role in the pathogenesis of T2D through the modulation of insulin resistance. However, because of the nature of our cross-sectional analysis, it remains unclear whether cOC concentrations represent a cause and/or a consequence of the insulin resistance state. The precise molecular mechanisms by which low ucOC levels are associated with increased risk of T2D are largely unknown and require further study. In our study, the fact that ucOC was not related to glucose metabolism-related parameters suggests that the inverse association between ucOC and

diabetes can be explained by pathways other than its effect on insulin resistance.

Some researchers have suggested that vitamin K, which up-regulates the γ -carboxylation of OC could have an effect on the association between OC and diabetes risk (29, 30). It has also been proposed that ucOC regulates insulin sensitivity, at least in part, through its effects on adiponectin (6). However, in our study, the risk of diabetes was significantly and independently associated to OC even after these variables (adiponectin and vitamin K intake) had been included in the model, thus demonstrating that these factors have little or no influence on the observed associations.

Our study has limitations and also strengths. First, a major limitation is that the population studied consisted of elderly individuals at high risk of CVD, so our findings cannot be extrapolated to the general population. Another limitation of our study is inherent to the study design. In nested case-control studies, the nondiseased persons from whom the control subjects are selected may not be fully representative of the original cohort (31, 32). Thus, it will be important in the future to prospectively assess the association between serum levels of both forms of OC and the risk of developing diabetes in other cohorts, of which all members are assessed at baseline. Finally, we measured both forms of OC only at baseline in our participants, and,

therefore, we cannot evaluate the associations between the changes in serum concentrations of both forms of OC and in the evolution of glucose metabolism parameters over time.

One of the strengths of our study, which distinguishes it from previous studies, is that the diagnosis of diabetes was not self-reported and was verified by a second analytical test, thus making the identification of new incident cases more reliable. In addition, in our study, cases were ascertained by an independent clinical end-point adjudication committee, whose members were unaware of the study group assignments and other clinical data. Other strengths of our study include the relatively large number of incident cases, a long follow-up period, inclusion of individuals of both sexes, and detailed standardized assessment of and control for a large number of potential confounding variables.

In conclusion, we found that low serum concentrations of cOC and ucOC were independently associated with an increased risk of incident T2D in individuals at high-risk of CVD. Our results, combined with evidence emerging from animal and human studies suggesting that there is a relationship between OC and glucose metabolism, support the concept that OC may have a key role in the pathogenesis of T2D. Other longitudinal studies conducted in different populations are needed to confirm our findings.

Acknowledgments

We thank the participants for their enthusiastic collaboration, the PREDIMED personnel for excellent assistance, and the personnel of all affiliated primary care centers. CIBERobn and CIBERdem are initiatives of the Spanish Ministry of Health (ISCIII), Madrid, Spain.

Address all correspondence and requests for reprints to: Jordi Salas-Salvadó, Human Nutrition Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Rovira i Virgili, C/Sant Llorenç, 21, 43201 Reus, Spain. E-mail: jordi.salas@urv.cat.

This study was registered with clinical trial registration number ISRCTN35739639.

A.D.-L. and J.S.-S. had full access to all the data in the study and take full responsibility for the integrity and accuracy of the data analysis. M.A.M.-G., R.E., M.-I.C., F.A., and J.S.-S provided the study concept and design. A.D.-L., M.B., M.J.-F., M.A.M.-G., and J.S.-S. analyzed and interpreted data. A.D.-L. and J.S.-S. drafted the manuscript. A.D.-L., M.B., and J.S.-S. provided statistical analysis. All authors critically revised and approved the final version of the manuscript.

This work was supported in part by the Spanish Ministry of Health (ISCIII) (PI11/00049, PI1001407, G03/140, and RD06/0045) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). None of the funding sources played a role in the design, collection, analysis, or interpretation of the data or in the decision to submit the manuscript for publication.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Narayan KM, Gregg EW, Fagot-Campagna A, Engelgau MM, Vinicor F. Diabetes—a common, growing, serious, costly, and potentially preventable public health problem. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;50(suppl 2):S77–S84.
2. 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;94:311–321.
3. Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimäki M, Witte DR. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet*. 2009;373:2215–2221.
4. Clemens TL, Karsenty G. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2011;26:677–680.
5. Villafán-Bernal JR, Sánchez-Enríquez S, Muñoz-Valle JF. Molecular modulation of osteocalcin and its relevance in diabetes (review). *Int J Mol Med*. 2011;28:283–293.
6. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 2007;130:456–469.
7. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates β cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:5266–5270.
8. Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P, Karsenty G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone*. 2012;50:568–575.
9. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, et al. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res*. 2009;24:785–791.
10. Saleem U, Mosley TH Jr, Kullo IJ. Serum osteocalcin is associated with measures of insulin resistance, adipokine levels, and the presence of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1474–1478.
11. Kanazawa I, Yamaguchi T, Tada Y, et al. Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes. *Bone*. 2011;48:720–725.
12. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamauchi M, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 2011;22:187–194.
13. Sarkar PD, Choudhury AB. Relationship of serum osteocalcin levels with blood glucose, insulin resistance and lipid profile in central Indian men with type 2 diabetes. *Arch Physiol Biochem*. 2012;118:260–264.
14. Iki M, Tamaki J, Fujita Y, Kouda K, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin levels are inversely associated with glycemic status and insulin resistance in an elderly Japanese male population: Fujiwara-kyo Osteoporosis Risk in Men (FORMEN) study. *Osteoporos Int*. 2012;23:761–770.
15. Zhou M, Ma X, Li H, et al. Serum osteocalcin concentrations in relation to glucose and lipid metabolism in chinese individuals. *Eur J Endocrinol*. 2009;161:723–729.
16. Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY. Circulating osteocalcin level is associated with improved glucose tolerance, insulin secretion and sensitivity independent of the plasma adiponectin level. *Osteoporos Int*. 2012;23:1337–1342.
17. Oosterwerff MM, van Schoor NM, Lips P, Eekhoff EM. Osteocalcin as a predictor of the metabolic syndrome in older persons: a population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78:242–247.
18. Bulló M, Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM, et al. Total and undercarboxylated osteocalcin predict changes in insulin sensitivity and β cell function in elderly men at high cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr*. 2012;95:249–255.

19. Shea MK, Gundberg CM, Meigs JB, et al. γ -Carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men and women. *Am J Clin Nutr*. 2009;90:1230–1235.
20. Ngarmukos C, Chailurkit LO, Chanprasertyothin S, Hengprasith B, Sritara P, Ongphiphadhanakul B. A reduced serum level of total osteocalcin in men predicts the development of diabetes in a long-term follow-up cohort. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77:42–46.
21. Hwang YC, Jee JH, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY, Lee MK. Circulating osteocalcin level is not associated with incident type 2 diabetes in middle-aged male subjects: mean 8.4-year retrospective follow-up study. *Diabetes Care*. 2012;35:1919–1924.
22. Martínez-González MÁ, Corella D, Salas-Salvadó J, et al. for the PREDIMED Study Investigators Cohort profile: design and methods of the PREDIMED study. *Int J Epidemiol*. 2012;41:377–385.
23. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013;368:1279–1290.
24. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013;36(suppl 1):S67–S74.
25. Fernández-Ballart JD, Piñol JL, Zazpe I, et al. Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *Br J Nutr*. 2010;103:1808–1816.
26. Schröder H, Fitó M, Estruch R, et al. A short screener is valid for assessing Mediterranean diet adherence among older Spanish men and women. *J Nutr*. 2011;141:1140–1145.
27. Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E. Validation of the Minnesota leisure time physical activity questionnaire in Spanish men. The MARATHOM investigators. *Am J Epidemiol*. 1994;139:1197–1209.
28. Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced β -cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25:768–772.
29. Yoshida M, Jacques PF, Meigs JB, et al. Effect of vitamin K supplementation on insulin resistance in older men and women. *Diabetes Care*. 2008;31:2092–2096.
30. Binkley NC, Krueger DC, Engelke JA, Foley AL, Suttie JW. Vitamin K supplementation reduces serum concentrations of under- γ -carboxylated osteocalcin in healthy young and elderly adults. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:1523–1528.
31. Lubin JH, Gail MH. Biased selection of controls for case-control analyses of cohort studies. *Biometrics*. 1984;40:63–75.
32. Wacholder S. Bias in full cohort and nested case-control studies? *Epidemiology*. 2009;20:339–340.



Download the **Endocrine Society's multi-journal, full-text app** to stay up to date on your iPhone, iPad, iPod, and Android. Available at Apple App Store and Android Market

Need Part IV MOC Points? Learn more about the Endocrine Society's Practice Improvement Modules (PIMs).

www.endoselfassessment.org

8. DISCUSIÓN GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

8. DISCUSIÓN

En la presente Tesis se han valorado los niveles circulantes de sTWEAK, receptor *scavenger* sCD163 y OC en un grupo de población de edad avanzada con alto riesgo de ECV, procedente del ensayo de campo PREDIMED, y su relación con el desarrollo de la DMT2 o la prevalencia de síndrome metabólico.

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido aportar nuevos datos respecto al sTWEAK, poniendo en relieve que los niveles circulantes de sTWEAK podrían ser útiles como un biomarcador para predecir el desarrollo de DMT2. Además, sugieren que esta molécula desempeña un papel modulador frente al SM, un conglomerado de alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad abdominal y frecuentemente a la RI. Asimismo este trabajo, ha contribuido a esclarecer los resultados divergentes previamente publicados respecto la relación existente entre los niveles periféricos de OC y la aparición de la DMT2.

8.1. Concentraciones séricas de sTWEAK, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico

En el presente estudio describimos, por primera vez, un papel protector del sTWEAK frente la aparición de la DMT2. Nuestros resultados demuestran que aquellos individuos que presentaban los niveles séricos de sTWEAK más altos al inicio del estudio, tenían un 37% menor riesgo de desarrollar DMT2. Dicho de otra manera, unos niveles circulantes reducidos del sTWEAK se asocian con un mayor riesgo de desarrollar DMT2 con el tiempo.

En los últimos años, numerosos estudios transversales han observado una relación entre niveles bajos de sTWEAK y diferentes enfermedades y/o comorbilidades incluyendo DMT1 ²³⁰, DMT2 ²³¹, diabetes gestacional ²³³, así como obesidad severa ²²⁸. Asimismo, y consistente con nuestros resultados, las concentraciones circulantes de sTWEAK se han correlacionado de forma negativa con los niveles de glucemia en ayunas HbA1c, el HOMA-IR ²³¹, e índices de obesidad central ²³⁰; los cuales, son todos ellos factores de riesgo bien reconocidos para el desarrollo de

Discusión

enfermedades metabólicas con un componente cardiovascular como el SM y la DMT2. La correlación negativa observada en nuestro estudio entre los niveles de sTWEAK y el HOMA-IR tanto en individuos que incidieron para DMT2 como en los sujetos control, sugiere que los niveles de esta proteína podrían ser utilizados como un potencial marcador de RI. Así pues, los resultados aportados por nuestro estudio refuerzan la hipótesis que el sTWEAK podría ejercer un papel protector sobre la RI, y sugieren que esta proteína, la cual es fácil de determinar en muestras de sangre, podría ser una nueva diana terapéutica para la prevención de DMT2.

Los mecanismos moleculares por los cuales el sTWEAK mejora la sensibilidad a la insulina han sido recientemente demostrados en tejido adiposo visceral de humanos, describiéndose un efecto protector de sTWEAK frente la RI inducida por TNF- α . En un contexto de obesidad, TNF- α y sTWEAK coexisten en el tejido adiposo. Y de manera similar, ambas proteínas activan rutas de señalización pro-inflamatorias que incluyen las rutas canónica y no canónica de NF- κ B, AKT, ERK1/2 y JNK1/2, las cuales pueden interferir en la ruta de señalización de la insulina ^{206,207}. Así, se ha descrito una RI inducida por TNF- α en los adipocitos viscerales humanos mediante un mecanismo dependiente de la activación de JNK1/2 e inhibición de la ruta de señalización de la insulina a nivel de AKT e IRS1 ^{229,302}, mientras que el pre-tratamiento de los adipocitos con sTWEAK recupera esta ruta de señalización de la insulina ²²⁹. Es decir, el sTWEAK, restaura la translocación del transportador GLUT4 a la superficie de la membrana plasmática y la captación de glucosa en respuesta a la insulina, a pesar de la presencia de TNF- α . De manera más específicamente podemos decir que la ruta sTWEAK-Fn14 previene la RI inducida por TNF- α al bloquear la activación de la cinasa JNK1/2 mediante un mecanismo dependiente de la serina/treonina fosfatasa PP2A ²²⁹. Además, también se ha descrito que en adipocitos subcutáneos humanos el sTWEAK inhibe la secreción de citocinas pro-inflamatorias inducidas por el TNF- α , como la IL-6 y la IL-8, las cuales han sido asociadas con el estado de RI ²²⁸. Esto sugiere que niveles bajos de sTWEAK podrían contribuir a amplificar el efecto deletéreo de TNF- α a nivel local y sistémico, a pesar de que ambas proteínas poseen un potencial inflamatorio. Por lo tanto, estos datos apuntan también hacia un posible papel protector del sTWEAK frente a la inflamación de bajo grado asociada con la RI inducida por la obesidad.

Por otro lado están los resultados aportados por nuestro estudio del análisis transversal, mostrando que bajos niveles séricos de sTWEAK se asociaron con mayor riesgo de presentar SM, siendo la obesidad abdominal, hiperglucemia y hipertrigliceridemia las principales variables clínicas contribuyentes de esta asociación. Cabe destacar, que nunca antes se había estudiado esta relación. Así, los resultados obtenidos aportan por primera vez evidencia científica asociando inversamente los niveles de sTWEAK con el SM. Así pues, podríamos decir que nuestros resultados en cierto modo van en la misma dirección y contribuyen a las evidencias que apoyan la hipótesis de que niveles bajos de sTWEAK se asocian con un perfil de mayor riesgo metabólico y cardiovascular. Por ejemplo, niveles bajos de sTWEAK se han encontrado en pacientes con condiciones patológicas tales como insuficiencia cardiaca crónica ²³⁴, enfermedad coronaria y patología vascular periférica ²³⁵⁻²³⁷, hipertensión ²³² y DMT2 y/o insuficiencia renal en etapa terminal ²³¹. En este sentido, varios autores han sugerido que los niveles bajos de sTWEAK podrían ser utilizados como un nuevo marcador de la aterosclerosis subclínica ^{303,304}. De hecho, recientemente se ha descrito que niveles reducidos de sTWEAK se asocian con un mayor riesgo de mortalidad cardiovascular a largo plazo en pacientes con enfermedad arterial periférica sintomática ²³⁹, y se ha sugerido a esta proteína como un predictor de futuros eventos cardiovasculares en pacientes con insuficiencia renal crónica sin tratamiento con diálisis ³⁰⁵. Un interesante resultado a destacar de nuestro estudio, es que aquellos sujetos que presentaban concentraciones bajas de sTWEAK tenían un mayor riesgo de presentar mayor número de factores que definen el SM, y el riesgo aumentaba de forma paralela al incremento de éstos.

Así pues, podemos concluir que nuestro análisis transversal sugiere que el sTWEAK desempeña un papel modulador frente al SM, el cual se puede definir como un trastorno metabólico subyacente a la obesidad abdominal y la RI que contribuye tanto al desarrollo de la DMT2 como de la aterosclerosis, e incrementa el riesgo de ECV ³⁰⁶.

En cuanto a la relación entre el sTWEAK y la obesidad, nuestros resultados son apoyados por varios estudios que han observado una relación inversa entre niveles séricos de sTWEAK y el grado de obesidad abdominal ²³⁰, presentando los pacientes con obesidad severa niveles extremadamente bajos de sTWEAK ²²⁸. De hecho, se ha descrito en pacientes con obesidad

Discusión

mórbida que durante la pérdida de peso secundaria a la cirugía bariátrica los niveles circulantes de sTWEAK aumentan en el 69% de los sujetos, y este aumento se relaciona con la cantidad de peso corporal perdido a los 6 meses ²²⁸. Sin embargo, no está claro el mecanismo que interviene en la disminución de los niveles de sTWEAK en pacientes con obesidad severa tras la pérdida de peso, ni el papel que el tejido adiposo podría estar ejerciendo en la secreción de sTWEAK. Se ha sugerido que los niveles bajos de sTWEAK asociados a la obesidad severa, posiblemente sea consecuencia de la alteración metabólica de otros tejidos como el músculo vascular y el esquelético, ambos implicados en el desarrollo de trastornos metabólicos, y donde el TWEAK se expresa generalmente con niveles más altos ^{227,307}.

Por lo que respecta al perfil lipídico y los niveles de sTWEAK, algunos estudios describen una relación negativa con los niveles séricos de colesterol total y triglicéridos en sujetos con obesidad severa ²²⁸, mientras otros autores, describen ya sea una relación positiva con las concentraciones de triglicéridos ³⁰⁸ o ninguna asociación ²³⁸. Los resultados de nuestro estudio mostraron una relación inversa entre los niveles de sTWEAK y el riesgo de presentar hipertrigliceridemia. Y curiosamente, en un estudio reciente se ha observado que los niveles circulantes de AGL influyen negativamente en la expresión del sTWEAK. Por lo tanto, todo ello sugiere que la lipotoxicidad podría ser un modulador de los niveles de ésta proteína ²²⁸. Además, la observación de una menor tasa de la secreción de sTWEAK en placas ateroscleróticas carotídeas en comparación con arterias normales, apoyan la relación entre el efecto lipotóxico de la acumulación anormal de lípidos y la síntesis de TWEAK ²²⁰.

En general, los mecanismos que conducen a la reducción de los niveles del sTWEAK en enfermedades y/o comorbilidades asociadas con el riesgo cardiovascular con perfil inflamatorio permanecen todavía sin definir. Se ha postulado que la reducción de los niveles séricos del sTWEAK sería secundario a la interacción de éste con su receptor Fn14. Situándose en el contexto de obesidad o de diabetes, se ha descrito una mayor expresión de ARNm de Fn14 y de TWEAK en tejido adiposo de pacientes con obesidad severa en comparación con la de sujetos delgados ^{215,228,312}. También, se ha visto que la expresión de Fn14 era superior en los obesos mórbidos respecto a los no obesos, sobre todo en las mujeres que presentaban DMT2, mientras

que los niveles de expresión de TWEAK no se encontraban alterados ni en función del grado de obesidad o la presencia o no de diabetes ²¹⁵. Del mismo modo, se ha demostrado una sobre-expresión del Fn14 en respuesta a estímulos inflamatorios en células de tejido adiposo ^{225,228}. Por lo tanto, es lógico pensar, que los niveles bajos de sTWEAK observados en nuestro estudio en los sujetos con DMT2 incidente (96% de los cuales eran obesos) y en los que presentaban SM, pueden ser un reflejo de la disponibilidad incrementada de Fn14 para su ligando sTWEAK, conduciendo así a una reducción de los niveles periféricos del sTWEAK.

Una hipótesis alternativa propone la participación de CD163 el cual actúa como un receptor del sTWEAK en ciertas condiciones patológicas o en células carentes de Fn14 como los monocitos-macrófagos ^{222,223,239}. Estudios experimentales *in vitro* han demostrado que los macrófagos que expresan CD163 pueden unirse e internalizar al sTWEAK ³¹³, a pesar que hasta el momento se desconoce la existencia de una acción funcional de dicha interacción. También, se ha sugerido que los bajos niveles de sTWEAK podrían estar relacionados con un aumento de los niveles de sCD163 en pacientes con enfermedades asociadas a un aumento del riesgo cardiovascular ^{237,239,310,311}, así como en sujetos obesos con DMT1 ²³⁰. Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos diferencias en los niveles séricos de sCD163 entre casos incidentes de DM y sujetos controles, ni la existencia de alguna relación entre las concentraciones séricas de sTWEAK y de sCD163. Por lo tanto, no podemos sugerir que los niveles bajos de sTWEAK hallados en este estudio podrían ser justificados a través de la presencia del CD163, un marcador sérico específico del grado de activación de los macrófagos ²⁴¹, los cuales están implicados con el estado de inflamación y de RI asociado a la obesidad.

