

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2019/20

DOCTORANDO: NATTERO CHÁVEZ, MARÍA LÍA  
D.N.I./PASAPORTE: \*\*\*\*2843H

PROGRAMA DE DOCTORADO: D420-CIENCIAS DE LA SALUD  
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: BIOLOGÍA DE SISTEMAS  
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

En el día de hoy 29/01/20, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **MANUEL LUQUE RAMÍREZ**.

Sobre el siguiente tema: *ESTUDIO DE LA PREVALENCIA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA ASINTOMÁTICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL<sup>1</sup> de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 29 ENERO de 2020 de .....

EL PRESIDENTE

Fdo.: AGUSTÍN ALBILLOS MARTÍNEZ  
LOBO

EL SECRETARIO

Fdo.: DOMINGO OROZCO BELTRÁN

EL VOCAL

Fdo.: NURIA GARCÍA DE LA TORRE

Con fecha 24 de FEBRERO de 2020 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"  
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

FIRMA DEL ALUMNO,

Fdo.: NATTERO CHÁVEZ, MARÍA LÍA

La Secretaria de la Comisión Delegada

<sup>1</sup> La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de febrero, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por **NATTERO CHÁVEZ, MARÍA LÍA**, el día 29 de enero de 2020, titulada, *ESTUDIO DE LA PREVALENCIA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA ASINTOMÁTICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1* para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.


Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

**MENCIÓN "CUM LAUDE"**

EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA  
 F. Javier de la Mata de la Mata  
 Documento fechado y firmado digitalmente

**Copia por e-mail a:**

Doctorando: NATTERO CHÁVEZ, MARÍA LÍA  
 Secretario del Tribunal: DOMINGO OROZCO BELTRÁN  
 Director de Tesis: MANUEL LUQUE RAMÍREZ

<b>Código Seguro De Verificación:</b>	2nMSuFhQ6+N3KvNHT1bX5Q==	<b>Estado</b>	<b>Fecha y hora</b>	
<b>Firmado Por</b>	Francisco Javier De La Mala De La Mata - Vicerrector de Investigación Y Transferencia	Firmado	26/02/2020 12:10:24	
<b>Observaciones</b>		<b>Página</b>	9/17	
<b>Uri De Verificación</b>	<a href="https://vfirma.uah.es/vfirma/code/2nMSuFhQ6+N3KvNHT1bX5Q==">https://vfirma.uah.es/vfirma/code/2nMSuFhQ6+N3KvNHT1bX5Q==</a>			

### DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_  
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, se  
procede, con fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis en el Servicio de Estudios Oficiales de  
Posgrado, con número de páginas: \_\_\_\_\_.

Alcalá de Henares a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_



Pilar de la Vega Gallego  
Fdo. El Funcionario



---

ESTUDIO DE LA PREVALENCIA  
Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS  
DE LA ENFERMEDAD  
VASCULAR PERIFÉRICA  
ASINTOMÁTICA EN  
PACIENTES CON DIABETES  
MELLITUS TIPO 1

---

TESIS DOCTORAL



LÍA NATTERO CHÁVEZ



# Programa de Doctorado en CIENCIAS DE LA SALUD

## TESIS DOCTORAL

### TITULO:

ESTUDIO DE LA PREVALENCIA Y CARACTERÍSTICAS  
CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD VASCULAR  
PERIFÉRICA ASINTOMÁTICA EN PACIENTES CON  
DIABETES MELLITUS TIPO 1

DOCTORANDA: LÍA NATTERO CHÁVEZ

DIRECTOR: DR. MANUEL LUQUE-RAMÍREZ

TUTOR: DR. HÉCTOR F. ESCOBAR-MORREALE

Alcalá de Henares, 2019.