8.2. Concentraciones séricas del receptor *scavenger* sCD163 y diabetes mellitus tipo 2

Con respecto al sCD163, los resultados obtenidos en nuestro estudio, no demostraron la existencia de relación alguna entre los niveles circulantes de sCD163 y parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa, así como con el desarrollo de DMT2. Por lo tanto, nuestros

Discusión

resultados, no apoyan las recientes evidencias que sugiriendo que el sCD163 está implicado en el desarrollo de la RI ^{247,249,255,260,261}. Igualmente los resultados de nuestro trabajo, no están en concordancia con el único estudio prospectivo realizado hasta el momento, el Copenhagen City Heart Study (CCHS), mostrando que niveles elevados del sCD163 al inicio del estudio se asociaron positivamente con el riesgo de desarrollar DMT2 ²⁵⁰. Las discrepancias entre nuestros resultados y los reportados por este estudio, podrían justificarse en parte por el diseño del estudio y el tipo de población estudiada. Nuestra población estaba compuesta por un grupo de individuos de edad avanzada con factores de riesgo cardiovascular, mientras que el CCHS incluyó sujetos de la población general Danesa de más de 20 años de edad.

Cabe destacar que una limitación importante del CCHS, es la falta de ajustes rigurosos de los modelos estadísticos, para importantes factores confusores del riesgo de diabetes como la obesidad abdominal, variables bioquímicas como GPA y perfil lipídico, hábitos dietéticos, toma de medicación así como diferentes comorbilidades. Otro aspecto a destacar es que los nuevos casos diagnosticados de DMT2 entre la población Danesa fueron obtenidos a partir de los registros nacionales Daneses, a diferencia de nuestro estudio donde todos los nuevos diabéticos se identificaron siempre con dos pruebas analíticas confirmatorias.

En vista de todo ello, creemos que son necesarios más estudios prospectivos de cohortes con un control más riguroso de posibles variables confusoras para poder concluir que existe una relación causal entre los niveles de sCD163 y el desarrollo de DMT2.

8.3. Concentraciones séricas del ratio sCD163/sTWEAK y diabetes mellitus tipo 2

Recientemente, también se ha identificado el ratio sCD163/sTWEAK como un biomarcador potencial de aterosclerosis tanto clínica como subclínica ^{237,313}. Asimismo, se ha demostrado que un mayor ratio sCD163/sTWEAK se asocia con un mayor riesgo de mortalidad cardiovascular a largo plazo en pacientes con enfermedad vascular periférica ²³⁹. Así pues, parece razonable plantear la hipótesis que un desequilibrio entre sTWEAK y sCD163 podría ser un factor clave en

la patogénesis de la RI asociada a la obesidad. De hecho, los resultados de nuestro estudio muestran por primera vez una correlación positiva entre el ratio sCD163/sTWEAK y el HOMA-IR tanto en los individuos con DMT2 incidente como en los controles. Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos ninguna asociación entre el ratio sCD163/sTWEAK y el riesgo de incidencia de DMT2. Por lo que son necesarios más estudios prospectivos para determinar si el ratio sCD163/sTWEAK podría ser considerado un indicador de riesgo de DMT2.

8.4. Concentraciones séricas de osteocalcina y diabetes mellitus tipo 2

Recientemente, estudios experimentales en modelos animales así como en humanos han descrito a la OC como un nuevo nexo de unión entre el hueso y el metabolismo de la glucosa. Los resultados reportados por nuestro estudio han demostrado que bajas concentraciones séricas tanto de OCnc como de OCc al inicio del estudio se asocian independientemente con un mayor riesgo de desarrollar DMT2, después de rigurosos ajustes de los modelos estadísticos por importantes posibles factores de confusión. Nuestros resultados sugieren pues que OC, un componente de la matriz ósea, podría ser un biomarcador temprano de riesgo de DMT2.

Hasta donde nosotros sabemos, solamente dos estudios epidemiológicos habían intentado determinar la relación existente entre la OC y el desarrollo de DMT2, siendo los resultados contradictorios ^{294,295}. En un estudio de casos y controles anidado, prospectivo, realizado por Ngarmukos y colaboradores, bajas concentraciones séricas de COc al inicio del estudio (pero no de OCnc) se asociaron con un mayor riesgo de desarrollar DMT2 tras diez años de seguimiento ²⁹⁵. Sin embargo, otro estudio de cohortes retrospectivo de 8,5 años de seguimiento realizado por Hwang y colaboradores no mostró ninguna asociación entre los niveles periféricos de OC total y el riesgo de desarrollar DMT2 ²⁹⁶. Algunos factores que podrían explicar en parte las discrepancias entre nuestro estudio y el estudio realizado por Hwang ²⁹⁶ son diferencias en la metodología, análisis estadístico o en la selección de la población estudiada. Así pues, cabe destacar que uno de los aspectos más importantes de nuestro estudio es que los resultados

Discusión

obtenidos han contribuido a esclarecer los resultados contradictorios previamente publicados respecto la relación existente entre la OC, así como la forma de OC, y la aparición de la DMT2.

En concordancia con nuestros resultados, numerosos estudios transversales han observado una relación inversa entre ambas formas de OC y la glucemia en ayunas, los niveles de HbA1c, insulina, y el índice HOMA-IR ^{277,287,312,315}, y positiva con el HOMA-%B (es decir, la función de las células β) ^{275,287,316}. De la misma manera, Pittas y colaboradores ²⁸⁸ en un subanálisis prospectivo, encontraron que las concentraciones de OC total de todas las mediciones disponibles [la determinación de OC total incluyó ambas OCc y OCnc, al inicio del estudio y durante el seguimiento (meses 6, 12 y 18)], se asociaron inversamente con los cambios en la GPA a los tres años de seguimiento. Shea y colaboradores ²⁹³, encontraron que las concentraciones séricas de OC total y OCc al inicio del estudio, pero no de OCnc, se asociaron de forma inversa con cambios en los niveles de HOMA-IR a los tres años de seguimiento. Asimismo, en un estudio previo de nuestro grupo se observó que los cambios a los dos años de seguimiento en los niveles séricos de OC total y OCnc se asociaron positivamente con los cambios en el HOMA-%B y negativamente con los cambios en el HOMA-IR, respectivamente ²⁹². Todos estos hallazgos en conjunto sugieren que en humanos ambas formas de OC juegan un papel importante en la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Además apoyan los resultados descritos en nuestro estudio donde hemos observado que ambas formas de OC protegen frente al desarrollo de DMT2.

Aunque, todavía no está claro cuál de las formas de OC está más estrechamente relacionada con la secreción o la sensibilidad de la insulina en humanos. Los estudios experimentales en modelos animales inicialmente revelaron que la OCnc era la forma activa de la OC ²⁶⁴. Pero recientemente, se ha mostrado que ambas formas de OC estimulan el transporte de glucosa en ausencia (basal) y en presencia de insulina tanto en adipocitos como miocitos ³²¹. Por lo tanto, se ha propuesto que las acciones diferenciales de la OC sobre metabolismo de la glucosa pueden ser especie-dependientes. También, se ha sugerido que en humanos la OCnc sería la que ejerce mayor efecto sobre la función de células β y la OCc sobre la sensibilidad a la insulina ^{280,320}. De hecho, en nuestro estudio, los niveles séricos de OCc fueron asociados inversamente con la RI en

individuos con diabetes incidente y con la GPA en los sujetos control, lo que sugiere que los niveles séricos de OCc podría ser un potencial marcador de alteración del metabolismo de la glucosa en adultos de edad avanzada con elevado riesgo cardiovascular.

Sin embargo, a pesar de que bajos niveles séricos de OCnc al inicio del estudio se asociaron con un menor riesgo de incidencia de DMT2, sorprendentemente no observamos relación alguna entre los niveles de OCnc y diferentes parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa. Esto es consistente con diferentes estudios donde los niveles de OCnc no fueron asociados con el HOMA-IR ³¹⁶⁻³¹⁸. La relación inversa observada en nuestro estudio entre la OCnc y la incidencia de DMT2, podría estar mediada por un mecanismo no dependiente del metabolismo de la glucosa. En varios estudios realizados en adultos han encontrado una relación negativa entre las concentraciones de OCnc y marcadores de obesidad asociados con RI como el IMC y el perímetro abdominal ³¹⁹, así como con el porcentaje de grasa troncular o el índice grasa visceral/grasa subcutánea ²⁸¹. Resulta plausible considerar que el efecto protector de la OCnc sobre la DMT2 podría estar mediado en parte por la cantidad de masa grasa, especialmente de grasa abdominal, ya que en nuestro estudio el grado de asociación entre los niveles de OCnc y el riesgo de desarrollar diabetes se atenuó tras ajustar por el perímetro abdominal.

Los mecanismos mediante los cuales la OC puede regular el metabolismo de la glucosa y la RI protegiendo frente al desarrollo de diabetes en humanos hasta el momento no están claramente determinados ^{280,320}. Los estudios experimentales en ratones, han demostrado que la OC y especialmente la OCnc incrementa la expresión y secreción de insulina y la proliferación de las células β . Curiosamente, estos mismo efectos han sido recientemente confirmados *in vitro* utilizando cultivos de islotes pancreáticos de humanos e *in vivo* en ratones no diabéticos inmunodeficientes a los que se les trasplantaron islotes humanos.

Con lo que respecta a la relación OC y RI, en cultivo primario de adipocitos de rata se ha visto que la OCnc y la OCc incrementan la captación glucosa tanto basal como estimulada por insulina, así como la sensibilidad a la insulina. Del mismo modo, se ha visto que la OCc promueve la

Discusión

oxidación de la glucosa en el adipocito, y el transporte de glucosa tanto en ausencia como en presencia de la insulina en miocitos. A pesar de que estos efectos de la OCc sobre la sensibilidad a la insulina deben ser confirmados en humanos, nos proporcionan las bases fisiopatológicas o la plausibilidad biológica que podría justificar en parte los resultados principales resultados obtenidos en nuestro estudio.

Por otro lado, se ha sugerido que la OC incrementa la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos a través de su regulación positiva de la expresión del gen de la adiponectina en los adipocitos ^{264,325}. En concordancia, numerosos estudios en humanos han observado una asociación positiva entre las concentraciones circulantes de OC y adiponectina ^{283,312,318,321}. Sin embargo, en nuestro estudio hemos observado que ambas formas de OC fueron significativamente e inversamente asociadas al riesgo de desarrollar DMT2 independientemente de los niveles circulantes de adiponectina. Así pues, los resultados de nuestro estudio sugieren que la adiponectina tuvo una pequeña o nula relación en las asociaciones observadas.

Finalmente, otro posible mecanismo que podría explicar el papel protector de la OC frente a la RI y el desarrollo la DMT2 observado en nuestro estudio es a través de la inflamación. Son varios los estudios en humanos que han observado una correlación negativa entre los niveles de OC y marcadores de inflamación como PCR e IL-6 ^{288,321,322}. Sin embargo, nosotros solo podemos hipotetizar sin establecer ninguna conclusión al respecto, ya que en nuestro estudio no se evaluó el efecto de la OC sobre la inflamación y la regulación de la homeostasis de la glucosa.

8.5. Limitaciones y fortalezas

Existen diferentes limitaciones en los estudios presentados en esta Tesis Doctoral. En primer lugar, una de las principales limitaciones es la población estudiada. Se trata de una población caucásica de edad avanzada y elevado riesgo cardiovascular. Por lo tanto, nuestros resultados pueden no ser extrapolables a otros grupos de edad o etnias así como a sujetos sanos sin factores de riesgo.

Otras limitaciones de nuestros estudios son inherentes al diseño. El diseño transversal utilizado para analizarla relación entre el sTWEAK y la prevalencia de SM o las diferentes variables clínicas que lo definen no nos permite establecer relaciones causa-efecto, ya que existe la posibilidad de un sesgo de casualidad inversa. Respecto al diseño del estudio de casos-contrroles anidados, un aspecto que afecta a este tipo de estudios es que los sujetos elegidos aleatoriamente como controles de la población de sujetos que no incidieron de diabetes, pueden no ser plenamente representativos de la cohorte original de PREDIMED. Por lo tanto, será importante en el futuro confirmar prospectivamente la asociación entre los niveles séricos de ambos biomarcadores, sTWEAK y OC, y el riesgo de desarrollar DMT2 incluyendo todos los sujetos de la cohorte PREDIMED al inicio del estudio.

Por último, los marcadores bioquímicos evaluados (el sTWEAK, receptor *scavenger* sCD163 y OC) fueron determinados una sola vez al inicio del estudio en nuestros participantes, y por lo tanto no se pudo evaluar los efectos de los cambios en los niveles circulantes de estos marcadores sobre la evolución en el tiempo de los parámetros relacionados con el metabolismo de glucosa.

Como punto fuerte del estudio destacar que la incidencia de DMT2 fue un objetivo secundario específico del ensayo PREDIMED y en los tres nodos incluidos en el estudio, el diagnóstico de los nuevos casos de DMT2 se realizó según los criterios establecidos por la ADA. Concretamente por la presencia de los niveles de GPA ≥ 126 mg/dl o glucemia plasmática a las dos horas después de la PTOG con 75 de glucosa ≥ 200 mg/dl, y siendo necesaria una segunda determinación analítica que cumpliera con estos criterios para la confirmación final del diagnóstico de DMT2. Además, destacar que el nodo Reus-Tarragona fue el único nodo que realizó la PTOG de forma generalizada como parte del protocolo de estudio ofreciendo posiblemente, una mayor sensibilidad y especificidad en la identificación de nuevos casos de DMT2.

Otros puntos fuertes de nuestro estudio es que incluye un número relativamente elevado de nuevos casos de DMT2, un período de seguimiento de largo tiempo, la inclusión de individuos de ambos sexos, y el control de un gran número de posibles variables de confusión.

Discusión

8.5. Implicaciones y propuestas de futuro

La DMT2 es una enfermedad con elevada morbilidad y una importante causa de mortalidad prematura, la cual en gran medida se podría prevenir. Los actuales resultados de este trabajo, permitirán a la comunidad científica avanzar en el conocimiento de estos nuevos potenciales biomarcadores implicados en la fisiopatología de la DMT2, guiar las estrategias de *screening* para pronósticos de riesgos y aportar información a los factores de riesgo ya existentes, así como proporcionar una base para el planteamiento de nuevas enfoques terapéuticos para su tratamiento y/o prevención.

La importancia clínica de nuestros resultados debe ser confirmada mediante la futura realización de nuevos estudios prospectivos en grandes cohortes poblacionales que incluyan pacientes con diferentes grados de obesidad y de alteraciones en el metabolismo de la glucosa, rangos de edad y pertenecientes a ambos sexos. Solo así, será posible obtener la confirmación de si los niveles circulantes de sTWEAK y OC son útiles como biomarcadores independientes del desarrollo de DMT2. Por otro lado, la mayoría de estudios realizados hasta el momento coinciden en que los biomarcadores disponibles aportan muy poca información adicional incrementando sólo ligeramente la capacidad pronostica tanto en la prevención primaria como en la secundaria de los factores de riesgo clásicos. Así pues, otra propuestas de futuro atractiva es evaluar si la medición de sTWEAK y OC individualmente o en combinación con algunos otros biomarcadores de interés (panel de múltiples biomarcadores) mejora la capacidad de predicción del riesgo por encima y más allá de los abordajes actuales ⁶.

Finalmente, los estudios experimentales en modelos animales, así como los realizados en células humanas han demostrado que tanto la OC como el sTWEAK pueden ejercer un efecto beneficioso sobre la secreción y sensibilidad de la insulina, demostrando una caracterización adecuada de la regulación de las vías que controlan su señalización. Aunque todavía se requieren más estudios al respecto, los sistemas OC-GPRC6A y sTWEAK-Fn14 representan una nueva diana terapéutica prometedora para el control y prevención de la DMT2.

En conclusión, aunque en espera de nuevas y prospectivas investigaciones, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren un papel protector para sTWEAK en la prevención de la aparición de DMT2. Y más concretamente, como una primera interpretación de los niveles bajos de sTWEAK en sujetos de edad avanzada con alto riesgo cardiovascular donde la mayoría presentan sobrepeso y/u obesidad sería que, la ausencia de sTWEAK contribuiría al desarrollo de DMT2 y está vinculada con la presencia de SM, un trastorno metabólico con perfil inflamatorio subyacente de la obesidad abdominal y de la RI. Así pues, estos resultados indican que la cuantificación de esta proteína en el suero podría ser un nuevo marcador biológico para predecir la DMT2, el SM y las complicaciones metabólicas asociadas. Además, hemos podido esclarecer los conocimientos del efecto protector de la OC frente al desarrollo de DMT2, poner en relieve que en humanos ambas formas de OC son biológicamente activas, y que niveles bajos de OC podrían ser útiles como un potencial biomarcador de riesgo temprano de DMT2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

9. CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

9. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en esta Tesis se puede concluir:

En un grupo de individuos de ambos sexos, edad avanzada, asintomáticos, con alto riesgo de enfermedad cardiovascular y sin diagnóstico de diabetes al inicio del estudio:

Las concentraciones séricas de sTWEAK se relacionan inversamente con la resistencia a la insulina. Asimismo, los niveles séricos bajos de sTWEAK al inicio del estudio se asocian con un mayor riesgo de incidencia de DMT2.

Las concentraciones séricas de sCD163 no se relacionan significativamente con parámetros del metabolismo de la glucosa, y no se asocian con la incidencia de DMT2.

Unos niveles séricos bajos de sTWEAK se asocian con una mayor prevalencia de SM; siendo la obesidad abdominal, la hipertrigliceridemia y la hiperglucemia los principales contribuyentes de esta asociación.

Las concentraciones séricas circulantes de ambas COc y COnc reducidas al inicio del estudio se asocian fuerte e independientemente con un mayor riesgo de desarrollar DMT2.

Conclusiones

En conclusión, este trabajo aporta información novedosa y relevante, sugiriendo al sTWEAK y a la OC como nuevos potenciales biomarcadores implicados en la fisiopatología de la DMT2 que podrían ser utilizados en un futuro en la detección precoz del riesgo de la enfermedad. No obstante, son necesarios más estudios en otras poblaciones para corroborar si el sTWEAK y/o la OC individualmente o en combinación con algunos otros biomarcadores mejoran la capacidad de predicción del riesgo de DMT2 por encima de los abordajes actuales.

10. BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Whiting, D. R., 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): 311–321.
2. Shaw, J. E., Sicree, R. A. & Zimmet, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 . *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2010; 87(1): 4–14.
3. Roglic, G. & Unwin, N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010 . *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2010; 87(1): 15–19.
4. IDF Diabetes Atlas. in *6th ed* (2013). at <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>.
5. Sattar, N., Wannamethee, S. G. & Forouhi, N. G. Novel biochemical risk factors for type 2 diabetes: pathogenic insights or prediction possibilities? *Diabetologia* 2008; 51(6): 926–40.
6. Herder, C., Karakas, M. & Koenig, W. Biomarkers for the prediction of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011; 90(1): 52–66.
7. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes --2014. *Diabetes Care* 2014; 37 Suppl 1: S14-80.
8. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26 Suppl 1 S5–20.
9. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes* 1979; 28(12): 1039–57.
10. World Health Organization. Second report of the WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. (Tech. Rep. Ser., n°. 646). Ginebra, World Health Org., 1980. 1980; at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6771926>>.
11. World Health Organization. Diabetes Mellitus: Report of a WHO Study Group. (Tech. Rep. Ser., n°. 727). Ginebra, World Health Org.; 1985. 1985; 727
12. World Health Organization. Second report of prevention of Diabetes Mellitus. (Tech. Rep. Ser.,n°. 884). Ginebra, World Health Org.; 1994. 1994;
13. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20(7): 1183–97.
14. Gillett, M. J. International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes: *Diabetes Care* 2009; 32(7): 1327-1334. *Clin. Biochem. Rev.* 2009; 30(4): 197–200.
15. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2010. *Diabetes Care* 2010; 33 Suppl 1 S11–61.
16. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: estimates for the year 2011. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2013; 100(2): 277–9.
17. Rosado Martín, J., Martínez López, M. Á., Mantilla Morató, T., Dujovne Kohan, I., Palau Cuevas, F. J., Torres Jiménez, R., *et al.*[Prevalence of diabetes in an adult population in the region of Madrid (Spain). The Madrid Cardiovascular Risk study]. *Gac. Sanit.*26(3): 243–50.
18. Giralt Muiña, P., Gutiérrez Ávila, G., Ballester Herrera, M. J., Botella Romero, F. & Angulo Donado, J. J. [Prevalence of known diabetes mellitus and unknown diabetes in adults from Castilla-La Mancha, Spain]. *Med. Clin. (Barc).* 2011; 137(11): 484–90.