MANUEL LUQUE RAMIREZ, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Alcalá, Jefe de Sección del Área de Diagnóstico y Terapéutica del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid y Profesor Asociado de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA

Que LÍA NATTERO CHÁVEZ, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo su dirección el trabajo *“Estudio de la Prevalencia y características clínicas de la enfermedad arterial periférica asintomática en pacientes con diabetes mellitus tipo 1”*.

Considera satisfactorio el trabajo realizado y apto para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que conste a efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid, a 9 de septiembre del 2019.



Fdo. Manuel Luque Ramírez.





Hospital Universitario  
Ramón y Cajal

 Comunidad de Madrid

HÉCTOR F. ESCOBAR-MORREALE, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid, Jefe del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid y Profesor Titular de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA

Que LÍA NATTERO CHÁVEZ, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo su tutela el trabajo *“Estudio de la Prevalencia y características clínicas de la enfermedad arterial periférica asintomática en pacientes con diabetes mellitus tipo 1”*.

Considera satisfactorio el trabajo realizado y apto para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que conste a efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid, a 9 de septiembre del 2019.

Fdo. Héctor F. Escobar Morreale.





INFORME DEL DIRECTOR/A DE TESIS SOBRE "ANÁLISIS DE COINCIDENCIAS" DE LA TESIS DOCTORAL A TRAVÉS DEL PROGRAMA TURNITIN

D./D<sup>a</sup> MANUEL LUGUE RAMÍREZ

(en el caso de varios directores se debe incluir a todos ellos), director/es de tesis, AUTORIZA/N a

D./D<sup>a</sup> MARIA LIA NATTERO CHAVEZ, defender la Tesis Doctoral que

tiene por título ESTUDIO DE LA PREVALENCIA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA ASINTOMÁTICA EN PACIENTES CON DIABETES MELITUS TIPO 1

El trabajo presentado ha sido analizado por la plataforma TURNITIN, arrojando un porcentaje de coincidencias del 20%.

Justificación de la autorización (obligatorio en caso de que el porcentaje supere el 24%):

*(Aunque solo es obligatorio cuando supera el 24%, puede ser adecuado comentar a que se deben las coincidencias detectadas cuando el porcentaje sea inferior, despejando cualquier duda sobre la originalidad del trabajo)*

Todas las coincidencias corresponden con porcentajes del 1% o <1%, y se corresponden con terminología general, definiciones, referencias de normativa, y/o abreviaturas que no comprometen en ningún caso la originalidad del trabajo ni afectan a este.

En Alcalá de Henares, a 1 de OCTUBRE de 2019

Firmado: Manuel Luge

Informada la Comisión Académica:

Fecha: 7-10-2019

Edo del Valle

Firmado: Presidente de la Comisión Académica del Programa



Dr. D. Pedro de la Villa Polo, Coordinador de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud.

**INFORMA** que la Tesis Doctoral titulada **ESTUDIO DE LA PREVALENCIA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA ASINTOMÁTICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1**, presentada por Dña. **MARÍA LÍA NATTERO CHÁVEZ**, bajo la dirección del Dr. D. Manuel Luque Ramírez, ha sido realizada por compendio de artículos, reuniendo los requisitos exigidos a este tipo de tesis, así como los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal. Esta Comisión ha tenido también en cuenta la evaluación positiva anual del doctorando, habiendo obtenido las correspondientes competencias establecidas en el Programa.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares a 04 de noviembre de 2019.


Fdo.: Pedro de la Villa Polo



## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis está dedicada a mi padre, quien me enseñó que el mejor conocimiento que se puede tener es el que se aprende por uno mismo. Para vos, Ricky. También es para mi madre, quien con su ejemplo me ilustró en que incluso la tarea más grande se puede lograr si se hace un paso a la vez.