Bibliografía

19. Boronat, M., Varillas, V. F., Saavedra, P., Suárez, V., Bosch, E., Carrillo, A., *et al.* Diabetes mellitus and impaired glucose regulation in the Canary Islands (Spain): prevalence and associated factors in the adult population of Telde, Gran Canaria. *Diabet. Med.* 2006; 23(2): 148–55.
20. Medrano, M. J., Cerrato, E., Boix, R. & Delgado-Rodríguez, M. [Cardiovascular risk factors in Spanish population: metaanalysis of cross-sectional studies]. *Med. Clin. (Barc)*. 2005; 124(16): 606–12.
21. Masiá, R., Sala, J., Rohlf, I., Piulats, R., Manresa, J. M. & Marrugat, J. [Prevalence of diabetes mellitus in the province of Girona, Spain: the REGICOR study]. *Rev. española Cardiol.* 2004; 57(3): 261–4.
22. Botas, P., Delgado, E., Castaño, G., Díaz de Greñu, C., Prieto, J. & Díaz-Cadorniga, F. J. Comparison of the diagnostic criteria for diabetes mellitus, WHO-1985, ADA-1997 and WHO-1999 in the adult population of Asturias (Spain). *Diabet. Med.* 2003; 20(11): 904–8.
23. De Pablos-Velasco, P. L., Martínez-Martín, F. J., Rodríguez-Pérez, F., Anía, B. J., Losada, A. & Betancor, P. Prevalence and determinants of diabetes mellitus and glucose intolerance in a Canarian Caucasian population - comparison of the 1997 ADA and the 1985 WHO criteria. The Guía Study. *Diabet. Med.* 2001; 18(3): 235–41.
24. Castell, C., Tresserras, R., Serra, J., Goday, A., Lloveras, G. & Salleras, L. Prevalence of diabetes in Catalonia (Spain): an oral glucose tolerance test-based population study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1999; 43(1): 33–40.
25. Muniz, J., Hervada, J., Juane, R., Lopez-Rodriguez, I. & Castro-Beiras, A. Prevalence of diabetes mellitus in the population aged 40-69 years in Galicia, northwest Spain. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1995; 30(2): 137–42.
26. Bayo, J., Sola, C., García, F., Latorre, P. M. & Vázquez, J. A. [Prevalence of non-insulin dependent diabetes mellitus in Lejona (Vizcaya, Spain)]. *Med. Clin. (Barc)*. 1993; 101(16): 609–12.
27. Franch Nadal, J., Alvarez Torices, J. C., Alvarez Guisasola, F., Diego Domínguez, F., Hernández Mejía, R. & Cueto Espinar, A. [Epidemiology of diabetes mellitus in the province of Leon]. *Med. Clin. (Barc)*. 1992; 98(16): 607–11.
28. Valdés, S., Rojo-Martínez, G. & Soriguer, F. [Evolution of prevalence of type 2 diabetes in adult Spanish population]. *Med. Clin. (Barc)*. 2007; 129(9): 352–5.
29. 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.
30. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad - Portal Estadístico del SNS - Sistema de Información Sanitaria: Portal Estadístico del SNS - Encuesta Europea de Salud en España 2009. 2009; at <<http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/EncuestaEuropea/resultados.htm>>.
31. Jansson, S. P. O., Andersson, D. K. G. & Svärdsudd, K. Prevalence and incidence rate of diabetes mellitus in a Swedish community during 30 years of follow-up. *Diabetologia* 2007; 50(4): 703–10.
32. Ringborg, A., Lindgren, P., Martinell, M., Yin, D. D., Schön, S. & Stålhammar, J. Prevalence and incidence of Type 2 diabetes and its complications 1996-2003--estimates from a Swedish population-based study. *Diabet. Med.* 2008; 25(10): 1178–86.
33. Soriguer, F., Rojo-Martínez, G., Almaraz, M. C., Esteva, I., Ruiz de Adana, M. S., Morcillo, S., *et al.* Incidence of type 2 diabetes in southern Spain (Pizarra Study). *Eur. J. Clin. Invest.* 2008; 38(2): 126–33.

34. Vilbergsson, S., Sigurdsson, G., Sigvaldason, H., Hreidarsson, A. B. & Sigfusson, N. Prevalence and incidence of NIDDM in Iceland: evidence for stable incidence among males and females 1967-1991--the Reykjavik Study. *Diabet. Med.* 1997; 14(6): 491-8.
35. Forouhi, N. G., Luan, J., Hennings, S. & Wareham, N. J. Incidence of Type 2 diabetes in England and its association with baseline impaired fasting glucose: the Ely study 1990-2000. *Diabet. Med.* 2007; 24(2): 200-7.
36. Bonora, E., Kiechl, S., Willeit, J., Oberhollenzer, F., Egger, G., Meigs, J. B., *et al.* Population-based incidence rates and risk factors for type 2 diabetes in white individuals: the Bruneck study. *Diabetes* 2004; 53(7): 1782-9.
37. Rathmann, W., Strassburger, K., Heier, M., Holle, R., Thorand, B., Giani, G., *et al.* Incidence of Type 2 diabetes in the elderly German population and the effect of clinical and lifestyle risk factors: KORA S4/F4 cohort study. *Diabet. Med.* 2009; 26(12): 1212-9.
38. InterAct Consortium. Design and cohort description of the InterAct Project: an examination of the interaction of genetic and lifestyle factors on the incidence of type 2 diabetes in the EPIC Study. *Diabetologia* 2011; 54(9): 2272-82.
39. Meisinger, C., Thorand, B., Schneider, A., Stieber, J., Döring, A. & Löwel, H. Sex differences in risk factors for incident type 2 diabetes mellitus: the MONICA Augsburg cohort study. *Arch. Intern. Med.* 2002; 162(1): 82-9.
40. Hippisley-Cox, J., Coupland, C., Robson, J., Sheikh, A. & Brindle, P. Predicting risk of type 2 diabetes in England and Wales: prospective derivation and validation of QDScore. *BMJ* 2009; 338 b880.
41. Goday, A. [Epidemiology of diabetes and its non-coronary complications]. *Rev. española Cardiol.* 2002; 55(6): 657-70.
42. Goday Goday A. Goday A; Delgado, E; Diaz Cadorniga, F; Pablos, P de; Vazquez, JA; Soto, E. Epidemiología de la diabetes tipo 2 en España. *Endocrinol Nutr* 2002;49(4):113-26. 2002;
43. Vázquez, J. A., Gaztambide, S. & Soto-Pedre, E. [10-year prospective study on the incidence and risk factors for type 2 diabetes mellitus]. *Med. Clin. (Barc).* 2000; 115(14): 534-9.
44. Valdés, S., Botas, P., Delgado, E., Alvarez, F. & Cadorniga, F. D. Population-based incidence of type 2 diabetes in northern Spain: the Asturias Study. *Diabetes Care* 2007; 30(9): 2258-63.
45. Costa, B., Piñol, J. L., Martín, F., Donado, A. & Castell, C. [Significant incidence of type 2 diabetes on high-risk Spanish population. The IGT Study (2)]. *Med. Clin. (Barc).* 2002; 118(8): 287-93.
46. Mata-Cases, M., Fernández-Bertolín, E., Cos-Claramunt, X., García-Durán, M., Mateu-Gelabert, T., Pareja-Rossell, C., *et al.* [Incidence of type 2 diabetes and its diagnosis process in the decade 1991-2000 in a primary health care centre]. *Gac. Sanit.* 2006; 20(2): 124-31.
47. Martín Martínez, M. A., Carmona Alférez, R., Prado Galbarro, F. J. & Sarría Santamera, A. [Incidence and prevalence of diabetes in an adult population of Madrid (Spain): a study using computerized medical records in primary care]. *Gac. Sanit.* 2013; 27(3): 284-5.
48. Reaven, G. M. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol. Rev.* 1995; 75(3): 473-86.
49. Reaven, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37(12): 1595-607.
50. Pirola, L., Johnston, A. M. & Van Obberghen, E. Modulation of insulin action. *Diabetologia* 2004; 47(2): 170-184.

Bibliografia

51. Stumvoll, M., Goldstein, B. J. & van Haeften, T. W. Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. *Lancet* 2008; 371(9631): 2153-6.
52. Stumvoll, M., Goldstein, B. J. & van Haeften, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005; 365(9467): 1333-1346.
53. Ascaso, J. F., Pardo, S., Real, J. T., Lorente, R. I., Priego, A. & Carmena, R. Diagnosing insulin resistance by simple quantitative methods in subjects with normal glucose metabolism. *Diabetes Care* 2003; 26(12): 3320-5.
54. Saltiel, A. R. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001; 104(4): 517-29.
55. Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414(6865): 799-806.
56. Bhattacharya, S., Dey, D. & Roy, S. S. Molecular mechanism of insulin resistance. *J. Biosci.* 2007; 32(2): 405-13.
57. Tilg, H. & Moschen, A. R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol. Med.* 14(3-4): 222-31.
58. Ahmad, F., Azevedo, J. L., Cortright, R., Dohm, G. L. & Goldstein, B. J. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J. Clin. Invest.* 1997; 100(2): 449-58.
59. Karlsson, H. K. R. & Zierath, J. R. Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. *Cell Biochem. Biophys.* 2007; 48(2-3): 103-13.
60. Krook, A., Björnholm, M., Galuska, D., Jiang, X. J., Fahlman, R., Myers, M. G., *et al.* Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 49(2): 284-92.
61. Nieto-Vazquez, I., Fernández-Veledo, S., Krämer, D. K., Vila-Bedmar, R., Garcia-Guerra, L. & Lorenzo, M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch. Physiol. Biochem.* 2008; 114(3): 183-94.
62. Groop, L., Forsblom, C., Lehtovirta, M., Tuomi, T., Karanko, S., Nissén, M., *et al.* Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects. *Diabetes* 1996; 45(11): 1585-93.
63. Weijnen, C. F., Rich, S. S., Meigs, J. B., Krolewski, A. S. & Warram, J. H. Risk of diabetes in siblings of index cases with Type 2 diabetes: implications for genetic studies. *Diabet. Med.* 2002; 19(1): 41-50.
64. Flegal, K. M., Ezzati, T. M., Harris, M. I., Haynes, S. G., Juarez, R. Z., Knowler, W. C., *et al.* Prevalence of diabetes in Mexican Americans, Cubans, and Puerto Ricans from the Hispanic Health and Nutrition Examination Survey, 1982-1984. *Diabetes Care* 1991; 14(7): 628-38.
65. Bennet, L., Groop, L., Lindblad, U., Agardh, C.-D. & Franks, P. W. Ethnicity is an independent risk indicator when estimating diabetes risk with FINDRISC scores: A cross sectional study comparing immigrants from the Middle East and native Swedes. *Prim. Care Diabetes* 2014; doi:10.1016/j.pcd.2014.01.002.
66. Bennet, L., Groop, L. & Franks, P. W. Ethnic differences in the contribution of insulin action and secretion to type 2 diabetes in immigrants from the Middle East compared to native Swedes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2014; doi:10.1016/j.diabres.2014.04.025.

67. Doria, A., Patti, M.-E. & Kahn, C. R. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab.* 2008; 8(3): 186–200.
68. Ahlqvist, E., Ahluwalia, T. S. & Groop, L. Genetics of type 2 diabetes. *Clin. Chem.* 2011; 57(2): 241–54.
69. Sun, X., Yu, W. & Hu, C. Genetics of Type 2 Diabetes: Insights into the Pathogenesis and Its Clinical Application. *Biomed Res. Int.* 2014; 2014 926713.
70. Voight, B. F., Scott, L. J., Steinthorsdottir, V., Morris, A. P., Dina, C., Welch, R. P., *et al.* Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat. Genet.* 2010; 42(7): 579–89.
71. Saxena, R., Elbers, C. C., Guo, Y., Peter, I., Gaunt, T. R., Mega, J. L., *et al.* Large-scale gene-centric meta-analysis across 39 studies identifies type 2 diabetes loci. *Am. J. Hum. Genet.* 2012; 90(3): 410–25.
72. Almind, K., Bjørbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Echwald, S. & Pedersen, O. Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1993; 342(8875): 828–32.
73. Sesti, G., Marini, M. A., Cardellini, M., Sciacqua, A., Frontoni, S., Andreozzi, F., *et al.* The Arg972 variant in insulin receptor substrate-1 is associated with an increased risk of secondary failure to sulfonylurea in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(6): 1394–8.
74. Villareal, D. T., Robertson, H., Bell, G. I., Patterson, B. W., Tran, H., Wice, B., *et al.* TCF7L2 variant rs7903146 affects the risk of type 2 diabetes by modulating incretin action. *Diabetes* 2010; 59(2): 479–85.
75. Brunetti, A., Brunetti, L., Foti, D., Accili, D. & Goldfine, I. D. Human diabetes associated with defects in nuclear regulatory proteins for the insulin receptor gene. *J. Clin. Invest.* 1996; 97(1): 258–62.
76. Foti, D., Iuliano, R., Chiefari, E. & Brunetti, A. A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP beta, and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 2003; 23(8): 2720–32.
77. Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A. U., *et al.* New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* 2010; 42(2): 105–16.
78. Béréziat, V., Kasus-Jacobi, A., Perdereau, D., Cariou, B., Girard, J. & Burnol, A.-F. Inhibition of insulin receptor catalytic activity by the molecular adapter Grb14. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(7): 4845–52.
79. Fazeli Farsani, S., van der Aa, M. P., van der Vorst, M. M. J., Knibbe, C. A. J. & de Boer, A. Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches. *Diabetologia* 2013; 56(7): 1471–88.
80. Lee, A. J., Hiscock, R. J., Wein, P., Walker, S. P. & Permezel, M. Gestational diabetes mellitus: clinical predictors and long-term risk of developing type 2 diabetes: a retrospective cohort study using survival analysis. *Diabetes Care* 2007; 30(4): 878–83.
81. Gillies, C. L., Abrams, K. R., Lambert, P. C., Cooper, N. J., Sutton, A. J., Hsu, R. T., *et al.* Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007; 334(7588): 299.
82. Nelson, K. M., Reiber, G. & Boyko, E. J. Diet and exercise among adults with type 2 diabetes: findings from the third national health and nutrition examination survey (NHANES III). *Diabetes Care* 2002; 25(10): 1722–8.

Bibliografia

83. Knowler, W. C., Barrett-Connor, E., Fowler, S. E., Hamman, R. F., Lachin, J. M., Walker, E. A., *et al.* Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346(6): 393-403.
84. Koloverou, E., Esposito, K., Giugliano, D. & Panagiotakos, D. The effect of Mediterranean diet on the development of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 10 prospective studies and 136,846 participants. *Metabolism.* 2014; 63(7): 903-11.
85. Khemayanto, H. & Shi, B. Role of Mediterranean diet in prevention and management of type 2 diabetes. *Chin. Med. J. (Engl).* 2014; 127(20): 3651-6.
86. Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C. & Trichopoulos, D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(26): 2599-608.
87. Trichopoulou, A., Kouris-Blazos, A., Wahlgqvist, M. L., Gnardellis, C., Lagiou, P., Polychronopoulos, E., *et al.* Diet and overall survival in elderly people. *BMJ* 1995; 311(7018): 1457-60.
88. Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Estruch, R., Ros, E., Covas, M.-I., Ibarrola-Jurado, N., *et al.* Prevention of diabetes with Mediterranean diets: a subgroup analysis of a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 2014; 160(1): 1-10.
89. Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Babio, N., Martínez-González, M. Á., Ibarrola-Jurado, N., Basora, J., *et al.* Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care* 2011; 34(1): 14-9.
90. Romaguera, D., Guevara, M., Norat, T., Langenberg, C., Forouhi, N. G., Sharp, S., *et al.* Mediterranean diet and type 2 diabetes risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study: the InterAct project. *Diabetes Care* 2011; 34(9): 1913-8.
91. Esposito, K., Maiorino, M. I., Ceriello, A. & Giugliano, D. Prevention and control of type 2 diabetes by Mediterranean diet: a systematic review. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2010; 89(2): 97-102.
92. Shai, I., Schwarzfuchs, D., Henkin, Y., Shahar, D. R., Witkow, S., Greenberg, I., *et al.* Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359(3): 229-41.
93. Esposito, K., Maiorino, M. I., Ciotola, M., Di Palo, C., Scognamiglio, P., Gicchino, M., *et al.* Effects of a Mediterranean-style diet on the need for antihyperglycemic drug therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 2009; 151(5): 306-14.
94. Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvado, J., Covas, M. I., D, P., Corella, D., *et al.* Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet . *N. Engl. J. Med.* 2013; doi:10.1056/NEJMoa1200303.
95. Martinez-Gonzalez, M. A., Corella, D., Salas-Salvado, J., Ros, E., Covas, M. I., Fiol, M., *et al.* Cohort Profile: Design and methods of the PREDIMED study . *Int. J. Epidemiol.* 2012; 41(2): 377-385.
96. Estruch, R., Martinez-Gonzalez, M. A., Corella, D., Salas-Salvado, J., Ruiz-Gutierrez, V., Covas, M. I., *et al.* Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial . *Ann. Intern. Med.* 2006; 145(1): 1-11.
97. Liese, A. D., Nichols, M., Sun, X., D'Agostino, R. B. & Haffner, S. M. Adherence to the DASH Diet is inversely associated with incidence of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes Care* 2009; 32(8): 1434-6.
98. De Koning, L., Chiuve, S. E., Fung, T. T., Willett, W. C., Rimm, E. B. & Hu, F. B. Diet-quality scores and the risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care* 2011; 34(5): 1150-6.

99. Tonstad, S., Stewart, K., Oda, K., Batech, M., Herring, R. P. & Fraser, G. E. Vegetarian diets and incidence of diabetes in the Adventist Health Study-2. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2013; 23(4): 292-9.
100. Heidemann, C., Hoffmann, K., Spranger, J., Klipstein-Grobusch, K., Möhlig, M., Pfeiffer, A. F. H., *et al.* A dietary pattern protective against type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)--Potsdam Study cohort. *Diabetologia* 2005; 48(6): 1126-34.
101. Imamura, F., Lichtenstein, A. H., Dallal, G. E., Meigs, J. B. & Jacques, P. F. Generalizability of dietary patterns associated with incidence of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; 90(4): 1075-83.
102. McNaughton, S. A., Mishra, G. D. & Brunner, E. J. Dietary patterns, insulin resistance, and incidence of type 2 diabetes in the Whitehall II Study. *Diabetes Care* 2008; 31(7): 1343-8.
103. Kastorini, C.-M. & Panagiotakos, D. B. Dietary patterns and prevention of type 2 diabetes: from research to clinical practice; a systematic review. *Curr. Diabetes Rev.* 2009; 5(4): 221-7.
104. Esposito, K., Kastorini, C.-M., Panagiotakos, D. B. & Giugliano, D. Prevention of type 2 diabetes by dietary patterns: a systematic review of prospective studies and meta-analysis. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 2010; 8(6): 471-6.
105. Van Dam, R. M., Rimm, E. B., Willett, W. C., Stampfer, M. J. & Hu, F. B. Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men. *Ann. Intern. Med.* 136(3): 201-9.
106. Colberg, S. R., Sigal, R. J., Fernhall, B., Regensteiner, J. G., Blissmer, B. J., Rubin, R. R., *et al.* Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Diabetes Care* 2010; 33(12): e147-67.
107. Kesaniemi, Y. K., Danforth, E., Jensen, M. D., Kopelman, P. G., Lefèbvre, P. & Reeder, B. A. Dose-response issues concerning physical activity and health: an evidence-based symposium. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2001; 33(6 Suppl): S351-8.
108. Ford, E. S. & Caspersen, C. J. Sedentary behaviour and cardiovascular disease: a review of prospective studies. *Int. J. Epidemiol.* 2012; 41(5): 1338-53.
109. Jakicic, J. M., Gregg, E., Knowler, W., Kelley, D. E., Lang, W., Miller, G. D., *et al.* Activity patterns of obese adults with type 2 diabetes in the look AHEAD study. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2010; 42(11): 1995-2005.
110. Morrato, E. H., Hill, J. O., Wyatt, H. R., Ghushchyan, V. & Sullivan, P. W. Physical activity in U.S. adults with diabetes and at risk for developing diabetes, 2003. *Diabetes Care* 2007; 30(2): 203-9.
111. Braun, B., Zimmermann, M. B. & Kretchmer, N. Effects of exercise intensity on insulin sensitivity in women with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Appl. Physiol.* 1995; 78(1): 300-6.
112. Ishii, T., Yamakita, T., Sato, T., Tanaka, S. & Fujii, S. Resistance training improves insulin sensitivity in NIDDM subjects without altering maximal oxygen uptake. *Diabetes Care* 1998; 21(8): 1353-5.
113. Colberg, S. R., Sigal, R. J., Fernhall, B., Regensteiner, J. G., Blissmer, B. J., Rubin, R. R., *et al.* Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement executive summary. *Diabetes Care* 2010; 33(12): 2692-6.
114. Knowler, W. C., Fowler, S. E., Hamman, R. F., Christophi, C. A., Hoffman, H. J., Brenneman, A. T., *et al.* 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet* 2009; 374(9702): 1677-86.

Bibliografia

115. Seaquist, E. R., Anderson, J., Childs, B., Cryer, P., Dagogo-Jack, S., Fish, L., *et al.* Hypoglycemia and diabetes: a report of a workgroup of the American Diabetes Association and the Endocrine Society. *Diabetes Care* 2013; 36(5): 1384–95.
116. Aas, A. M., Bergstad, I., Thorsby, P. M., Johannesen, O., Solberg, M. & Birkeland, K. I. An intensified lifestyle intervention programme may be superior to insulin treatment in poorly controlled Type 2 diabetic patients on oral hypoglycaemic agents: results of a feasibility study. *Diabet. Med.* 2005; 22(3): 316–22.
117. Zinman, B., Ruderman, N., Campaigne, B. N., Devlin, J. T. & Schneider, S. H. Physical activity/exercise and diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26 Suppl 1 S73–7.
118. InterAct Consortium. Physical activity reduces the risk of incident type 2 diabetes in general and in abdominally lean and obese men and women: the EPIC-InterAct Study. *Diabetologia* 2012; 55(7): 1944–52.
119. Jeon, C. Y., Lokken, R. P., Hu, F. B. & van Dam, R. M. Physical activity of moderate intensity and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 2007; 30(3): 744–52.
120. Willi, C., Bodenmann, P., Ghali, W. A., Faris, P. D. & Cornuz, J. Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007; 298(22): 2654–64.
121. Wang, Y., Ji, J., Liu, Y., Deng, X. & He, Q. Passive smoking and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS One* 2013; 8(7): e69915.
122. Oberg, M., Jaakkola, M. S., Woodward, A., Peruga, A. & Prüss-Ustün, A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet* 2011; 377(9760): 139–46.
123. Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. N°311 2014; at <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>>.
124. Mokdad, A. H., Ford, E. S., Bowman, B. A., Dietz, W. H., Vinicor, F., Bales, V. S., *et al.* Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 2003; 289(1): 76–9.
125. Daousi, C., Casson, I. F., Gill, G. V, MacFarlane, I. A., Wilding, J. P. H. & Pinkney, J. H. Prevalence of obesity in type 2 diabetes in secondary care: association with cardiovascular risk factors. *Postgrad. Med. J.* 2006; 82(966): 280–4.
126. Nguyen, N. T., Magno, C. P., Lane, K. T., Hinojosa, M. W. & Lane, J. S. Association of hypertension, diabetes, dyslipidemia, and metabolic syndrome with obesity: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *J. Am. Coll. Surg.* 2008; 207(6): 928–34.
127. Guh, D. P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C. L. & Anis, A. H. The incidence of comorbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2009; 9 88.
128. Cassano, P. A., Rosner, B., Vokonas, P. S. & Weiss, S. T. Obesity and body fat distribution in relation to the incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. A prospective cohort study of men in the normative aging study. *Am. J. Epidemiol.* 1992; 136(12): 1474–86.
129. World Health Organization. *Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation, Geneva, 8–11. (2008).* at <http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_report_waistcircumference_and_waisthip_ratio/en/>.
130. Chan, J. M., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J. & Willett, W. C. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 1994; 17(9): 961–9.

131. Kodama, S., Horikawa, C., Fujihara, K., Heianza, Y., Hirasawa, R., Yachi, Y., *et al.* Comparisons of the strength of associations with future type 2 diabetes risk among anthropometric obesity indicators, including waist-to-height ratio: a meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* 2012; 176(11): 959–69.
132. Ohlson, L. O., Larsson, B., Svärdsudd, K., Welin, L., Eriksson, H., Wilhelmsen, L., *et al.* The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes* 1985; 34(10): 1055–8.
133. Snijder, M. B., Dekker, J. M., Visser, M., Bouter, L. M., Stehouwer, C. D. A., Kostense, P. J., *et al.* Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 77(5): 1192–7.
134. Qiao, Q. & Nyamdorj, R. Is the association of type II diabetes with waist circumference or waist-to-hip ratio stronger than that with body mass index? *Eur. J. Clin. Nutr.* 2010; 64(1): 30–4.
135. Huerta, J. M., Tormo, M.-J., Chirlaque, M.-D., Gavrila, D., Amiano, P., Arriola, L., *et al.* Risk of type 2 diabetes according to traditional and emerging anthropometric indices in Spain, a Mediterranean country with high prevalence of obesity: results from a large-scale prospective cohort study. *BMC Endocr. Disord.* 2013; 13 7.
136. Guasch-Ferré, M., Bulló, M., Martínez-González, M. Á., Corella, D., Estruch, R., Covas, M.-I., *et al.* Waist-to-height ratio and cardiovascular risk factors in elderly individuals at high cardiovascular risk. *PLoS One* 2012; 7(8): e43275.
137. Resnick, H. E., Valsania, P., Halter, J. B. & Lin, X. Relation of weight gain and weight loss on subsequent diabetes risk in overweight adults. *J. Epidemiol. Community Health* 2000; 54(8): 596–602.
138. Oguma, Y., Sesso, H. D., Paffenbarger, R. S. & Lee, I.-M. Weight change and risk of developing type 2 diabetes. *Obes. Res.* 2005; 13(5): 945–51.
139. Koh-Banerjee, P., Wang, Y., Hu, F. B., Spiegelman, D., Willett, W. C. & Rimm, E. B. Changes in body weight and body fat distribution as risk factors for clinical diabetes in US men. *Am. J. Epidemiol.* 2004; 159(12): 1150–9.
140. Brancati, F. L., Wang, N. Y., Mead, L. A., Liang, K. Y. & Klag, M. J. Body weight patterns from 20 to 49 years of age and subsequent risk for diabetes mellitus: the Johns Hopkins Precursors Study. *Arch. Intern. Med.* 1999; 159(9): 957–63.
141. Colditz, G. A., Willett, W. C., Rotnitzky, A. & Manson, J. E. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann. Intern. Med.* 1995; 122(7): 481–6.
142. Wannamethee, S. G. Overweight and obesity and weight change in middle aged men: impact on cardiovascular disease and diabetes. *J. Epidemiol. Community Heal.* 2005; 59(2): 134–139.
143. Jacobs-van der Bruggen, M. A. M., Spijkerman, A., van Baal, P. H. M., Baan, C. A., Feskens, E. J. M., Picavet, H. S. J., *et al.* Weight change and incident diabetes: addressing an unresolved issue. *Am. J. Epidemiol.* 2010; 172(3): 263–70.
144. Gregg, E. W., Chen, H., Wagenknecht, L. E., Clark, J. M., Delahanty, L. M., Bantle, J., *et al.* Association of an intensive lifestyle intervention with remission of type 2 diabetes. *JAMA* 2012; 308(23): 2489–96.
145. Aucott, L., Poobalan, A., Smith, W. C. S., Avenell, A., Jung, R., Broom, J., *et al.* Weight loss in obese diabetic and non-diabetic individuals and long-term diabetes outcomes--a systematic review. *Diabetes. Obes. Metab.* 2004; 6(2): 85–94.

Bibliografia

146. Aucott, L. S. Influences of weight loss on long-term diabetes outcomes. *Proc. Nutr. Soc.* 2008; 67(1): 54–9.
147. Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(12): 1821–30.
148. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259(5091): 87–91.
149. Hajri, T., Tao, H., Wattacheril, J., Marks-Shulman, P. & Abumrad, N. N. Regulation of adiponectin production by insulin: interactions with tumor necrosis factor- α and interleukin-6. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011; 300(2): E350–60.
150. Bastard, J.-P., Maachi, M., Van Nhieu, J. T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., *et al.* Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87(5): 2084–9.
151. Samad, F., Yamamoto, K. & Loskutoff, D. J. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 1996; 97(1): 37–46.
152. Ekström, M., Liska, J., Eriksson, P., Sverremark-Ekström, E. & Tornvall, P. Stimulated in vivo synthesis of plasminogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue. *Thromb. Haemost.* 2012; 108(3): 485–92.
153. Sartipy, P. & Loskutoff, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; 100(12): 7265–70.
154. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. & Ferrante, A. W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(12): 1796–808.
155. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 2011; 29 415–45.
156. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11(2): 85–97.
157. Shoelson, S. E., Lee, J. & Goldfine, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(7): 1793–1801.
158. Pickup, J. C. & Crook, M. A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 1998; 41(10): 1241–8.
159. Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S. & Bastard, J.-P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 2008; 34(1): 2–11.
160. Makki, K., Froguel, P. & Wolowczuk, I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.* 2013; 2013 139239.
161. Rajkovic, N., Zamaklar, M., Lalic, K., Jotic, A., Lukic, L., Milicic, T., *et al.* Relationship between obesity, adipocytokines and inflammatory markers in type 2 diabetes: relevance for cardiovascular risk prevention. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014; 11(4): 4049–65.
162. Xydakis, A. M., Case, C. C., Jones, P. H., Hoogeveen, R. C., Liu, M.-Y., Smith, E. O., *et al.* Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(6): 2697–703.

163. Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. & Spiegelman, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1995; 95(5): 2409–15.
164. Dandona, P., Aljada, A. & Bandyopadhyay, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 2004; 25(1): 4–7.
165. Ruan, H., Hacoheh, N., Golub, T. R., Van Parijs, L. & Lodish, H. F. Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory. *Diabetes* 2002; 51(5): 1319–36.
166. Fernández-Real, J. M., Broch, M., Ricart, W., Casamitjana, R., Gutierrez, C., Vendrell, J., *et al.* Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 1998; 47(11): 1757–62.
167. Kern, P. A., Saghizadeh, M., Ong, J. M., Bosch, R. J., Deem, R. & Simsolo, R. B. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* 1995; 95(5): 2111–9.
168. Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L. & Ranganathan, G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Metab.* 2001; 280(5): E745–51.
169. Bastard, J. P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., *et al.* Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85(9): 3338–42.
170. Fernandez-Real, J. M., Vayreda, M., Richart, C., Gutierrez, C., Broch, M., Vendrell, J., *et al.* Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86(3): 1154–9.
171. Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E. & Ridker, P. M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286(3): 327–34.
172. Donath, M. Y. & Shoelson, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11(2): 98–107.
173. Pajvani, U. B. & Scherer, P. E. Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr. Diab. Rep.* 2003; 3(3): 207–13.
174. Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K. & Tobe, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(7): 1784–92.
175. Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R. E., *et al.* Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86(5): 1930–5.
176. Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20(6): 1595–9.
177. Duncan, B. B., Schmidt, M. I., Pankow, J. S., Bang, H., Couper, D., Ballantyne, C. M., *et al.* Adiponectin and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 2004; 53(9): 2473–8.

Bibliografia

178. Zhu, N., Pankow, J. S., Ballantyne, C. M., Couper, D., Hoogeveen, R. C., Pereira, M., *et al.* High-molecular-weight adiponectin and the risk of type 2 diabetes in the ARIC study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95(11): 5097–104.
179. Li, S., Shin, H. J., Ding, E. L. & van Dam, R. M. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2009; 302(2): 179–88.
180. Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 2002; 8(11): 1288–95.
181. Waki, H. & Tontonoz, P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu. Rev. Pathol.* 2007; 2 31–56.
182. Ram, J., Snehalatha, C., Nanditha, A., Selvam, S., Shetty, S. A., Godsland, I. F., *et al.* Hypertriglyceridaemic waist phenotype as a simple predictive marker of incident diabetes in Asian-Indian men with prediabetes. *Diabet. Med.* 2014; 31(12): 1542–9.
183. Gustavsson, C. G. & Agardh, C.-D. Markers of inflammation in patients with coronary artery disease are also associated with glycosylated haemoglobin A1c within the normal range. *Eur. Heart J.* 2004; 25(23): 2120–4.
184. Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D. M. & Pratley, R. E. 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.
185. Badawi, A., Klip, A., Haddad, P., Cole, D. E., Bailo, B. G., El-Sohemy, A., *et al.* Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* 2010; 3 173–86.
186. Wang, X., Bao, W., Liu, J., Ouyang, Y. Y., Wang, D., Rong, S., *et al.* Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2013; 36(1): 166–175.
187. Vinitha, R., Ram, J., Snehalatha, C., Nanditha, A., Shetty, A. S., Arun, R., *et al.* Adiponectin, leptin, interleukin-6 and HbA1c in the prediction of incident type 2 diabetes: A nested case-control study in Asian Indian men with impaired glucose tolerance. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2015; doi:10.1016/j.diabres.2015.05.035.
188. Schmidt, M. I., Duncan, B. B., Vigo, A., Pankow, J. S., Couper, D., Ballantyne, C. M., *et al.* Leptin and incident type 2 diabetes: risk or protection? *Diabetologia* 2006; 49(9): 2086–96.
189. Chen, G.-C., Qin, L.-Q. & Ye, J.-K. Leptin levels and risk of type 2 diabetes: gender-specific meta-analysis. *Obes. Rev.* 2014; 15(2): 134–42.
190. Zulet, M. A., Puchau, B., Navarro, C., Martí, A. & Martínez, J. A. [Inflammatory biomarkers: the link between obesity and associated pathologies]. *Nutr. Hosp.* 2012(5): 511–27.
191. Looker, H. C., Colombo, M., Agakov, F., Zeller, T., Groop, L., Thorand, B., *et al.* Protein biomarkers for the prediction of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2015; 58(6): 1363–71.
192. Herder, C., Kowall, B., Tabak, A. G. & Rathmann, W. The potential of novel biomarkers to improve risk prediction of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2014; 57(1): 16–29.
193. Julia, C., Czernichow, S., Charnaux, N., Ahluwalia, N., Andreeva, V., Touvier, M., *et al.* Relationships between adipokines, biomarkers of endothelial function and inflammation and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2014; 105(2): 231–8.

194. Song, Y., Manson, J. E., Tinker, L., Rifai, N., Cook, N. R., Hu, F. B., *et al.* Circulating levels of endothelial adhesion molecules and risk of diabetes in an ethnically diverse cohort of women. *Diabetes* 2007; 56(7): 1898-904.
195. Festa, A., D'Agostino Jr, R., Tracy, R. P., Haffner, S. M. & Study, I. R. A. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002; 51(4): 1131-1137.
196. Ram, J., Snehalatha, C., Selvam, S., Nanditha, A., Shetty, A. S., Godsland, I. F., *et al.* Retinol binding protein-4 predicts incident diabetes in Asian Indian men with prediabetes. *Biofactors* 2015; doi:10.1002/biof.1209.
197. Marques-Vidal, P., Schmid, R., Bochud, M., Bastardot, F., von Känel, R., Paccaud, F., *et al.* Adipocytokines, hepatic and inflammatory biomarkers and incidence of type 2 diabetes. the CoLaus study. *PLoS One* 2012; 7(12): e51768.
198. Wannamethee, S. G., Shaper, A. G., Lennon, L. & Whincup, P. H. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* 2005; 28(12): 2913-8.
199. Sun, L., Zong, G., Pan, A., Ye, X., Li, H., Yu, Z., *et al.* Elevated plasma ferritin is associated with increased incidence of type 2 diabetes in middle-aged and elderly Chinese adults. *J. Nutr.* 2013; 143(9): 1459-65.
200. Rajpathak, S. N., Wylie-Rosett, J., Gunter, M. J., Negassa, A., Kabat, G. C., Rohan, T. E., *et al.* Biomarkers of body iron stores and risk of developing type 2 diabetes. *Diabetes. Obes. Metab.* 2009; 11(5): 472-9.
201. Jehn, M. L., Guallar, E., Clark, J. M., Couper, D., Duncan, B. B., Ballantyne, C. M., *et al.* A prospective study of plasma ferritin level and incident diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am. J. Epidemiol.* 2007; 165(9): 1047-54.
202. Arija, V., Fernández-Cao, J. C., Basora, J., Bulló, M., Aranda, N., Estruch, R., *et al.* Excess body iron and the risk of type 2 diabetes mellitus: a nested case-control in the PREDIMED (PREvention with MEDiterranean Diet) study. *Br. J. Nutr.* 2014; 112(11): 1896-904.
203. Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., *et al.* TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(51): 32401-32410.
204. Wiley, S. R. & Winkles, J. A. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14(3-4): 241-249.
205. Fick, A., Lang, I., Schäfer, V., Seher, A., Trebing, J., Weisenberger, D., *et al.* Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J. Biol. Chem.* 2012; 287(1): 484-95.
206. Bover, L. C., Cardó-Vila, M., Kuniyasu, A., Sun, J., Rangel, R., Takeya, M., *et al.* A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J. Immunol.* 2007; 178(12): 8183-94.
207. Feng, F., Wang, L., Albanese, N., Holmes, A. & Xia, P. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis attenuates the action of insulin in hepatocytes. *Endocrinology* 2008; 149(4): 1505-13.
208. Winkles, J. A. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008; 7(5): 411-25.

Bibliografia

209. Burkly, L. C., Michaelson, J. S., Hahm, K., Jakubowski, A. & Zheng, T. S. TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine* 2007; 40(1): 1–16.
210. Burkly, L. C., Michaelson, J. S. & Zheng, T. S. TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses. *Immunol. Rev.* 2011; 244(1): 99–114.
211. Winkles, J. A. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Discov.* 2008; 7(5): 411–425.
212. Maecker, H., Varfolomeev, E., Kischkel, F., Lawrence, D., LeBlanc, H., Lee, W., *et al.* TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell* 2005; 123(5): 931–44.
213. Tiller, G., Fischer-Posovszky, P., Laumen, H., Finck, A., Skurk, T., Keuper, M., *et al.* Effects of TWEAK (TNF superfamily member 12) on differentiation, metabolism, and secretory function of human primary preadipocytes and adipocytes. *Endocrinology* 2009; 150(12): 5373–83.
214. Nakayama, M., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Okumura, K. & Yagita, H. Involvement of TWEAK in interferon gamma-stimulated monocyte cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 2000; 192(9): 1373–80.
215. Chacon, M. R., Richart, C., Gomez, J. M., Megia, A., Vilarrasa, N., Fernandez-Real, J. M., *et al.* Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine* 2006; 33(3): 129–137.
216. Van Kuijk, A. W. R., Wijbrandts, C. A., Vinkenoog, M., Zheng, T. S., Reedquist, K. A. & Tak, P. P. TWEAK and its receptor Fn14 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared to psoriatic arthritis and its response to tumour necrosis factor blockade. *Ann. Rheum. Dis.* 2010; 69(1): 301–4.
217. Serafini, B., Magliozzi, R., Rosicarelli, B., Reynolds, R., Zheng, T. S. & Aloisi, F. Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in the multiple sclerosis brain: implications for inflammatory tissue injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008; 67(12): 1137–48.
218. Burkly, L. C., Michaelson, J. S., Hahm, K., Jakubowski, A. & Zheng, T. S. TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine* 2007; 40(1): 1–16.
219. Muñoz-García, B., Martín-Ventura, J. L., Martínez, E., Sánchez, S., Hernández, G., Ortega, L., *et al.* Fn14 is upregulated in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and is expressed in human carotid atherosclerotic plaques: modulation by atorvastatin. *Stroke.* 2006; 37(8): 2044–53.
220. Blanco-Colio, L. M., Martín-Ventura, J. L., Muñoz-García, B., Orbe, J., Paramo, J. A., Michel, J. B., *et al.* Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27(4): 916–922.
221. Kim, S.-H., Kang, Y.-J., Kim, W.-J., Woo, D.-K., Lee, Y., Kim, D.-I., *et al.* TWEAK can induce pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Circ. J.* 2004; 68(4): 396–9.
222. Moreno, J. A., Muñoz-García, B., Martín-Ventura, J. L., Madrigal-Matute, J., Orbe, J., Paramo, J. A., *et al.* The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009; 207(1): 103–110.
223. Bover, L. C., Cardo-Vila, M., Kuniyasu, A., Sun, J., Rangel, R., Takeya, M., *et al.* A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J. Immunol. (Baltimore, Md. 1950)* 2007; 178(12): 8183–8194.