Este trabajo, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación, no hubiese sido posible sin la cooperación de todas las personas que me acompañaron en un recorrido laborioso, muchas de las cuales han sido un fuerte soporte en todo momento. Primero y, ante todo, gracias Manuel por partida doble, por tu apoyo incondicional desde el punto de vista personal y profesional. Sin ti no hubiese sido posible. A mis niñas, Sofía y Candela. A mis hermanos. Al tutor, Héctor Escobar que con su amplia experiencia me orientó con éxito a la consecución de este trabajo. A mis compañeros que colaboraron desinteresadamente con gran dedicación y esfuerzo, sin los cuales hubiese sido imposible su culminación: Sara Alonso, Elena Fernández, Beatriz Dorado, Belén Arias, Sandra Redondo, Marta Garnica, María Cortés y Maite Pozuelo.

Y finalmente, como dejar de agradecer a todos y cada uno de los pacientes que formaron parte activa de esta obra. Sin ellos no hubiese tenido comienzo.

Mil veces gracias.

## **ABREVIATURAS**

**ADA**, Asociación Americana de Diabetes; **ADYTEN**, Área de Diagnóstico y Terapéutica del Servicio de Endocrinología y Nutrición; **AGE**, productos finales de glicosilación avanzada; **CMH**, complejo mayor de histocompatibilidad; **CI**, consentimiento informado; **DAISY**, Diabetes Autoimmunity Study in the Young; **DCCT**, Ensayo Clínico de Complicaciones y Control de la Diabetes; **CV**, coeficiente de variación; **DM**, diabetes mellitus; **DM1**, diabetes mellitus tipo 1; **DM2**, diabetes mellitus tipo 2; **EAP**, enfermedad arterial periférica; **ECV**, enfermedad cardiovascular; **EDIC**, Epidemiología de la Diabetes Intervenciones y Complicaciones; **ELISA**, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; **FGF-23**, factor de crecimiento de fibroblastos-23, **GAD**, descarboxilasa del ácido glutámico; **HbA<sub>1c</sub>**, hemoglobina glicada; **HDL-C**, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; **HLA**, antígeno leucocitario humano; **HIV**, virus de la inmunodeficiencia humana; **HR**, razón de riesgo, **IAA**, autoanticuerpo anti-insulina; **IA-2**, la proteína 2 asociada al insulinoma; **IC**, intervalo de confianza; **ICA**, autoanticuerpos contra células de los islotes; **ICA69**, anticuerpo anti proteína 69 kDa de células de los islotes; **IgM**, inmunoglobulina M; **IGRP**, la proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de islote; **IGIF**, factor inductor del interferón gamma; **IRYCIS**, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria; **LDL**, colesterol de lipoproteína de baja densidad; **MODY**, diabetes de adultos con debut en jóvenes; **NCA**, neuropatía cardíaca autonómica; **NGSP**, National Glicohemoglobin Standardized Program; **NHANES**, National Health and Nutrition Examination Survey, **NOD**, modelo de ratón diabético no obeso; **PA**, tensión arterial; **PTP**, proteína tirosina fosfatasa; **RAGE**, receptor para productos finales de glicación avanzada; **RIA**, radioinmunoanálisis; **RR**, riesgo relativo; **SHBG**, globulina transportadora de hormonas sexuales; **Th1**, células T

interferón gamma-positivas; **Tregs**, células T reguladoras; **SIDA**, síndrome de inmunodeficiencia adquirida.