224. Schapira, K., Burkly, L. C., Zheng, T. S., Wu, P., Groeneweg, M., Rousch, M., *et al.* Fn14-Fc fusion protein regulates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice and inhibits macrophage lipid uptake in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009; 29(12): 2021–7.
225. Vendrell, J., Maymo-Masip, E., Tinahones, F., Garcia-Espana, A., Megia, A., Caubet, E., *et al.* Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95(6): 2983–2992.
226. Díaz, M., Chacón, M. R., López-Bermejo, A., Maymó-Masip, E., Salvador, C., Vendrell, J., *et al.* Ethinyl estradiol-cyproterone acetate versus low-dose pioglitazone-flutamide-metformin for adolescent girls with androgen excess: divergent effects on CD163, TWEAK receptor, ANGPTL4, and LEPTIN expression in subcutaneous adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97(10): 3630–8.
227. Vendrell, J. & Chacón, M. R. TWEAK: A New Player in Obesity and Diabetes. *Front. Immunol.* 2013; 4: 488.
228. Maymó-Masip, E., Fernández-Veledo, S., Garcia España, A., Vázquez-Carballo, A., Tinahones, F. J., García-Fuentes, E., *et al.* The rise of soluble TWEAK levels in severely obese subjects after bariatric surgery may affect adipocyte-cytokine production induced by TNF α . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013; 98(8): E1323–33.
229. Vázquez-Carballo, A., Ceperuelo-Mallafré, V., Chacón, M. R., Maymó-Masip, E., Lorenzo, M., Porras, A., *et al.* TWEAK prevents TNF- α -induced insulin resistance through PP2A activation in human adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2013; 305(1): E101–12.
230. Llauro, G., Gonzalez-Clemente, J. M., Maymo-Masip, E., Subias, D., Vendrell, J. & Chacon, M. R. Serum Levels of TWEAK and Scavenger Receptor CD163 in Type 1 Diabetes Mellitus: Relationship with Cardiovascular Risk Factors. A Case-Control Study. *PLoS One* 2012; 7(8): e43919.
231. Kralisch, S., Ziegelmeier, M., Bachmann, A., Seeger, J., Lössner, U., Blüher, M., *et al.* Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 2008; 199(2): 440–4.
232. Karadurmus, N., Tapan, S., Cakar, M., Naharci, I., Celik, T., Tasci, I., *et al.* Lower plasma soluble TWEAK concentration in patients with newly diagnosed hypertension. *Clin. Invest. Med.* 2012; 35(1): E20–6.
233. Simón-Muela, I., Llauro, G., Chacón, M. R., Olona, M., Näf, S., Maymó-Masip, E., *et al.* Reduced circulating levels of TWEAK are associated with gestational diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.* 2015; 45(1): 27–35.
234. Chorianopoulos, E., Rosenberg, M., Zugck, C., Wolf, J., Katus, H. A. & Frey, N. Decreased soluble TWEAK levels predict an adverse prognosis in patients with chronic stable heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2009; 11(11): 1050–6.
235. Jelić-Ivanović, Z., Bujisić, N., Spasić, S., Bogavac-Stanojević, N., Spasojević-Kalimanovska, V. & Kotur-Stevuljević, J. Circulating sTWEAK improves the prediction of coronary artery disease. *Clin. Biochem.* 2009; 42(13-14): 1381–6.
236. Chorianopoulos, E., Jarr, K., Steen, H., Giannitsis, E., Frey, N. & Katus, H. A. Soluble TWEAK is markedly upregulated in patients with ST-elevation myocardial infarction and related to an adverse short-term outcome. *Atherosclerosis* 2010; 211(1): 322–326.
237. Moreno, J. A., Dejouvencel, T., Labreuche, J., Smadja, D. M., Dussiot, M., Martin-Ventura, J. L., *et al.* Peripheral artery disease is associated with a high CD163/TWEAK plasma ratio. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30(6): 1253–62.

Bibliografia

238. Yilmaz, M. I., Carrero, J. J., Ortiz, A., Martin-Ventura, J. L., Sonmez, A., Saglam, M., *et al.* Soluble TWEAK plasma levels as a novel biomarker of endothelial function in patients with chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 4(11): 1716–1723.
239. Urbonaviciene, G., Martin-Ventura, J. L., Lindholt, J. S., Urbonavicius, S., Moreno, J. A., Egido, J., *et al.* Impact of soluble TWEAK and CD163/TWEAK ratio on long-term cardiovascular mortality in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 2011; 219(2): 892–899.
240. Moller, H. J., Peterslund, N. A., Graversen, J. H. & Moestrup, S. K. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood* 2002; 99(1): 378–380.
241. Møller, H. J. Soluble CD163. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2012; 72(1): 1–13.
242. Etzerodt, A. & Moestrup, S. K. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid. Redox Signal.* 2013; 18(17): 2352–63.
243. Etzerodt, A., Maniecki, M. B., Møller, K., Møller, H. J. & Moestrup, S. K. Tumor necrosis factor α -converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 88(6): 1201–5.
244. Buechler, C., Ritter, M., Orsó, E., Langmann, T., Klucken, J. & Schmitz, G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 67(1): 97–103.
245. Maniecki, M. B., Etzerodt, A., Moestrup, S. K., Møller, H. J. & Graversen, J. H. Comparative assessment of the recognition of domain-specific CD163 monoclonal antibodies in human monocytes explains wide discrepancy in reported levels of cellular surface CD163 expression. *Immunobiology* 2011; 216(8): 882–90.
246. Møller, H. J., Aerts, H., Grønbaek, H., Peterslund, N. A., Hyltoft Petersen, P., Hornung, N., *et al.* Soluble CD163: a marker molecule for monocyte/macrophage activity in disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 2002; 237 29–33.
247. Kračmerová, J., Rossmeislová, L., Kováčová, Z., Klimčáková, E., Polák, J., Tencerová, M., *et al.* Soluble CD163 is associated with CD163 mRNA expression in adipose tissue and with insulin sensitivity in steady-state condition but not in response to calorie restriction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99(3): E528–35.
248. Sørensen, L. P., Parkner, T., Søndergaard, E., Bibby, B. M., Møller, H. J. & Nielsen, S. Visceral obesity is associated with increased soluble CD163 concentration in men with type 2 diabetes mellitus. *Endocr. Connect.* 2015; 4(1): 27–36.
249. Zanni, M. V., Burdo, T. H., Makimura, H., Williams, K. C. & Grinspoon, S. K. Relationship between monocyte/macrophage activation marker soluble CD163 and insulin resistance in obese and normal-weight subjects. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2012; 77(3): 385–390.
250. Moller, H. J., Frikke-Schmidt, R., Moestrup, S. K., Nordestgaard, B. G. & Tybjaerg-Hansen, A. Serum soluble CD163 predicts risk of type 2 diabetes in the general population. *Clin. Chem.* 2011; 57(2): 291–297.
251. Shakeri-Manesch, S., Zeyda, M., Huber, J., Ludvik, B., Prager, G. & Stulnig, T. M. Diminished upregulation of visceral adipose heme oxygenase-1 correlates with waist-to-hip ratio and insulin resistance. *Int. J. Obes. (Lond).* 2009; 33(11): 1257–64.
252. Fjeldborg, K., Møller, H. J., Richelsen, B. & Pedersen, S. B. Regulation of CD163 mRNA and soluble CD163 protein in human adipose tissue in vitro. *J. Mol. Endocrinol.* 2014; 53(2): 227–35.
253. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3(1): 23–35.

254. Sporrer, D., Weber, M., Wanninger, J., Weigert, J., Neumeier, M., Stögbauer, F., *et al.* Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity. *Eur. J. Clin. Invest.* 2009; 39(8): 671–9.
255. Fjeldborg, K., Christiansen, T., Bennetzen, M., J Møller, H., Pedersen, S. B. & Richelsen, B. The macrophage-specific serum marker, soluble CD163, is increased in obesity and reduced after dietary-induced weight loss. *Obesity (Silver Spring)*. 2013; 21(12): 2437–43.
256. Llauradó, G., González-Clemente, J.-M., Maymó-Masip, E., Subías, D., Vendrell, J. & Chacón, M. R. Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: relationship with cardiovascular risk factors. a case-control study. *PLoS One* 2012; 7(8): e43919.
257. Rojo-Martínez, G., Maymó-Masip, E., Rodríguez, M. M., Solano, E., Goday, A., Soriguer, F., *et al.* Serum sCD163 levels are associated with type 2 diabetes mellitus and are influenced by coffee and wine consumption: results of the Di@bet.es study. *PLoS One* 2014; 9(6): e101250.
258. Axelsson, J., Moller, H. J., Witasp, A., Qureshi, A. R., Carrero, J. J., Heimbürger, O., *et al.* Changes in fat mass correlate with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD. *Am. J. Kidney Dis.* 2006; 48(6): 916–925.
259. Bari, M. F., Weickert, M. O., Sivakumar, K., James, S. G., Snead, D. R. J., Tan, B. K., *et al.* Elevated soluble CD163 in gestational diabetes mellitus: secretion from human placenta and adipose tissue. *PLoS One* 2014; 9(7): e101327.
260. Parkner, T., Sorensen, L. P., Nielsen, A. R., Fischer, C. P., Bibby, B. M., Nielsen, S., *et al.* Soluble CD163: a biomarker linking macrophages and insulin resistance. *Diabetologia* 2012; 55(6): 1856–1862.
261. Fjeldborg, K., Pedersen, S. B., Møller, H. J., Christiansen, T., Bennetzen, M. & Richelsen, B. Human adipose tissue macrophages are enhanced but changed to an anti-inflammatory profile in obesity. *J. Immunol. Res.* 2014; 2014 309548.
262. Villafan-Bernal, J. R., Sanchez-Enriquez, S. & Munoz-Valle, J. F. Molecular modulation of osteocalcin and its relevance in diabetes (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2011; 28(3): 283–293.
263. Ferron, M. & Lacombe, J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch. Biochem. Biophys.* 2014; 561 137–46.
264. Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., *et al.* Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130(3): 456–469.
265. Lee, N. K. & Karsenty, G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 2008; 19(5): 161–6.
266. Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G. & Ducy, P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105(13): 5266–70.
267. Bonet, M. L., Ribot, J. & Palou, A. citocinas y control metabólico. *Rev. Española Obes.* 2009; 7(7): 22–47.
268. Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., *et al.* Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382(6590): 448–52.
269. Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G. & Ducy, P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105(13): 5266–5270.

Bibliografia

270. Ferron, M., McKee, M. D., Levine, R. L., Ducy, P. & Karsenty, G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice . *Bone* 2012; 50(2): 568–575.
271. Wei, J., Hanna, T., Suda, N., Karsenty, G. & Ducy, P. Osteocalcin promotes β -cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. *Diabetes* 2014; 63(3): 1021–31.
272. Pi, M., Wu, Y. & Quarles, L. D. GPRC6A mediates responses to osteocalcin in β -cells in vitro and pancreas in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 2011; 26(7): 1680–3.
273. Sumara, G., Formentini, I., Collins, S., Sumara, I., Windak, R., Bodenmiller, B., *et al.* Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell* 2009; 136(2): 235–48.
274. Mizokami, A., Yasutake, Y., Gao, J., Matsuda, M., Takahashi, I., Takeuchi, H., *et al.* Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and thereby stimulates insulin secretion in mice. *PLoS One* 2013; 8(2): e57375.
275. Lee, Y. J., Lee, H., Jee, S. H., Lee, S. S., Kim, S. R., Kim, S. M., *et al.* Serum osteocalcin is inversely associated with adipocyte-specific fatty acid-binding protein in the Korean metabolic syndrome research initiatives. *Diabetes Care* 2010; 33(7): e90.
276. Suh, H., Hwang, I., Lee, K. & Kim, K. K. Relationships between serum osteocalcin, leptin and the effect of weight loss by pharmacological treatment in healthy, nonsmoking Korean obese adults. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 418 17–21.
277. Sheng, L., Cao, W., Cha, B., Chen, Z., Wang, F. & Liu, J. Serum osteocalcin level and its association with carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes . *Cardiovasc. Diabetol.* 2013; 12 22.
278. Saleem, U., Mosley Jr, T. H. & Kullo, I. J. Serum osteocalcin is associated with measures of insulin resistance, adipokine levels, and the presence of metabolic syndrome . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30(7): 1474–1478.
279. Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Tada, Y., Yamauchi, M., Yano, S. & Sugimoto, T. Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes . *Bone* 2011; 48(4): 720–725.
280. Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Yamauchi, M., Yamamoto, M., Kurioka, S., Yano, S., *et al.* Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus . *Osteoporos. Int.* 2011; 22(1): 187–194.
281. Iki, M., Tamaki, J., Fujita, Y., Kouda, K., Yura, A., Kadowaki, E., *et al.* Serum undercarboxylated osteocalcin levels are inversely associated with glycemic status and insulin resistance in an elderly Japanese male population: Fujiwara-kyo Osteoporosis Risk in Men (FORMEN) Study . *Osteoporos. Int.* 2012; 23(2): 761–770.
282. García-Martín, A., Cortés-Berdonces, M., Luque-Fernández, I., Rozas-Moreno, P., Quesada-Charneco, M. & Muñoz-Torres, M. Osteocalcin as a marker of metabolic risk in healthy postmenopausal women. *Menopause* 2011; 18(5): 537–41.
283. Hwang, Y. C., Jeong, I. K., Ahn, K. J. & Chung, H. Y. Circulating osteocalcin level is associated with improved glucose tolerance, insulin secretion and sensitivity independent of the plasma adiponectin level . *Osteoporos. Int.* 2012; 23(4): 1337–1342.
284. Bezerra dos Santos Magalhães, K., Magalhães, M. M., Diniz, E. T., Lucena, C. S., Griz, L. & Bandeira, F. Metabolic syndrome and central fat distribution are related to lower serum osteocalcin concentrations. *Ann. Nutr. Metab.* 2013; 62(3): 183–8.

285. Kindblom, J. M., Ohlsson, C., Ljunggren, O., Karlsson, M. K., Tivesten, A., Smith, U., *et al.* Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men . *J. Bone Miner. Res.* 2009; 24(5): 785–791.
286. Bao, Y., Zhou, M., Lu, Z., Li, H., Wang, Y., Sun, L., *et al.* Serum levels of osteocalcin are inversely associated with the metabolic syndrome and the severity of coronary artery disease in Chinese men . *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2011; 75(2): 196–201.
287. Oosterwerff, M. M., van Schoor, N. M., Lips, P. & Eekhoff, E. M. Osteocalcin as a predictor of the metabolic syndrome in older persons: a population-based study . *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2013; 78(2): 242–247.
288. Pittas, A. G., Harris, S. S., Eliades, M., Stark, P. & Dawson-Hughes, B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94(3): 827–832.
289. Yeap, B. B., Chubb, S. A. P., Flicker, L., McCaul, K. A., Ebeling, P. R., Beilby, J. P., *et al.* Reduced serum total osteocalcin is associated with metabolic syndrome in older men via waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels. *Eur. J. Endocrinol.* 2010; 163(2): 265–72.
290. Sarkar, P. D. & Choudhury, A. B. Relationship of serum osteocalcin levels with blood glucose, insulin resistance and lipid profile in central Indian men with type 2 diabetes . *Arch. Physiol. Biochem.* 2012; 118(5): 260–264.
291. Zhou, M., Ma, X., Li, H., Pan, X., Tang, J., Gao, Y., *et al.* Serum osteocalcin concentrations in relation to glucose and lipid metabolism in Chinese individuals . *Eur. J. Endocrinol.* 2009; 161(5): 723–729.
292. Bullo, M., Moreno-Navarrete, J. M., Fernandez-Real, J. M. & Salas-Salvado, J. Total and undercarboxylated osteocalcin predict changes in insulin sensitivity and beta cell function in elderly men at high cardiovascular risk . *Am. J. Clin. Nutr.* 2012; 95(1): 249–255.
293. Shea, M. K., Gundberg, C. M., Meigs, J. B., Dallal, G. E., Saltzman, E., Yoshida, M., *et al.* Gamma-carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men and women . *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; 90(5): 1230–1235.
294. Ngarmukos, C., Chailurkit, L. O., Chanprasertyothin, S., Hengprasith, B., Sritara, P. & Ongphiphadhanakul, B. A reduced serum level of total osteocalcin in men predicts the development of diabetes in a long-term follow-up cohort . *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2012; 77(1): 42–46.
295. Hwang, Y. C., Jee, J. H., Jeong, I. K., Ahn, K. J., Chung, H. Y. & Lee, M. K. Circulating osteocalcin level is not associated with incident type 2 diabetes in middle-aged male subjects: mean 8.4-year retrospective follow-up study . *Diabetes Care* 2012; 35(9): 1919–1924.
296. Nigg, C. R., Burbank, P. M., Padula, C., Dufresne, R., Rossi, J. S., Velicer, W. F., *et al.* Stages of change across ten health risk behaviors for older adults. *Gerontologist* 1999; 39(4): 473–82.
297. Fernández-Ballart, J. D., Piñol, J. L., Zazpe, I., Corella, D., Carrasco, P., Toledo, E., *et al.* Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *Br. J. Nutr.* 2010; 103(12): 1808–16.
298. Schroder, H., Fito, M., Estruch, R., Martinez-Gonzalez, M. A., Corella, D., Salas-Salvado, J., *et al.* A short screener is valid for assessing Mediterranean diet adherence among older Spanish men and women . *J. Nutr.* 2011; 141(6): 1140–1145.
299. Elosua, R., Marrugat, J., Molina, L., Pons, S. & Pujol, E. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish men. The MARATHOM Investigators . *Am. J. Epidemiol.* 1994; 139(12): 1197–1209.

Bibliografia

300. Levey, A. S., Stevens, L. A., Schmid, C. H., Zhang, Y. L., Castro 3rd, A. F., Feldman, H. I., *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* 2009; 150(9): 604–612.
301. Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International. *Circulation* 2009; 120(16): 1640–5.
302. Fernández-Veledo, S., Vila-Bedmar, R., Nieto-Vazquez, I. & Lorenzo, M. c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor- α induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94(9): 3583–93.
303. Blanco-Colio, L. M., Martín-Ventura, J. L., Muñoz-García, B., Orbe, J., Páramo, J. A., Michel, J.-B., *et al.* Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27(4): 916–22.
304. Kralisch, S., Ziegelmeier, M., Bachmann, A., Seeger, J., Lossner, U., Bluher, M., *et al.* Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 2008; 199(2): 440–444.
305. Yilmaz, M. I., Sonmez, A., Ortiz, A., Saglam, M., Kilic, S., Eyileten, T., *et al.* Soluble TWEAK and PTX3 in nondialysis CKD patients: impact on endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 6(4): 785–92.
306. Gami, A. S., Witt, B. J., Howard, D. E., Erwin, P. J., Gami, L. A., Somers, V. K., *et al.* Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 49(4): 403–14.
307. Chicheportiche, Y., Fossati-Jimack, L., Moll, S., Ibnou-Zekri, N. & Izui, S. Down-regulated expression of TWEAK mRNA in acute and chronic inflammatory pathologies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 279(1): 162–5.
308. Carrero, J. J., Ortiz, A., Qureshi, A. R., Martín-Ventura, J. L., Bárány, P., Heimbürger, O., *et al.* Additive effects of soluble TWEAK and inflammation on mortality in hemodialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 4(1): 110–8.
309. Alexaki, V.-I., Notas, G., Pelekanou, V., Kampa, M., Valkanou, M., Theodoropoulos, P., *et al.* Adipocytes as immune cells: differential expression of TWEAK, BAFF, and APRIL and their receptors (Fn14, BAFF-R, TACI, and BCMA) at different stages of normal and pathological adipose tissue development. *J. Immunol.* 2009; 183(9): 5948–56.
310. Moreno, J. A., Muñoz-García, B., Martín-Ventura, J. L., Madrigal-Matute, J., Orbe, J., Páramo, J. A., *et al.* The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009; 207(1): 103–10.
311. Jasiewicz, M., Kowal, K., Kowal-Bielecka, O., Knapp, M., Skiepkó, R., Bodzenta-Lukaszyk, A., *et al.* Serum levels of CD163 and TWEAK in patients with pulmonary arterial hypertension. *Cytokine* 2014; 66(1): 40–5.
312. Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Yamamoto, M., Yamauchi, M., Kurioka, S., Yano, S., *et al.* Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94(1): 45–9.