## **ÍNDICE**

<b>1. Agradecimientos</b>	.....	Pág. 5
<b>2. Abreviaturas</b>	.....	Pág. 7
<b>3. Antecedentes y estado actual del tema</b>		
<b>3.1 Breve reseña histórica</b>	.....	Pág. 13
<b>3.2 Definición, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus tipo 1</b>	.....	Pág. 14
<b>3.3 Diabetes mellitus tipo 1 y enfermedad cardiovascular</b>	.....	Pág. 22
<b>3.4 Enfermedad arterial periférica en la diabetes mellitus tipo 1</b>	.....	Pág. 28
<b>3.5 Factores de riesgo para la enfermedad arterial periférica. Calcificación arterial de la media como promotor en la etiopatogenia de la enfermedad arterial periférica, y su relación con la neuropatía cardíaca autonómica</b>	.....	Pág. 34
<b>3.6 Dimorfismo sexual de la enfermedad cardiovascular en la diabetes</b>	.....	Pág. 39
<b>4. Interés del presente trabajo de investigación</b>	.....	Pág. 51
<b>5. Hipótesis de trabajo</b>	.....	Pág. 52
<b>6. Objetivos del estudio</b>	.....	Pág. 53
<b>7. Metodología</b>		
<b>7.1 Diseño</b>	.....	Pág. 55
<b>7.2 Población a estudio</b>	.....	Pág. 55
<b>7.2.1 Criterios de inclusión</b>	.....	Pág. 55
<b>7.2.2 Criterios de exclusión</b>	.....	Pág. 56
<b>7.3.1 Procedimientos</b>	.....	Pág. 56

7.3.2	Valoración y diagnóstico de la enfermedad arterial periférica	.....	Pág. 61
7.3.3	Valoración y definición de la neuropatía cardiaca autonómica	.....	Pág. 64
8.	<b>Retirada de sujetos del estudio</b>	.....	Pág. 66
9.	<b>Recogida y análisis de datos</b>		
9.1	Cálculo del tamaño muestral	.....	Pág. 67
9.2	Análisis estadístico	.....	Pág. 68
10.	<b>Limitaciones del estudio</b>	.....	Pág. 70
11.	<b>Plan de trabajo</b>	.....	Pág. 71
12.	<b>Aspectos éticos</b>		
12.1	Confidencialidad de los pacientes	.....	Pág. 74
12.2	Procedimiento de consentimiento informado	.....	Pág. 75
12.3	Compensación a los sujetos	.....	Pág. 76
12.4	Seguro de Responsabilidad Civil	.....	Pág. 76
12.5	Difusión de los resultados	.....	Pág. 76
13.	<b>Publicaciones en revistas internacionales derivadas del trabajo de investigación</b>	.....	Pág. 77
14.	<b>Comunicaciones en congresos internacionales derivadas del trabajo de investigación</b>	.....	Pág. 79
15.	<b>Comunicaciones en congresos nacionales derivadas del trabajo de investigación</b>	.....	Pág. 80
16.	<b>Conclusiones del trabajo</b>	.....	Pág. 85
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	.....	Pág. 89

• <b>ANEXO I</b>	
Aprobación del proyecto por el Comité de Ética Local.	..... Pág. 117
• <b>ANEXO II</b>	
Consentimiento informado.	..... Pág. 119
• <b>ANEXO III</b>	
Cuestionario de Edimburgo modificado para síntomas de claudicación intermitente.	..... Pág. 120
• <b>ANEXO IV</b>	
Hoja de recogida de datos de la valoración clínica del pie diabético.	..... Pág. 121
• <b>ANEXO V</b>	
Normas para los pacientes que se realizaron una MAPA.	..... Pág. 122
• <b>ANEXO VI.</b>	
Protocolo de monitorización de la función cardiovascular, el orden de realización de la exploración y los valores de normalidad.	..... Pág. 123



### 3. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

#### 3.1 BREVE RESEÑA HISTORICA

La diabetes fue descrita por primera vez alrededor del año 1.500 A.C. por los antiguos egipcios, quienes la consideraron una circunstancia patológica en la que los individuos orinaban en exceso, acompañada de una pérdida ponderal involuntaria (1). El término diabetes mellitus (DM), que expresa el dulzor de la orina de los afectados, fue utilizado por primera vez por el médico griego *Aretaeus*, que vivió entre los años 80 y 138 D.C. (1). Sin embargo, no fue hasta el año 1776 cuando *Mathew Dobson* realmente comprobó un aumento de la concentración de glucosa en orina de los pacientes con esta enfermedad (2).