313. Im, J. A., Yu, B. P., Jeon, J. Y. & Kim, S. H. Relationship between osteocalcin and glucose metabolism in postmenopausal women. *Clin. Chim. Acta.* 2008; 396(1-2): 66–69.
314. Hwang, Y. C., Jeong, I. K., Ahn, K. J. & Chung, H. Y. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 2009; 25(8): 768–772.
315. Hill, H. S., Grams, J., Walton, R. G., Liu, J., Moellering, D. R. & Garvey, W. T. Carboxylated and uncarboxylated forms of osteocalcin directly modulate the glucose transport system and inflammation in adipocytes. *Horm. Metab. Res.* 2014; 46(5): 341–7.
316. Chen, X., Wu, Y., Liu, L., Tian, H. & Yu, X. Osteocalcin is inversely associated with glucose levels in middle-aged Tibetan men with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 2014; 30(6): 476–482.
317. Lu, C., Ivaska, K. K., Alen, M., Wang, Q., Törmäkangas, T., Xu, L., *et al.* Serum osteocalcin is not associated with glucose but is inversely associated with leptin across generations of nondiabetic women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97(11): 4106–14.
318. Shea, M. K., Gundberg, C. M., Meigs, J. B., Dallal, G. E., Saltzman, E., Yoshida, M., *et al.* Gamma-carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; 90(5): 1230–5.
319. Selda Celik, Aytakin Oguz, Mehmet Uzunlulu, Ibrahim Yilmaz, Damla Kilic, G. K. Uncarboxylated Osteocalcin Levels in Patients With Metabolic Syndrome and Their Association With Metabolic Parameters. *J. Endocrinol. Metab.* 2012; 2(2): 82–87.
320. Otani, T., Mizokami, A., Hayashi, Y., Gao, J., Mori, Y., Nakamura, S., *et al.* Signaling pathway for adiponectin expression in adipocytes by osteocalcin. *Cell. Signal.* 2015; 27(3): 532–44.
321. Polgreen, L. E., Jacobs, D. R., Nathan, B. M., Steinberger, J., Moran, A. & Sinaiko, A. R. Association of osteocalcin with obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk factors in young adults. *Obesity (Silver Spring)*. 2012; 20(11): 2194–201.
322. Aoki, A., Muneyuki, T., Yoshida, M., Munakata, H., Ishikawa, S., Sugawara, H., *et al.* Circulating osteocalcin is increased in early-stage diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2011; 92(2): 181–6.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

11. ANEXOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

11.1. CUESTIONARIOS PREDIMED

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

ANEXO 1.
Cuestionario de inclusión/exclusión.
Estudio PREDIMED.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que padezca una enfermedad que le impida seguir alguna dieta determinada que incluya aceite de oliva y/o frutos secos ?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que haya tenido alguna vez un infarto de miocardio?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que haya tenido alguna vez una angina de pecho?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que haya tenido alguna vez una embolia o un accidente vascular cerebral?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que haya tenido alguna vez una claudicación intermitente?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que haya tenido una diabetes?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que tenga el colesterol alto?

sí no datos insuficientes

¿Sigue usted algún tratamiento hipolipemiante?

sí no

En caso afirmativo, anotar:

Col. total Col. HDL Col. LDL Triglicéridos

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que tenga la presión alta?

sí no datos insuficientes

¿Sigue usted algún tratamiento antihipertensivo?

sí no

En caso afirmativo, anotar:

Presión arterial sistólica: Presión arterial diastólica:

¿Algún familiar directo (padres, hermanos, hijos, tíos) ha sufrido o fallecido un infarto de miocardio o angina a una edad inferior a 55 años (varones)/65 años (mujeres) ?

sí no datos insuficientes

¿Fuma usted cigarrillos actualmente?

sí, regularmente ex-fumador de 0 a 1 año ex-fumador de 1 a 5 años ex-fumador > de 5 años
 nunca fumador datos insuficientes

En caso afirmativo, ¿cuántos años hace que fuma? 88 = no procede 99 = datos insuficientes

¿Aproximadamente, ¿cuántos cigarrillos, puros o pipas fuma al día?

cigarrillos/día puros/día pipas/día 88 = no procede 99 = datos insuficientes

¿Es usted capaz de cambiar/seguir la dieta que le aconsejen los médicos del estudio?

sí no datos insuficientes

INCLUSIÓN sí no

MOTIVO de exclusión: No cumplir criterios de inclusión Enfermedad Cardiovascular previa
 Dificultad de seguimiento del estudio o cambio de hábitos alimenticios Enfermedad médica grave
 Falta de interés de participación en el estudio Imposibilidad para cambiar de hábitos
 Datos insuficientes
 Otros



ANEXO 2.
Cuestionario general.
Estudio PREDIMED.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

ESTUDIO PREDIMED

Cuestionario general

Identificador del participante:

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Nodo	C.Salud	Médico	Paciente	Visita

Nodo: anotar el número de nodo correspondiente.

01. Andalucía - Málaga / 02. Andalucía - Sevilla - S.Pablo / 03. Andalucía - Sevilla - V.Rocío / 04. Baleares /
05. Cataluña - Barcelona norte / 06. Cataluña - Barcelona Sur / 07. Cataluña - Reus - Tarragona / 08. Madrid Norte /
09. Madrid Sur / 10. Navarra / 11. País Vasco / 12. Valencia

C.Salud: anotar el número del centro de salud correspondiente.

Médico: anotar el número del médico correspondiente.

Paciente: anotar el número del paciente correspondiente.

Visita: anotar el número de visita correspondiente.

00. Inclusión - exclusión / 01. Visita Inicial / 02. Visita 3 meses / 03. Visita 1 año / 04. Visita 2 años / 05. Visita 3años

Información de contacto (Pariente o amigo):

Primer apellido <input type="text"/>	Segundo apellido <input type="text"/>	Nombre <input type="text"/>
Teléfono <input type="text"/>	Teléfono <input type="text"/>	GRUPO asignado: <input type="radio"/> Aceite de oliva virgen <input type="radio"/> Frutos secos <input type="radio"/> Control

VARIABLES SOCIO DEMOGRÁFICAS

Lugar de nacimiento:

- | | | | |
|----------------------------------|--|-------------------------------------|--|
| <input type="radio"/> Galicia | <input type="radio"/> La Rioja | <input type="radio"/> Murcia | <input type="radio"/> Castilla la Mancha |
| <input type="radio"/> Asturias | <input type="radio"/> Aragón | <input type="radio"/> Madrid | <input type="radio"/> Andalucía |
| <input type="radio"/> Cantabria | <input type="radio"/> Cataluña | <input type="radio"/> Castilla-León | <input type="radio"/> Canarias |
| <input type="radio"/> País Vasco | <input type="radio"/> Comunidad Valenciana | <input type="radio"/> Extremadura | <input type="radio"/> Baleares |
| <input type="radio"/> Navarra | | | |

País (solo rellenar en caso de extranjeros):

Estado Civil: Soltero/a Casado/a Viudo/a Divorciado/a Separado/a Religioso

¿Cuál es el nivel más alto de escolarización que ha completado?

- Titulado Superior o similares Técnico Escuela Universitaria Escuela secundaria o Bachiller Escuela primaria
 No sabe leer ni escribir Datos insuficientes

Número de personas con las que comparte el hogar:

¿Cuál es su situación laboral actual?

- Está trabajando Incapacidad permanente Ama de casa Estudiante Jubilado
 Trabaja pero tiene una baja laboral de más de tres meses Paro con subsidio Paro sin subsidio Datos insuficientes

¿Se considera una persona tensa y/o agresiva? Puntuase de 0 (más relajado) a 10 (más competitivo)

Qué trabajo concreto hace o hacía

Qué trabajo concreto hace o hacía el/la cabeza de familia

Durante el último mes, ¿Ha tomado algún medicamento de los siguientes?

- | | | | |
|--|--------------------------|--------------------------|---|
| Aspirina, Adiro o similar | <input type="radio"/> sí | <input type="radio"/> no | <input type="radio"/> no sabe / no contesta |
| Otras medicinas para aliviar el dolor o la fiebre | <input type="radio"/> sí | <input type="radio"/> no | <input type="radio"/> no sabe / no contesta |
| Tranquilizantes, sedantes, pastillas para la ansiedad, pastillas para dormir. | <input type="radio"/> sí | <input type="radio"/> no | <input type="radio"/> no sabe / no contesta |
| Vitaminas o minerales | <input type="radio"/> sí | <input type="radio"/> no | <input type="radio"/> no sabe / no contesta |
| Medicamentos para el corazón | <input type="radio"/> sí | <input type="radio"/> no | <input type="radio"/> no sabe / no contesta |
| Medicamentos para la presión arterial | <input type="radio"/> sí | <input type="radio"/> no | <input type="radio"/> no sabe / no contesta |
| Medicamentos para el colesterol | <input type="radio"/> sí | <input type="radio"/> no | <input type="radio"/> no sabe / no contesta |
| Insulina | <input type="radio"/> sí | <input type="radio"/> no | <input type="radio"/> no sabe / no contesta |
| Medicamentos para la diabetes (diferentes de la insulina) | <input type="radio"/> sí | <input type="radio"/> no | <input type="radio"/> no sabe / no contesta |
| Solo mujeres: Tratamiento hormonal | <input type="radio"/> sí | <input type="radio"/> no | <input type="radio"/> no sabe / no contesta |
| Otros | <input type="radio"/> sí | <input type="radio"/> no | <input type="radio"/> no sabe / no contesta |

En caso afirmativo, nombre del medicamento/s

indicar el nombre del fármaco, la dosis y el tiempo del tratamiento en años

LOS TRATAMIENTOS ANOTADOS POR EL PACIENTE DEBEN SER CONFIRMADOS POR LA ENFERMERA A PARTIR DE LA HISTORIA CLÍNICA DEL CENTRO DE SALUD



¿Algún familiar directo (padres, hermanos, hijos, etc...) ha fallecido por causas cardíacas, o ha tenido algún problema cardíaco?

- sí, antes de los 55 años (varones) / 65 años (mujeres) sí, después de los 55 años (varones) / 65 años (mujeres)
 no Datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que haya tenido alguna vez arritmias o alguna enfermedad cardíaca?

- sí no datos insuficientes

Diagnóstico

¿Algún familiar directo (padres, hermanos, hijos...) ha tenido algún accidente vascular cerebral?

- sí, antes de los 55 años no sí, después de los 55 años datos insuficientes

¿Algún familiar directo (padres, hermanos, hijos...) tiene el colesterol elevado?

- sí, antes de los 55 años sí, después de los 55 años no datos insuficientes

¿Algún familiar directo (padres, hermanos, hijos...) tiene la tensión arterial alta?

- sí, antes de los 55 años sí, después de los 55 años no datos insuficientes

¿Algún familiar directo (padres, hermanos, hijos...) tiene o ha tenido cáncer?

- sí, antes de los 55 años sí, después de los 55 años no datos insuficientes

¿Se cansa excesivamente o le falta el aire al realizar algún ejercicio (subir escaleras, caminar, etc.)?

- No disnea
 Disnea a grandes esfuerzos (bailar, caminar durante media hora, trabajos de jardinería, etc.)
 Disnea a moderados esfuerzos (ducharse, vestirse, etc.)
 Disnea a mínimos esfuerzos (cualquier actividad, levantarse de la cama)
 Disnea sin especificar grado
 Datos insuficientes

¿Algún médico le ha diagnosticado de alguna de estas enfermedades? Puede haber más de una respuesta.

- Embolia pulmonar Trombosis venosa profunda Cataratas
 Aneurisma de aorta Bronquitis crónica - Enfisema Apneas del sueño
 Insuficiencia cardíaca izquierda Depresión Cáncer o Tumores

Edad del diagnóstico: años

Solo mujeres: ¿Que edad tenía cuando inició la menopausia? años

¿Le ha molestado a ud. alguna vez la gente criticándole su forma de beber?

- sí no datos insuficientes

¿Ha tenido ud. la impresión de que debería beber menos?

- sí no datos insuficientes

¿Se ha sentido alguna vez mal o culpable por su costumbre de beber?

- sí no datos insuficientes

¿Alguna vez lo primero que ha hecho por la mañana ha sido beber para calmar los nervios o para librarse de una resaca?

- sí no datos insuficientes

EXPLORACIÓN FÍSICA

Altura cm

Cintura cm

Cadera cm

Peso kg

Índice tobillo-brazo cm

		PAS	PAD	FC
Brazo no dominante	1	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
(paciente sentado)	2	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Brazo izquierdo	1	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
(paciente decubito supino)	2	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Brazo derecho	1	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
(paciente decubito supino)	2	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Tobillo izquierdo	1	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
(paciente decubito supino)	2	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Tobillo derecho	1	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
(paciente decubito supino)	2	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>

ITB Izquierdo (PAS mayor del tobillo izquierdo / PAS mayor de los brazos) ,

ITB Derecho (PAS mayor del tobillo derecho / PAS mayor de los brazos) ,



ANEXO 3.

Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.

Estudio PREDIMED.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

IDENTIFICACIÓN DEL PARTICIPANTE

NODO

- 01. Andalucía-Málaga
- 02. Andalucía-Sevilla-San Pablo
- 03. Andalucía-Sevilla-V. Rocio
- 04. Baleares
- 05. Catalunya-Barna Norte
- 06. Catalunya-Barna Sur
- 07. Catalunya-Reus-Tarragona
- 08. Madrid Norte
- 09. Madrid Sur
- 10. Navarra
- 11. País Vasco
- 12. Valencia

marque así 

así no marque 

NODO	CENTRO	MÉDICO	PACIENTE	VISITA
0	0	0	0	0
1	1	1	1	1
2	2	2	2	2
3	3	3	3	3
4	4	4	4	4
5	5	5	5	5
6	6	6	6	6
7	7	7	7	7
8	8	8	8	8
9	9	9	9	9

PÁGINA

1

Por favor, marque una única opción para cada alimento.

	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO								
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
		1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
I. LACTEOS	1. Leche entera (1 taza, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	2. Leche semidesnatada (1 taza, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	3. Leche descremada (1 taza, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	4. Leche condensada (1 cucharada)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	5. Nata o crema de leche (1/2 taza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	6. Batidos de leche (1 vaso, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	7. Yogurt entero (1, 125 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	8. Yogurt descremado (1, 125 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	9. Petit suisse (1, 55 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	10. Requesón o cuajada (1/2 taza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	11. Queso en porciones o cremoso (1, porción 25 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	12. Otros quesos: curados, semicurados (Manchego, Bola, Emmental...) (50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	13. Queso blanco o fresco (Burgos, cabra...) (50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	14. Natillas, flan, puding (1, 130 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	15. Helados (1 cucurucho)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Un plato o ración de 100-150 gr, excepto cuando se indique otra cosa	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+	
II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS	16. Huevos de gallina (uno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	17. Pollo o pavo CON piel (1 ración o pieza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	18. Pollo o pavo SIN piel (1 ración o pieza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	19. Carne de ternera o vaca (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	20. Carne de cerdo (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	21. Carne de cordero (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	22. Conejo o liebre (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	23. Hígado (ternera, cerdo, pollo) (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	24. Otras vísceras (sesos, corazón, mollejas) (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	25. Jamón serrano o paletilla (1 loncha, 30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	26. Jamón York, jamón cocido (1 loncha, 30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	27. Carnes procesadas (salchichón, chorizo, morcilla, mortadela, salchichas, butifarra, sobrasada, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	28. Patés, foie-gras (25 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
29. Hamburguesa (una, 50 gr.), albóndigas (3 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
30. Tocino, bacon, panceta (50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
31. Pescado blanco: mero, lenguado, besugo, merluza, pescadilla,... (1 plato, pieza o ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
32. Pescado azul: sardinas, atún, bonito, caballa, salmón (1 plato, pieza o ración 130 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
33. Pescados salados: bacalao, salazones (1 ración, 60 gr. en seco)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
34. Ostras, almejas, mejillones y similares (6 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
35. Calamares, pulpo, chipirones, jibia (sepia) (1 ración, 200 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
36. Crustáceos: gambas, langostinos, cigalas, etc. (4-5 piezas, 200 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
37. Pescados y mariscos enlatados al natural (sardinas, anchoas, bonito, atún) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
38. Pescados y mariscos en aceite (sardinas, anchoas, bonito, atún) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Por favor, marque una única opción para cada alimento.

	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO									
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES			A LA SEMANA			AL DÍA		
		1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+	
Un plato o ración de 200 grs, excepto cuando se indique										
39. Acelgas, espinacas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
40. Col, coliflor, brócoles	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
41. Lechuga, endivias, escarola (100 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
42. Tomate crudo (1, 150 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
43. Zanahoria, calabaza (100 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
44. Judías verdes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
45. Berenjenas, calabacines, pepinos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
46. Pimientos (150 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
47. Espárragos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
48. Gazpacho andaluz (1 vaso, 200 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
49. Otras verduras (alcachofa, puerro, cardo, apio)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
50. Cebolla (media unidad, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
51. Ajo (1 diente)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
52. Perejil, tomillo, laurel, orégano, etc. (una pizca)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
53. Patatas fritas comerciales (1 bolsa, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
54. Patatas fritas caseras (1 ración, 150 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
55. Patatas asadas o cocidas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
56. Setas, niscalos, champiñones	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO									
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES			A LA SEMANA			AL DÍA		
		1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+	
Una pieza o ración										
57. Naranja (una), pomelo (una), o mandarinas (dos)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
58. Plátano (uno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
59. Manzana o pera (una)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
60. Fresas/fresones (6 unidades, 1 plato postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
61. Cerezas, picotas, ciruelas (1 plato de postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
62. Melocotón, albaricoque, nectarina (una)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
63. Sandía (1 tajada, 200-250 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
64. Melón (1 tajada, 200-250 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
65. Kiwi (1 unidad, 100 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
66. Uvas (un racimo, 1 plato postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
67. Aceitunas (10 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
68. Frutas en almíbar o en su jugo (2 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
69. Dátiles, higos secos, uvas-pasas, ciruelas-pasas (150 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
70. Almendras, cacahuetes, avellanas, pistachos, piñones (30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
71. Nueces (30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
72. ¿Cuántos días a la semana toma fruta como postre?	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	6 <input type="checkbox"/>	7 <input type="checkbox"/>		

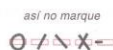
	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO									
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES			A LA SEMANA			AL DÍA		
		1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+	
Un plato o ración (150 gr.)										
73. Lentejas (1 plato, 150 gr. cocidas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
74. Alubias (pintas, blancas o negras) (1 plato, 150 gr. cocidas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
75. Garbanzos (1 plato, 150 gr. cocidos)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
76. Guisantes, habas (1 plato, 150 gr. cocidas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
77. Pan blanco, pan de molde (3 rodajas, 75 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
78. Pan negro o integral (3 rodajas, 75 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
79. Cereales desayuno (30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
80. Cereales integrales: muesli, copos avena, all-bran (30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
81. Arroz blanco (60 gr. en crudo)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
82. Pasta: fideos, macarrones, espaguetis, otras (60 gr. en crudo)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
83. Pizza (1 ración, 200 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

SIEMPRE 19927-03 (Rev.) 1

NODO	CENTRO	MÉDICO	PACIENTE	VISITA
0	0	0	0	0
1	1	1	1	1
2	2	2	2	2
3	3	3	3	3
4	4	4	4	4
5	5	5	5	5
6	6	6	6	6
7	7	7	7	7
8	8	8	8	8
9	9	9	9	9

PÁGINA

3



Por favor, marque una única opción para cada alimento.

	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO																											
	NUNCA O CASI NUNCA	A LA SEMANA			AL DÍA																							
		AL MES	1	2-4	5-6	1	2-3		4-6	6+																		
84. Aceite de oliva (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
85. Aceite de oliva extra virgen (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
86. Aceite de oliva de orujo (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
87. Aceite de maíz (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
88. Aceite de girasol (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
89. Aceite de soja (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
90. Mezcla de los anteriores (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
91. Margarina (porción individual, 12 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
92. Mantequilla (porción individual, 12 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
93. Manteca de cerdo (10 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
94. Marca de aceite de oliva que usa habitualmente:	<table border="1"> <tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td></tr> <tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td></tr> </table>							0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	No marque aquí
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																			
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																			

	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO							
	NUNCA O CASI NUNCA	A LA SEMANA			AL DÍA			
		AL MES	1	2-4	5-6	1	2-3	
95. Galletas tipo María (4-6 unidades, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
96. Galletas integrales o de fibra (4-6 unidades, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
97. Galletas con chocolate (4 unidades, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
98. Repostería y bizcochos hechos en casa (50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
99. Croissant, ensaimada, pastas de té u otra bollería industrial comercial... (uno, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
100. Donuts (uno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
101. Magdalenas (1-2 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
102. Pasteles (uno, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
103. Churros, porras y similares (1 ración, 100 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
104. Chocolates y bombones (30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
105. Cacao en polvo-cacaos solubles (1 cucharada de postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
106. Turrón (1/8 de barra, 40 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
107. Mantecados, mazapán (90 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO							
	NUNCA O CASI NUNCA	A LA SEMANA			AL DÍA			
		AL MES	1	2-4	5-6	1	2-3	
108. Croquetas, buñuelos, empanadillas, precocinados (una)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
109. Sopas y cremas de sobre (1 plato)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
110. Mostaza (una cucharadita de postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
111. Mayonesa comercial (1 cucharada sopera = 20 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
112. Salsa de tomate frito, ketchup (1 cucharadita)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
113. Picante: tabasco, pimienta, pimentón (una pizca)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
114. Sal (una pizca)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
115. Mermeladas (1 cucharadita)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
116. Azúcar (1 cucharadita)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
117. Miel (1 cucharadita)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
118. Snacks distintos de patatas fritas: gusanitos, palomitas, maíz, etc. (1 bolsa, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
119. Otros alimentos de frecuente consumo:								
119.1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
119.2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
119.3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Por favor, marque una única opción para cada alimento.

	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO																																																																			
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA																																																														
		1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+																																																											
120. Bebidas carbonatadas con azúcar: bebidas con cola, limonadas, tónicas, etc. (1 botellín, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
121. Bebidas carbonatadas bajas en calorías, bebidas light (1 botellín, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
122. Zumo de naranja natural (1 vaso, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
123. Zumos naturales de otras frutas (1 vaso, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
124. Zumos de frutas en botella o enlatados (200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
125. Café descafeinado (1 taza, 50 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
126. Café (1 taza, 50 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
127. Té (1 taza, 50 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
128. Mosto (100 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
129. Vaso de vino rosado (100 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
130. Vaso de vino moscatel (50 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
131. Vaso de vino tinto joven, del año (100 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
132. Vaso de vino tinto añejo (100 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
133. Vaso de vino blanco (100 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
134. Vaso de cava (100 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
135. Cerveza (1 jarra, 330 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
136. Licores, anís o anisetes... (1 copa, 50 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
137. Destilados: whisky, vodka, ginebra, coñac (1 copa, 50 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
IX: BEBIDAS																																																																				
138. ¿A que edad empezó a beber alcohol (vino, cerveza o licores), incluyendo el que toma con las comidas con regularidad (más de siete "bebidas" a la semana)?	Edad (años) <table border="1"> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> </table> Decena Unidad								0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																								
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																																											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																																											
139. ¿Cuántos años ha bebido alcohol con regularidad (más de siete "bebidas" a la semana)?	Años <table border="1"> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> </table> Decena Unidad								0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																								
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																																											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																																											
119. Otros alimentos de frecuente consumo	119.1 (No marque aquí) <table border="1"> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> </table> 119.2 (No marque aquí) <table border="1"> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> </table> 119.3 (No marque aquí) <table border="1"> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> </table>								0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																																											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																																											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																																											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																																											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																																											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																																											

Si durante el año pasado tomó vitaminas y/o minerales (incluyendo calcio) o productos dietéticos especiales (salvado, aceite de onagra, leche con ácidos grasos omega-3, flavonoides, etc.), por favor indique la marca y la frecuencia con que los tomó:

Marcas de los suplementos de vitaminas o minerales o de los productos dietéticos	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO																											
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA																						
		1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+																			
140.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
140.1.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
140.2.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
140 (No marque aquí)	<table border="1"> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> </table>								0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																			
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																			
140.1 (No marque aquí)	<table border="1"> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> </table>								0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																			
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																			
140.2 (No marque aquí)	<table border="1"> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> <tr> <td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> </table>								0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																			
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																			

Muchas gracias por su colaboración

ANEXO 4.
Cuestionario de actividad física.
Estudio PREDIMED.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

ESTUDIO PREDIMED

Cuestionario de actividad física

Identificador del participante:

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Nodo	C.Salud	Médico	Paciente	Visita

Fecha del examen

<input type="text"/>	/	<input type="text"/>	/	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Día		Mes		Año		

DNI

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

CIP

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA EN EL TIEMPO LIBRE DE MINNESOTA

A continuación encontrará un cuadro con un listado de actividades físicas y unas columnas con periodos de tiempo de realización de las mismas (semana, mes, trimestre y año). Cada columna está dividida en días y minutos.

La forma de rellenar el cuestionario es la siguiente:

- Se lee atentamente cada actividad una a una y cuando se encuentre una que se haya realizado durante la última semana, con números claros y sin salirse del recuadro se rellenan las casillas correspondientes a los días y minutos.
- Seguidamente se repite la misma acción para el último mes, el último trimestre y el último año.

Ha de tener en cuenta que si ha realizado alguna actividad la última semana supone también que la ha realizado el último mes, trimestre y año.

Para asegurar la uniformidad de la información recogida consideramos que:

- cada piso de escaleras = 1/2 min.
- una vuelta en esquí acuático = 5 mn.
- un set de tenis individual = 20 min.
- un set de tenis dobles = 15 min.
- golf 9 hoyos = 90 min.

Ejemplo:

Una persona que:

- durante la última semana ha ido a caminar media hora cada día menos el fin de semana, ha de anotar un 5 en la columna de días de práctica a la semana y 30 en minutos/día de práctica. Si durante el último año también ha ido a caminar pero durante 2 meses en el verano no ha hecho esta actividad, tendrá que anotar 200 en la columna de días de práctica al año y 30 en minutos / día de práctica.
- durante la última semana ha subido 2 veces al día 2 pisos por la escalera a de anotar un 7 en la columna de días de práctica a la semana y 2 a minutos / día de práctica. Si esta actividad la repite todo el año, tendrá que anotar 365 en la columna días de práctica al año y 2 en minutos / día de práctica.

ACTIVIDADES FÍSICAS	SEMANA		AÑO	
	DIAS DE PRACTICA	MINUTOS/DIA DE PRACTICA	DIAS DE PRACTICA	MINUTOS/DIA DE PRACTICA
ANDAR/BAILAR/SUBIR ESCALERAS				
1.Pasear	5	30	200	30
5.Subir escaleras	7	2	365	2

ACTIVIDADES FÍSICAS	SEMANA		AÑO	
	DIAS DE PRACTICA	MINUTOS/DIA DE PRACTICA	DIAS DE PRACTICA	MINUTOS/DIA DE PRACTICA
ANDAR/BAILAR/SUBIR ESCALERAS				
1.Pasear	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
2.Andar de casa al trabajo y del trabajo a casa o en periodos de descanso del mismo	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
3.Andar (llevando carrito de la compra)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
4.Andar (llevando bolsas de la compra)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
5.Subir escaleras	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
6.Andar campo a través	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
7.Excursiones con mochila	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
8.Escalar montañas	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
9.Ir en bicicleta al trabajo	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
10.Bailar	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
11.Aeróbic o ballet	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
12.Jugar con los niños (corriendo, saltando,..)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
EJERCICIOS DE MANTENIMIENTO GENERAL				
13.Hacer ejercicio en casa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
14.Hacer ejercicio en un gimnasio	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
15.Caminar deprisa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
16.Trotar ("Jogging")	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
17.Correr 8-11 km/h	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
18.Correr 12-16 km/h	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
19.Levantar pesas	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
ACTIVIDADES ACUÁTICAS				
20.Esquí acuático	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
21.Surf	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
22.Navegar a vela	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
23.Ir en canoa o remar (por distracción)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
24.Ir en canoa o remar (en competición)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>
25.Hacer un viaje en canoa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>

ACTIVIDADES FÍSICAS	SEMANA		AÑO	
	DIAS DE PRACTICA	MINUTOS/DIA DE PRACTICA	DIAS DE PRACTICA	MINUTOS/DIA DE PRACTICA
26.Nadar (más de 150 metros en piscina)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
27.Nadar en el mar	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
28.Bucear	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
DEPORTES DE INVIERNO				
29.Esquiar	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
30.Esquí de fondo	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
31.Patinar (ruedas o hielo)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
OTRAS ACTIVIDADES				
32.Montar a caballo	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
33.Jugar a los bolos	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
34.Balonvolea	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
35.Tenis de mesa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
36.Tenis individual	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
37.Tenis dobles	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
38.Badminton	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
39.Baloncesto (sin jugar partido)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
40.Baloncesto (jugando un partido)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
41.Baloncesto (actuando de árbitro)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
42.Squash	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
43.Fútbol	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
44.Golf (llevando el carrito)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
45.Golf (andando y llevando los palos)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
46.Balonmano	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
47.Petanca	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
48.Artes marciales	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
49.Motociclismo	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
50.Ciclismo de carretera o montaña	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>



ACTIVIDADES FÍSICAS	SEMANA		AÑO	
	DIAS DE PRACTICA	MINUTOS/DIA DE PRACTICA	DIAS DE PRACTICA	MINUTOS/DIA DE PRACTICA
ACTIVIDADES EN EL JARDÍN				
51.Cortar el césped con máquina	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
52.Cortar el césped manualmente	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
53.Limpiar y arreglar el jardín	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
54.Cavar el huerto	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
55.Quitar nieve con pala	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
TRABAJOS Y ACTIVIDADES CASERAS				
56.Trabajos de carpintería dentro de casa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
57.Trabajos de carpintería (exterior)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
58.Pintar dentro de casa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
59.Pintar fuera de casa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
60.Limpiar la casa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
61.Mover muebles	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
CAZA Y PESCA				
62.Tiro con pistola	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
63.Tiro con arco	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
64.Pescar en la orilla del mar	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
65.Pescar con botas altas dentro del río	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
66.Caza menor	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
67.Caza mayor (ciervos, osos...)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
OTROS (ESPECIFICAR)				
	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>



ANEXO 5.

Cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea.

Estudio PREDIMED.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

ESTUDIO PREDIMED

Cumplimiento de la dieta

Identificador del participante:

____ / ____ / ____ / ____ / ____

Nodo C.Salud Médico Paciente Visita

Nodo: anotar el número de nodo correspondiente.

01. Andalucía - Málaga / 02. Andalucía - Sevilla - S.Pablo / 03. Andalucía - Sevilla - V.Rocío / 04. Baleares /
05. Cataluña - Barcelona norte / 06. Cataluña - Barcelona Sur / 07. Cataluña - Reus - Tarragona / 08. Madrid Norte /
09. Madrid Sur / 10. Navarra / 11. País Vasco / 12. Valencia

C.Salud: anotar el número del centro de salud correspondiente.

Médico: anotar el número del médico correspondiente.

Paciente: anotar el número del paciente correspondiente.

Visita: anotar el número de visita correspondiente.

00. Inclusión - exclusión / 01. Visita Inicial / 02. Visita 3 meses / 03. Visita 1 año / 04. Visita 2 años / 05. Visita 3años

Fecha del examen

____ / ____ / 200____

Día Mes Año

1. ¿Usa usted el aceite de oliva como principal grasa para cocinar? Sí = 1 punto
2. ¿Cuanto aceite de oliva consume en total al día (incluyendo el usado para freír, comidas fuera de casa, ensaladas, etc.)? 4 o más cucharadas = 1 punto
3. ¿Cuántas raciones de verdura u hortalizas consume al día? (las guarniciones o acompañamientos = 1/2 ración) 1 ración = 200g. 2 o más (al menos una de ellas en ensalada o crudas) = 1 punto
4. ¿Cuántas piezas de fruta (incluyendo zumo natural) consume al día? 3 o más al día = 1 punto
5. ¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día? (ración: 100 - 150 g) menos de 1 al día = 1 punto
6. ¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día? (porción individual: 12 g) menos de 1 al día = 1 punto
7. ¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas (refrescos, colas, tónicas, bitter) consume al día? menos de 1 al día = 1 punto
8. ¿Bebe usted vino? ¿Cuánto consume a la semana? 7 o más vasos a la semana = 1 punto
9. ¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana? (1 plato o ración de 150 g) 3 o más a la semana = 1 punto
10. ¿Cuántas raciones de pescado-mariscos consume a la semana? (1 plato pieza o ración: 100 - 150 de pescado o 4-5 piezas o 200 g de marisco) 3 o más a la semana = 1 punto
11. ¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulce o pasteles a la semana? menos de 2 a la semana = 1 punto
12. ¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana? (ración 30 g) 3 o más a la semana = 1 punto
13. ¿Consume usted preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas? (carne de pollo: 1 pieza o ración de 100 - 150 g) Sí = 1 punto
14. ¿Cuántas veces a la semana consume los vegetales cocinados, la pasta, arroz u otros platos aderezados con salsa de tomate, ajo, cebolla o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (sofrito)? 2 o más a la semana = 1 punto



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

ANEXO 6.

Cuestionario de adherencia a la Dieta baja en grasa.

Estudio PREDIMED.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

CUESTIONARIO DE ADHERENCIA A LA DIETA BAJA EN GRASA

1. ¿Cuántas cucharadas de aceite toma al día, incluyendo el usado para freír, cocinar, aliñar y en comidas fuera de casa? (1 cucharada: 10 ml)	2 o menos = 1 punto
2. ¿ Retira la grasa visible o la piel de las carnes de pollo, cerdo, cordero o ternera, antes de cocinarlas y desgrasa los caldos y platos cocinados antes de consumirlos?	Sí = 1 punto
3. ¿Cuántas raciones de carnes grasas (lomo alto, costillejas, falda, cuello, alitas, etc.), hamburguesas o carnes picadas comerciales, vísceras, precocinados, salchichas o embutidos consume a la semana? (ración de carne: 100 g; ración de embutidos: 30 g)	1 o menos = 1 punto
4. ¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina, manteca, mayonesas, helados cremosos o nata consume a la semana? (ración grasa para untar: 12 g; helado: 100 g)	1 o menos = 1 punto
5. ¿Consume sólo lácteos desnatados?	Sí = 1 punto (id. si no toma lácteos)
6. ¿ Cocina los arroces, pastas, patatas o legumbres sin embutidos ni sofritos , ni panceta, ni tocino, ni carnes grasas como costilla o cuello de cerdo o cordero?	2 o menos por semana = 1 punto
7. ¿Cuántas veces a la semana consume pescado azul o pescado blanco o marisco enlatado en aceite ?	1 o menos = 1 punto
8. ¿Cuántas raciones de bolllería consume a la semana: galletas, coca, dulces o pasteles? (1 ración de bolllería: 80 g; 6 galletas: 40g)	1 o menos = 1 punto
9. ¿Cuántas veces a la semana toma frutos secos, patatas chips u otros aperitivos fritos ?	1 o menos = 1 punto

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

ANEXO 7.
Cuestionario de tolerancia.
Estudio PREDIMED.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

ESTUDIO PREDIMED

Tolerancia

Identificador del participante:
Nombre Salud Médico Paciente Víctima

Fecha del examen: / / 20
Día Mes Año

GRUPO asignado:

- Aceite de oliva virgen
- Frutos secos
- Dieta baja en grasa

Con respecto a su situación antes de empezar el estudio:

1. Estado general de salud - Se encuentra: Peor Igual Mejor No sabe
2. Las comidas le sientan: Peor Igual Mejor No sabe
3. Hace la digestión: Peor Igual Mejor No sabe
4. Tiene el ritmo intestinal (deposiciones): Peor Igual Mejor No sabe

4.1 (Sólo si ha cambiado) - Ahora defeca:

- más blando: Sí No
- más duro: Sí No
- más volumen: Sí No
- más veces al día: Sí No

Los participantes de la Dieta Baja en Grasa (DBG) sólo deberán responder hasta la pregunta 4.1 inclusive.

5. ¿Ha tenido alguna dificultad para ingerir los alimentos que le hemos dado?

5.1 Aceite virgen de oliva: Sí No

Si la respuesta es afirmativa: (marcar la opción que corresponda):

- Demasiada cantidad
- No lo tolera
- No le gusta
- Otros motivos. Indique cuáles:

Otras observaciones (ej., calidad del aceite)

5.2 Frutos secos: Sí No

Si la respuesta es afirmativa: (marcar la opción que corresponda):

- Demasiada cantidad
- Dificultad para masticarlos... ¿Cómo se ha solucionado?
- No los tolera
- Otros motivos. Indique cuáles:
- No le gustan

Otras observaciones (ej., calidad de los frutos secos)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

ANEXO 8.
Cuestionario de seguimiento.
Estudio PREDIMED

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

ESTUDIO PREDIMED

Cuestionario de seguimiento

Identificador del participante:

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Nodo	C.Salud	Médico	Paciente	Visita

Nodo: anotar el número de nodo correspondiente.

01. Andalucía - Málaga / 02. Andalucía - Sevilla - S.Pablo / 03. Andalucía - Sevilla - V.Rocio / 04. Baleares /
05. Cataluña - Barcelona norte / 06. Cataluña - Barcelona Sur / 07. Cataluña - Reus - Tarragona / 08. Madrid Norte /
09. Madrid Sur / 10. Navarra / 11. País Vasco / 12. Valencia

C.Salud: anotar el número del centro de salud correspondiente.

Médico: anotar el número del médico correspondiente.

Paciente: anotar el número del paciente correspondiente.

Visita: anotar el número de visita correspondiente.

00. Inclusión - exclusión / 01. Visita Inicial / 02. Visita 3 meses / 03. Visita 1 año / 04. Visita 2 años / 05. Visita 3 años

Fecha del examen

<input type="text"/>	/	<input type="text"/>	/	20	<input type="text"/>
Día		Mes		Año	

NIF

CIP

Información de contacto (Pariente o amigo):

Primer apellido	Segundo apellido	Nombre
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Teléfono	Teléfono	
<input type="text"/>	<input type="text"/>	

Ha cambiado su estado civil desde la última visita: sí no

Estado Civil: Soltero/a Casado/a Viudo/a Divorciado/a Separado/a Religioso

Ha cambiado el número de personas con las que comparte el hogar desde la última visita: sí no

Número de personas con las que comparte el hogar:

Ha cambiado su situación laboral desde la última visita: sí no

¿Cuál es su situación laboral actual?

Está trabajando Incapacidad permanente Ama de casa Estudiante Jubilado
 Trabajo pero tiene una baja laboral de más de tres meses Paro con subsidio Paro sin subsidio Datos insuficientes

Qué trabajo concreto hace o hacía

Qué trabajo concreto hace o hacía el/la cabeza de familia

EXPLORACIÓN FÍSICA

Altura m Peso kg IMC kg/m² Cintura cm

		Presión Arterial Sistólica	Presión Arterial Diastólica	Frecuencia Cardíaca
Extremidad superior izquierda	1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
(paciente sentado)	2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Extremidad superior derecha	1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
(paciente sentado)	2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
DOPPLER (paciente decubito supino)				
Extremidad superior derecha	1	<input type="text"/>		
Extremidad inferior izquierda	1	<input type="text"/>		
Extremidad inferior derecha	1	<input type="text"/>		

Anotación de incidencias

Tipo de recogida de la información:

Presencial

Teléfono

Historia Clínica

última fecha en historia clínica

/ / 20

Otros

Día

Mes

Año

Adhesión a la intervención:

Buena

Regular

Mala

Muestra biológica en este seguimiento:

Sí

No



En pacientes diabéticos, ¿le han diagnosticado en el último año algunas de las siguientes complicaciones?

Afectación renal sí no datos insuficientes

En caso de afectación renal, el empeoramiento de la función renal ha motivado que entrara en un programa de diálisis

sí no datos insuficientes

Afectación de la retina por la diabetes (Retinopatía diabética) que haya motivado un tratamiento con laser

sí no datos insuficientes

¿Le han diagnosticado en el último año de cataratas?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido sometido a algún tipo de intervención quirúrgica este último año? (En caso afirmativo indique cual)

sí no datos insuficientes

¿Ha desarrollado en este último año algún tipo de enfermedad que no se le hubiera diagnosticado previamente? (En caso afirmativo indique cual)

sí no datos insuficientes

Durante el último mes, ¿Ha tomado algún medicamento de los siguientes?

Aspirina, Adiro o similar sí no no sabe / no contesta

Otras medicinas para aliviar el dolor o la fiebre sí no no sabe / no contesta

Tranquilizantes, sedantes, pastillas para la ansiedad, pastillas para dormir. sí no no sabe / no contesta

Vitaminas o minerales sí no no sabe / no contesta

Medicamentos para el corazón sí no no sabe / no contesta

Medicamentos para la presión arterial sí no no sabe / no contesta

Medicamentos para el colesterol sí no no sabe / no contesta

Insulina sí no no sabe / no contesta

Medicamentos para la diabetes (diferentes de la insulina) sí no no sabe / no contesta

Solo mujeres: Tratamiento hormonal sí no no sabe / no contesta

Otros sí no no sabe / no contesta

En caso afirmativo, nombre del medicamento/s y dosis

	mañana	mediodía	noche
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1
<input type="text"/>	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1/2 <input type="radio"/> 1

¿Ha cambiado este tipo de medicación en el último año? sí no datos insuficientes

● ¿Fuma usted cigarrillos actualmente?

sí ex-fumador de 0 a 1 año ex-fumador de 1 a 5 años ex-fumador > de 5 años nunca fumador datos insuficientes

¿Aproximadamente, ¿cuántos cigarrillos, puros o pipas fuma al día?

cigarrillos/día puros/día pipas/día 88 = no procede 99 = datos insuficientes

Ha cambiado su hábito tabáquico en los últimos 6 meses: sí no

EN LAS SIGUIENTES PREGUNTAS, en caso afirmativo solicitar informe médico y rellenar hoja de eventos.