La DM fue reconocida como una entidad clínica con la fundación de la revista científica "*New England Journal of Medicine and Surgery*", en el año 1812 (3). En el momento de su reconocimiento, su prevalencia no estaba documentada, y se desconocían por completo los mecanismos fisiopatológicos responsables de la enfermedad. No existía ningún tratamiento efectivo y la DM resultaba ser fatal en semanas o meses después de su diagnóstico.

Fue ya en el año 1921 cuando *Frederick Banting* y *Charles Best* descubrieron la insulina, al revertir de forma experimental la DM inducida tras pancreatometomía total en perros, con un extracto de las células de islotes pancreáticos de animales sanos (4). Posteriormente, junto con *James Collip* y *John Macleod*, purificaron la insulina a partir de páncreas bovinos, y fueron los primeros en usarla para tratar exitosamente a un paciente con DM (3). A partir de entonces, la producción de la insulina y su uso terapéutico se extendió rápidamente alrededor de todo el mundo, transformando el panorama de una enfermedad de alta letalidad debida a las complicaciones agudas

derivadas de la hiperglucemia grave y a la deficiencia de insulina, al de una entidad crónica en la que la morbi-mortalidad viene derivada fundamentalmente de la afectación sistémica micro- y macrovascular.

En el transcurso de los últimos 200 años se han producido avances trascendentales en la comprensión de las causas subyacentes de la DM, el enfoque para su prevención y el tratamiento farmacológico, así como de sus complicaciones crónicas. Aunque la DM aún asocia una esperanza de vida reducida, las perspectivas para los pacientes con esta enfermedad han mejorado de forma espectacular permitiéndoles por lo general, llevar una vida activa y productiva durante muchas décadas (5).

## **3.2 DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN Y PATOGENIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1**

### **3.2.1 Definición de la diabetes mellitus**

La DM pertenece a un grupo de enfermedades metabólicas, consecuencia de la deficiencia en el efecto de la insulina resultante de una alteración en la función endocrina del páncreas o de una disminución en la sensibilidad a la insulina de los órganos diana. Durante el desarrollo de la enfermedad, la glucemia se eleva a valores anormales hasta alcanzar concentraciones nocivas para diferentes órganos y sistemas acompañándose, en mayor o menor medida, de alteraciones en el metabolismo lipídico y proteico, acarreado finalmente una afectación microvascular y macrovascular multiorgánica (6).

### **3.2.2 Clasificación de la diabetes mellitus**

En la clasificación vigente según la Asociación Americana de Diabetes (ADA) (6), bajo el término DM se engloban las siguientes categorías:

1. **Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)**, que se divide a su vez en dos subtipos: **DM1 A o autoinmune**, secundaria a una destrucción inmuno-mediada de las células  $\beta$  del páncreas que causa un déficit absoluto de insulina; y la **DM1 B o idiopática** en la que existe insulinopenia y tendencia a la cetoacidosis diabética, con iguales características clínicas y fenotípicas que aquellos con DM1 A, pero en la cual los marcadores serológicos de autoinmunidad son negativos y tampoco se encuentran haplotipos de predisposición en el sistema del antígeno leucocitario humano (HLA).

2. **Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)** secundaria a la presencia de resistencia a la acción de la insulina a nivel central y en tejidos periféricos, con una respuesta secretora compensadora insuficiente, y finalmente, una pérdida progresiva de la secreción endógena de insulina.

3. **Diabetes gestacional**. Se define como la diabetes diagnosticada en el transcurso del segundo o tercer trimestre de gestación, consecuencia del efecto diabetogénico de las hormonas placentarias.

4. **Diabetes por otras causas**, incluyendo un amplio espectro de subtipos de diabetes de diferente etiopatogenia, entre las que destacan:

- **Diabetes monogénica**: de transmisión genética, como la diabetes neonatal o la diabetes del adulto de debut en jóvenes (MODY).
- **Diabetes secundaria a enfermedades del páncreas exocrino**: como la diabetes relacionada con la fibrosis quística o con la pancreatitis crónica.
- **Diabetes inducida por medicamentos**. Se han descrito multitud de fármacos que podrían inducir el desarrollo de DM, especialmente en individuos con

predisposición, como los glucocorticoides, farmacoterapia para HIV/SIDA, o después de trasplantes de órganos.

- **Diabetes asociada a otras endocrinopatías** Como acromegalia, síndrome de Cushing, feocromocitoma, etc.

La DM1 y la DM2 son entidades metabólicas heterogéneas, en las que la clínica y la progresión de la enfermedad son muy variables. La clasificación etiológica es importante para determinar el manejo terapéutico de la enfermedad, pero en determinadas circunstancias, no es fácil establecerla en el momento del debut. El paradigma tradicional en el cual el diagnóstico de DM2 ocurre solo en adultos y la DM1 solo en la edad pediátrica, no es válido en la actualidad ya que ambas enfermedades pueden acontecer prácticamente a cualquier edad (7). En la DM1, pese a que la forma de presentación típica acontece en la infancia y adolescencia, en una cuarta parte de los casos debuta en adultos jóvenes. La DM1 continúa siendo la forma más prevalente de diabetes durante la infancia, ya que aproximadamente dos tercios de los nuevos diagnósticos se presentan en pacientes menores de 19 años, a pesar del aumento en la incidencia de DM2 observado recientemente en este grupo etario (8; 9). La forma de presentación sintomática es la tríada cardinal clásica consistente en poliuria, polidipsia y pérdida ponderal no justificada. La clave fisiopatológica es una disminución de la secreción de insulina resultando en hiperglucemia y una predisposición al desarrollo de cetoacidosis diabética, que es el cuadro clínico de presentación en aproximadamente un tercio de la población pediátrica (10). El inicio de la DM1 suele ser más variado en adultos, y en muchas ocasiones no presenta la tríada clínica cardinal clásica al debut (6). El debut de la DM1 ocurre frecuentemente en el contexto de un proceso intercurrente, siendo el origen infeccioso el desencadenante más frecuente.



Debido al incremento de la prevalencia de obesidad, especialmente en la infancia (11), en la actualidad no resulta excepcional la coexistencia de obesidad o síndrome metabólico y DM1, con datos de resistencia y deficiencia de insulina en el mismo paciente (12). Evidenciar la insulinoresistencia mediante determinaciones hormonales, o por medio de su expresión clínica - acantosis nigricans - o determinar la positividad del estudio de autoinmunidad o haplotipos HLA de predisposición, facilita el diagnóstico diferencial entre DM1 y DM2. Si bien en alguna circunstancia, al momento del debut puede existir cierta dificultad en la clasificación del subtipo de diabetes, la etiología suele tornarse más evidente con el paso del tiempo y el seguimiento evolutivo.

La consecuencia ineludible de la insulinopenia (ya sea absoluta o relativa) es la aparición de la hiperglucemia y, a partir de entonces, los pacientes con cualquier subtipo de DM corren el riesgo del desarrollo de las complicaciones crónicas asociadas, aunque con distinciones en las tasas de progresión según el subtipo de DM y comorbilidades coexistentes.

### **3.2.3 Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 1**

La fisiopatología está mejor caracterizada en la DM1 que en la DM2 (13). En ambos subtipos de DM, diversos factores genéticos y ambientales pueden inducir la pérdida progresiva de la masa y/o funcionalidad de las células  $\beta$ . La DM1 es el resultado de la destrucción autoinmune de la célula  $\beta$  pancreática. Este proceso ocurre en sujetos genéticamente susceptibles, con la interacción de agentes externos como desencadenantes, y con una progresión lenta durante los cuales el individuo se encuentra libre de síntomas. Estudios genómicos indican que los *loci* genéticos asociados a la DM1 y la DM2 no se superponen, aunque existen datos de que ciertos marcadores de

inflamación subclínica como la interleucina-1 podrían desempeñar un papel en la pérdida de la célula  $\beta$  en ambos subtipos de DM (14).