¿Se le ha diagnosticado en el último año de diabetes?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que se le hayan hallado cifras de colesterol alto?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que tenga la tensión alta?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que haya tenido alguna vez un infarto de miocardio en el último año?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que haya tenido alguna vez una angina de pecho en el último año?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que le hayan practicado una angioplastia coronaria con o sin implantación de stent o realizado una intervención de bypass coronario quirúrgico?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que haya sufrido un paro cardíaco del que haya recuperado en el último año?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que haya sufrido alguna arritmia en el último año?

sí no datos insuficientes

¿Ha sido usted informado por personal sanitario, que haya sufrido un accidente vascular cerebral en el último año?

sí no datos insuficientes

¿Le han diagnosticado en el último año de aneurisma de aorta?

sí no datos insuficientes

¿Ha notado en el último año, que se cansa excesivamente o le falta el aire al realizar algún ejercicio (subir escaleras, caminar, etc.)?

- No disnea
 Disnea a grandes esfuerzos (bailar, caminar durante media hora, trabajos de jardinería, etc.)
 Disnea a moderados esfuerzos (ducharse, vestirse, etc.)
 Disnea a mínimos esfuerzos (cualquier actividad, levantarse de la cama)
 Disnea sin especificar grado
 Datos insuficientes

¿En el último año, le han diagnosticado de un trastorno circulatorio en las piernas?

sí no datos insuficientes

¿Ha motivado este trastorno circulatorio que le intervinieran quirúrgicamente o que le amputaran parte de una extremidad?

sí no datos insuficientes

Última ingesta de aceite de oliva virgen / / 20 desayuno comida cena 8

Última ingesta de bebida alcohólica o vino / / 20 desayuno comida cena 8

11.2. APORTACIONES CIENTÍFICAS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES BIOQUÍMICOS EMERGENTES RELACIONADOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Andrés Díaz López

Aportaciones científicas

Publicaciones propias derivadas del presente trabajo de Tesis Doctoral

Díaz-López A, Chacón MR, Bulló M, Maymó-Masip E, Martínez-González MA, Estruch R, Vendrell J, Basora J, Díez-Espino J, Covas MI, Salas-Salvadó J. **Serum sTWEAK concentrations and risk of developing type 2 diabetes in a high cardiovascular risk population: a nested case-control study.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(8): 3482-90. PMID: 23760626. Factor de impacto: 6,31

Díaz-López A, Bulló M, Chacón MR, Estruch R, Vendrell J, Díez-Espino J, Fitó M, Corella D, Salas-Salvadó J. **Reduced circulating sTWEAK levels are associated with metabolic syndrome in elderly individuals at high cardiovascular risk.** *Cardiovasc Diabetol.* 2014; 13: 51. PMID: 24565471. Factor de impacto: 4,015

Díaz-López A, Bulló M, Juanola-Falgarona M, Martínez-González MA, Estruch R, Covas MI, Arós F, Salas-Salvadó J. **Reduced serum concentrations of carboxylated and undercarboxylated osteocalcin are associated with risk of developing type 2 diabetes mellitus in a high cardiovascular risk population: a nested case-control study.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(11): 4524-31. PMID: 24037881. Factor de impacto: 6,31

Otras publicaciones realizadas durante el transcurso de la tesis

Guasch-Ferré M, Bulló M, Martínez-González MÁ, Corella D, Estruch R, Covas MI, Arós F, Wärnberg J, Fiol M, Lapetra J, Muñoz MÁ, Serra-Majem L, Pintó X, Babio N, **Díaz-López A**, Salas-Salvadó J. **Waist-to-height ratio and cardiovascular risk factors in elderly individuals at high cardiovascular risk.** *PLoS One.* 2012; 7(8): e43275. PMID: 22905246.

Guasch-Ferré M, Bulló M, Costa B, Martínez-Gonzalez MÁ, Ibarrola-Jurado N, Estruch R, Barrio F, Salas-Salvadó J; **PREDI-PLAN Investigators. A risk score to predict type 2 diabetes mellitus in an elderly Spanish Mediterranean population at high cardiovascular risk.** *PLoS One.* 2012; 7(3): e33437. PMID: 22442692.

Díaz-López A, Bulló M, Martínez-González MÁ, Guasch-Ferré M, Ros E, Basora J, Covas MI, del Carmen López-Sabater M, Salas-Salvadó J; **PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) Reus Study Investigators. Effects of Mediterranean diets on kidney function: a report from the PREDIMED trial.** *Am J Kidney Dis.* 2012; 60(3): 380-9. PMID: 22541738.

Díaz-López A, Bulló M, Basora J, Martínez-González MÁ, Guasch-Ferré M, Estruch R, Wärnberg J, Serra-Majem L, Arós F, Lapetra J, Ros E, Pintó X, Covas MI, Salas-Salvadó J. **Cross-sectional associations between macronutrient intake and chronic kidney disease in a population at high cardiovascular risk.** *Clin Nutr.* 2013; 32(4): 606-12. PMID: 23141101.

Ibarrola-Jurado N, Bulló M, Guasch-Ferré M, Ros E, Martínez-González MA, Corella D, Fiol M, Wärnberg J, Estruch R, Román P, Arós F, Vinyoles E, Serra-Majem L, Pintó X, Covas MI, Basora J, Salas-Salvadó J; **PREDIMED Study Investigators. Cross-sectional assessment of nut consumption and obesity, metabolic syndrome and other cardiometabolic risk factors: the PREDIMED study.** *PLoS One.* 2013; 8(2): e57367. PMID: 23460844.

Juanola-Falgarona M, Cándido-Fernández J, Salas-Salvadó J, Martínez-González MA, Estruch R, Fiol M, Arija-Val V; Mònica Bulló; **PREDIMED_Study Investigators. Association between serum ferritin and osteocalcin as a potential mechanism explaining the iron-induced insulin resistance.** *PLoS One.* 2013; 8(10): e76433. PMID: 24167545.

Babio N, Ibarrola-Jurado N, Bulló M, Martínez-González MÁ, Wärnberg J, Salaverría I, Ortega-Calvo M, Estruch R, Serra-Majem L, Covas MI, Sorli JV, Salas-Salvadó J; **PREDIMED Study Investigators. White blood cell counts as risk markers of developing metabolic syndrome and its components in the PREDIMED study.** *PLoS One.* 2013; 8(3): e58354. PMID: 23526980.

Guasch-Ferré M, Bulló M, Martínez-González MÁ, Ros E, Corella D, Estruch R, Fitó M, Arós F, Wärnberg J, Fiol M, Lapetra J, Vinyoles E, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Ruiz-Gutiérrez V, Basora J, Salas-Salvadó J; **PREDIMED study group. Frequency of nut consumption and mortality risk in the PREDIMED nutrition intervention trial.** *BMC Med.* 2013; 11: 164. PMID: 23866098.

Salas-Salvadó J, Bulló M, Estruch R, Ros E, Covas MI, Ibarrola-Jurado N, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Romaguera D, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez-González MA. **Prevention of diabetes with Mediterranean diets: a subgroup analysis of a randomized trial.** *Ann Intern Med.* 2014; 160(1): 1-10. PubMed PMID: 24573661.

Juanola-Falgarona M, Salas-Salvadó J, Ibarrola-Jurado N, Rabassa-Soler A, **Díaz-López A**, Guasch-Ferré M, Hernández-Alonso P, Balanza R, Bulló M. **Effect of the glycemic index of the diet on weight loss, modulation of satiety, inflammation, and other metabolic risk factors: a randomized controlled trial.** *Am J Clin Nutr.* 2014; 100(1): 27-35. PMID: 24787494.

Mayneris-Perxachs J, Sala-Vila A, Chisaguano M, Castellote AI, Estruch R, Covas MI, Fitó M, Salas-Salvadó J, Martínez-González MA, Lamuela-Raventós R, Ros E, López-Sabater MC; **PREDIMED Study Investigators. Effects of 1-year intervention with a mediterranean diet on plasma Fatty acid composition and metabolic syndrome in a population at high cardiovascular risk.** *PLoS One.* 2014; 9(3): e85202. PMID: 24651160.

Flores-Mateo G, Elosua R, Rodriguez-Blanco T, Basora-Gallisa J, Bulló M, Salas-Salvadó J, Martínez-González MÁ, Estruch R, Corella D, Fitó M, Fiol M, Arós F, Gómez-Gracia E, Subirana I, Lapetra J, Ruiz-Gutiérrez V, Sáez GT, Covas MI; **PREDIMED Study Investigators. Oxidative stress is associated with an increased antioxidant defense in elderly subjects: a multilevel approach.** *PLoS One.* 2014;9(9): e105881. PMID: 25269026.

Becerra-Tomás N, Estruch R, Bulló M, Casas R, **Díaz-López A**, Basora J, Fitó M, Serra-Majem L, Salas-Salvadó J. **Increased serum calcium levels and risk of type 2 diabetes in individuals at high cardiovascular risk.** *Diabetes Care.* 2014; 37(11): 3084-91. PMID: 25139884.

Martínez-González MÁ, Toledo E, Arós F, Fiol M, Corella D, Salas-Salvadó J, Ros E, Covas MI, Fernández-Crehuet J, Lapetra J, Muñoz MA, Fitó M, Serra-Majem L, Pintó X, Lamuela-RaventósRM, Sorlí JV, Babio N, Buil-Cosiales P, Ruiz-Gutierrez V, Estruch R, Alonso A;

PREDIMED Investigators. Extravirgin olive oil consumption reduces risk of atrial fibrillation: the PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) trial. *Circulation*. 2014; 130(1): 18-26. PMID: 24787471.

Díaz-López A, Bulló M, Martínez-González MA, Corella D, Estruch R, Fitó M, Gómez-Gracia E, Fiol M, García de la Corte FJ, Ros E, Babio N, Serra-Majem L, Pintó X, Muñoz MÁ, Francés F, Buil-Cosiales P, Salas-Salvadó J. Dairy product consumption and risk of type 2 diabetes in an elderly Spanish Mediterranean population at high cardiovascular risk. *Eur J Nutr*. 2015 Feb 7. [Epub ahead of print]. PMID: 25663611.

Babio N, Becerra-Tomás N, Martínez-González MÁ, Corella D, Estruch R, Ros E, Sayón-Orea C, Fitó M, Serra-Majem L, Arós F, Lamuela-Raventós RM, Lapetra J, Gómez-Gracia E, Fiol M, **Díaz-López A, Sorlí JV, Martínez JA, Salas-Salvadó J; PREDIMED Investigators. Consumption of Yogurt, Low-Fat Milk, and Other Low-Fat Dairy Products Is Associated with Lower Risk of Metabolic Syndrome Incidence in an Elderly Mediterranean Population.** *J Nutr*. 2015 Aug 19. pii: jn214593. [Epub ahead of print] PMID: 26290009.

Díaz-López A, Babio N, Martínez-González MA, Corella D, Amor AJ, Fitó M, Estruch R, Arós F, Gómez-Gracia E, Fiol M, Lapetra J, Serra-Majem L, Basora J, Basterra-Gortari J, Zanon-Moreno V, Muñoz MA, Salas-Salvadó J and PREDIMED Study Investigators. Mediterranean diet, retinopathy and nephropathy microvascular diabetes complications: A post hoc analysis of a randomized trial. *Diabetes Care*. 2015; 38: 1-8. DOI: 10.2337/dc15-1117. PMID: 26370380.

Becerra-Tomás N, Guasch-Ferré M, Quilez J, Merino j, Ferré R, **Díaz-López A, Bulló M, Hernández-Alonso P, Pala-Galindo A, Salas-Salvadó J. Effect of functional bread rich in potassium, γ -aminobutyric acid and angiotensin converting enzyme inhibitors on blood pressure, glucose metabolism and endothelial function: a double-blind randomized crossover clinical trial.** *MEDICINE*. 2015 (aceptado).

Autores (por orden de firma): Jordi Salas-Salvadó, Anna Bonasai Sanjaume, Roser trallero Casañas, M. Engràcia Saló i Solà, Rosa Burgos Peláez. Título de libro: **Nutrición y Dietética Clínica, 3ª edición. Capítulo de libro (páginas): 25 (269-271).** Año: 2014. Editorial: *ELSEVIER MASSON*. Lugar de publicación: España.

Participación en proyectos de investigación

Título de proyecto: **Determinantes clásicos, nutricionales y bioquímicos de la incidencia de diabetes tipo 2 en la cohorte del estudio PREDIMED.**

Expediente: PI1001407.

Empresa o administración financiadora: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Duración (meses): 2011-2013 (36).

Investigador Principal: Prof. Jordi Salas-Salvadó.

Cargo en el proyecto: **Investigador asociado.**

Título de proyecto: **Efecto de pan funcional reducido en sal y fermentado con masa madre de lactobacillus brevis con capacidad para formar ácido γ -amino butírico, sobre la tensión arterial, el metabolismo de la glucosa y la función endotelial.**

Expediente: PV13039S.

Empresa o administración financiadora: Europastry S.A.

Duración (meses): 2014-2015 (24).

Investigador principal: Prof. Jordi Salas-Salvadó.

Cargo en el proyecto: **Investigador asociado.**

Título de proyecto: **PREDIMED-PLUS: Efecto de una dieta mediterránea hipocalórica y promoción de la actividad física en la prevención primaria cardiovascular. Estudio piloto sobre marcadores intermedios y la calidad de vida.**

Expediente: 2013ACUP00194.

Empresa o administración financiadora: Recercaixa.

Entidades participantes: IISPV – URV.

Duración (meses): 2014-2015 (24).

Investigador principal: Prof. Jordi Salas-Salvadó.

Cargo en el proyecto: **Investigador asociado.**

Título de proyecto: **Efecto de una dieta mediterránea hipocalórica y promoción de la actividad física en prevención primaria cardiovascular. Estudio piloto sobre marcadores intermedios. Proyecto coordinado.**

Expediente: PI13/00462 .

Empresa o administración financiadora: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Entidades participantes: IISPV – URV.

Duración (meses): 2014-2016 (36).

Investigador principal: Prof. Jordi Salas-Salvadó.

Cargo en el proyecto: **Investigador asociado.**

Contribuciones a congresos científicos

Congreso: **11th European Nutrition Conference (FENS)**. Madrid, 26-29 de Octubre del 2011.

Autores: Díaz López A, Bulló Bonet M, Moreno-Navarrete J, Fernández-Real J, Salas-Salvadó J.

Título: ***Total and undercarboxylated osteocalcin predict changes in insulin sensitivity and beta cell function.***

Formato: **Póster.**

Publicación: *Ann Nutr Metab* 2011; 58 (suppl 3):279.

Sesiones Científicas del CCNIEC: Aliments Funcionals, Reus, 17 de novembre de 2011.

Organització: Centre Català de la Nutrició (CCNIEC).

Horas: 6 h.

Congreso: **IV Symposium Ciber Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn): Nuevos avances en Obesidad y Nutrición**. Málaga; 10-11 de Noviembre de 2011.

Autores: Díaz-López A, Bulló M, Martínez-González MA, Guasch-Ferré M, Ros E, Basora J, Covas MI, Salas-Salvadó J, for the PREDIMED study investigators.

Título: ***Mediterranean diet and renal function: Cross-sectional evaluation and results of one-year intervention in the Reus cohort of the PREDIMED Study.***

Formato: **Póster.**

Publicación: Abstract Book; p.35. Depósito Legal: M-43-380-2011.

Congreso: **IXth Barcelona International Conference on the Mediterranean Diet, a healthy lifestyle for obesity prevention**. Barcelona, 27-28 de Marzo de 2012.

Autores: Díaz-López A, Bulló M, Martínez-González M^Á, Guasch-Ferré M, Ros E, Basora J, Covas MI, Del Carmen López-Sabater M, Salas-Salvadó J; PREDIMED Reus Study Investigators.

Título: ***Effects of Mediterranean diets on kidney function: a report from the PREDIMED trial.***

Formato: **Póster.**

Congreso: **I Congreso Médico-Quirúrgico de la Obesidad (XI Congreso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad-SEEDO; XV Congreso de la Sociedad Española de Cirugía de la Obesidad Mórbida y de las Enfermedades Metabólicas-SECO; Sección de Obesidad Mórbida de la AEC**. Madrid, 14-15 de Marzo del 2013.

Autores: Díaz-López A, Bulló M, Martínez-González MÁ, Guasch-Ferré M, Ros E, Basora J, Covas MI, Del Carmen López-Sabater M, Salas-Salvadó J; PREDIMED Reus Study Investigators.

Título: ***Concentraciones séricas del sTWEAK y riesgo de incidencia de diabetes mellitus tipo 2 en una población de alto riesgo cardiovascular: estudio de casos y controles anidado.***

Formato: **Comunicación oral.**

Publicación: Abstract Book; p. 1. Depósito Legal: M-7562-2013.

Congreso: **World Forum for Nutrition Research: Mediterranean Food on Health and Disease.** Reus (Tarragona), 20-21 de Mayo del 2013.

Autores: Díaz-López A, Bulló M, Martínez-González MA, Guasch-Ferré M, Estruch R, Wärnberg J, Arós F, Ros E, Covas MI, Salas-Salvadó J.

Título: ***Macronutrient intake, kidney function and chronic kidney disease: a cross-sectional study in a population at high cardiovascular risk.***

Formato: **Póster.**

Publicación: *Annals of Nutrition and Metabolism*, 62(suppl 2):1-90.

Congreso: **IUNS 20th International Congress of Nutrition.** Granada, 15-21 de Septiembre del 2013.

Autores: Díaz-López A, Bulló M, Juanola-Falgarona M, Martínez-González MA, Estruch R, Covas MI, Arós F, Salas-Salvadó J.

Título: ***Reduced serum concentrations of osteocalcin are associated with risk of developing type 2 diabetes mellitus in a high cardiovascular risk population.***

Formato: **Póster.**

Congreso: **III World Congress of Public Health Nutrition de Las Palmas de Gran Canarias.** Las Palmas de Gran Canarias, 7-12 de noviembre del 2014.

Autores: Díaz-López A, Bulló M, Martínez-González M.A, Corella D, Estruch R, Fitó M, Serra-Majem L, Lapetra J, Ros E, Basora J, Fiol M, Salas-Salvadó J.

Título: ***Dairy product intake and risk of type 2 diabetes in an elderly Spanish Mediterranean population at high cardiovascular risk.***

Formato: **Póster.**

Publicación: *International Journal of Community Nutrition*, Volume 0, (Supp), November 2014.

Congreso: **III Congreso FESNAD**. Sevilla, 5-7 de marzo del 2015.

Autores: Díaz López A, Bulló Bonet M, Martínez González MA, Corella Piquer D, Estruch Ribas R, Fitó Colomer M, Gómez-Gracia E, Fiol Sala M, García de la Corte F. J, Ros Rahola E, Babio Sánchez N, Serra Majem L, Pintó Sala X, Muñoz M.A, Francés Bozal F, Salas-Salvadó J.

Título: ***Consumo de productos lácteos y riesgo de diabetes tipo 2 en una población mediterránea con alto riesgo cardiovascular.***

Formato: **Póster**.

Publicación: *Nutrición Clínica en Medicina, libro de comunicaciones FESNAD 2015, Vol. IX -Nº 1-2015.*

Congreso: **III Congreso FESNAD**. Sevilla, 5-7 de marzo del 2015.

Autores: Babio Sánchez N, Becerra Tomás N, Martínez González MA, Corella Piquer D, Estruch Ribas R, Ros Rahola E, Sayón Orea C, Fitó Colomer M, Serra Majem L, Arós Borau F, Lamuela Raventós RM, Lapetra Peralta J, Gómez Gracia E, Fiol Sala M, Pintó Sala X, Díaz López A, Martínez Hernández JA, y Salas Salvadó J.

Título: ***Ingesta de leche, yogur y otros productos lácteos y riesgo de desarrollar síndrome metabólico en una población con alto riesgo cardiovascular***

Formato: **Póster**.

Publicación: *Nutrición Clínica en Medicina, libro de comunicaciones FESNAD 2015, Vol. IX -Nº 1-2015.*