- **Susceptibilidad genética en la DM1**

Los alelos del HLA del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) son los que presentan una mayor asociación en el riesgo de desarrollar DM1. A pesar de ello, se estima que este *locus* representa menos del 50% de la susceptibilidad genética a la DM1, por lo que la co-asociación con otros *loci* de predisposición es obligatoria para el desarrollo de la enfermedad (15; 16).

La prevalencia poblacional de genotipos de alto riesgo es muy variable, explicando, probablemente, la razón por la que la DM1 tiene una incidencia étnica heterogénea. Los genes importantes de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad se localizan en el cromosoma 6p (17). Estos genes codifican moléculas que funcionan como sitio de unión peptídica para los antígenos implicados en la patogénesis de la DM1, posibilitando la presentación del mismo a los linfocitos T y desencadenando el proceso autoinmune destructivo (18-20). En particular, más del 90% de las personas con DM1 portan HLA-DR3, DQB1\*0201 (también conocido como DR3-DQ2) o HLA-DR4, DQB1\*0302 (también conocido como DR4-DQ8). Aproximadamente un tercio de los individuos son heterocigotos DR3/4, atribuyéndole una mayor susceptibilidad (15).

No obstante, el genotipo del CMH no es suficiente por si solo para inducir la aparición de la DM1, lo que sugiere un tipo de herencia poligénica (15). Así, los polimorfismos de un promotor del gen de insulina, los polimorfismos en el gen antígeno-4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (21), y una sustitución aminoacídica de la proteína tirosina fosfatasa (PTP) específica de linfocitos están asociados con el riesgo de DM1 (22; 23).

- **Autoinmunidad asociada a la DM1**

Previo al diagnóstico de la DM1, la mayor parte de los individuos presentan autoanticuerpos contra antígenos citoplasmáticos o de membrana de las células  $\beta$  pancreáticas. A partir de estudios realizados en familiares de primer grado de pacientes con DM1, se ha observado que la persistencia de dos o más autoanticuerpos es un potente factor predictor de DM1. La velocidad de progresión depende de la edad de la detección de anticuerpos y del número, la especificidad y el título de los mismos (24). El 85-90% de los individuos afectados son positivos en el momento del diagnóstico para alguno o más de un marcador de autoinmunidad pancreática. Sin embargo, el debut de DM1 de un adolescente con agammaglobulinemia ligada a X, sugiere que a pesar de que la autoinmunidad está presente en la mayoría de los pacientes afectos, la pérdida de las células  $\beta$  pancreáticas está relacionada fundamentalmente con la acción citotóxica de los linfocitos T (25).

Los autoanticuerpos ICA se observan en el 85% de los individuos con DM1 al diagnóstico y en sujetos pre-diabéticos (26). Los niños con coexistencia de varios anticuerpos parecen tener un daño celular más rápido y un mayor requerimiento de insulina exógena durante los primeros años tras su debut (27).

Se han descrito diversos autoantígenos dentro de la célula  $\beta$  implicados en el comienzo o la progresión del daño autoinmune (26). Tabla 1. De todos los anticuerpos identificados, los resultados de estudios en modelos animales demuestran la proinsulina / insulina es uno de los antígenos trascendentales en el desarrollo de la DM1 (28). Los autoanticuerpos anti-insulina (AAI) a pesar de su aparición precoz, pierde utilidad como marcador diagnóstico al instaurar tratamiento, ya que prácticamente todos los individuos desarrollan AAI exógena una vez comenzado el tratamiento con insulina subcutánea (30).

**Tabla 1.**

<b>Antígenos frente a los que se encuentran autoanticuerpos en la DM1 del humano</b>
Insulina
Ácido glutámico descarboxilasa
Antígenos asociados al insulinoma 2 ( $\alpha$ y $\beta$ )
ZnT8 (transportador de zinc)

Existen otros autoantígenos ubicados dentro de la célula  $\beta$  implicados en la iniciación y/o progresión de la lesión autoinmune de los islotes. Entre ellos se han descrito la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) (29) – con autoanticuerpos presentes en el 70% de los pacientes al momento del diagnóstico – la proteína 2 asociada al insulinoma (IA-2  $\alpha$  y  $\beta$ ) (30) – con autoanticuerpos presentes en el 58% de los pacientes al diagnóstico – y el transportador de zinc ZnT8 (31). Los autoanticuerpos IA-2 habitualmente aparecen con retraso en relación a los AAI y los anti-GAD, y están fuertemente asociados con la progresión a la DM1. La presencia de dos o más autoanticuerpos contra GAD, IA-2 o AAI (32) se ha descrito como un fuerte predictor de progresión a DM1 A. El autoanticuerpo contra el transportador de zinc ZnT8 se ha identificado en el 60 a 80% de los pacientes con DM1 de reciente diagnóstico (33). Al mismo tiempo, el 26% de los sujetos con reactividad negativa a otros anticuerpos (AAI, GAD, IA-2 e ICA) presentan los anticuerpos ZnT8 positivos, estableciendo el diagnóstico etiológico autoinmune de DM1 A. En el estudio *Diabetes AutoImmunity Study in the*

*Young* (DAISY), el seguimiento de bebés recién nacidos reveló que los autoanticuerpos ZnT8 aparecen posteriormente a los AAI (33), y generalmente desaparecen muy rápidamente tras el debut de la DM1 (34).

- **Factores ambientales establecidos con la DM1**

El rápido incremento en la incidencia de DM1 A en todo el mundo –incluida España – en las últimas décadas (35-37) del orden de un 3,5% anual y muy especialmente en niños menores de 5 años (38) sugiere la importancia de factores ambientales en el desarrollo de DM1. El motivo de este incremento (más allá del hecho obvio de que el tratamiento con insulina permite actualmente alcanzar la edad fértil y transmitir los genes de predisposición a su descendencia a muchos pacientes que previamente no llegaban a reproducirse) es desconocido. Existe una hipótesis, denominada la “*Teoría de la higiene*”, que relaciona la mejora del "saneamiento" con el aumento de los trastornos inmunomediados en general (39).

En un estudio europeo, diversos factores gestacionales (como la edad materna o la pre-eclampsia) así como perinatales se relacionaron también con un leve incremento en el riesgo de DM1 (40)(41).

Aunque se ha sugerido la activación autoinmune de origen viral en la patogenia de la DM1, su asociación continúa siendo incierta. Se ha observado respuesta mediada por inmunoglobulina M (IgM) específica del virus B de Coxsackie en el 39% de los niños con DM1 recién diagnosticada, en comparación con solo el 6% de los niños sanos (42). Datos observacionales (43) insinúan que la exposición a enterovirus, podría promover el desarrollo de DM. La posibilidad de autoinmunidad inducida por virus o mimetismo molecular está respaldada por la homología hallada entre la GAD y la proteína F2C del virus B4 de Coxsackie (44). Sin embargo, hay datos contradictorios acerca de la

influencia de los virus en la etiopatogenia de la DM1 (45) llegando incluso a postularse un papel protector frente el desarrollo de la DM1 (46).

La composición y la edad de introducción de diferentes componentes de la dieta podrían influir en la etiopatogenia de la DM1 (47). Se ha planteado que cierto componente de la albúmina bovina, utilizada en formulaciones de leche maternizada, podría desencadenar una respuesta autoinmune (48). Otra línea de investigación sugiere que una respuesta inmunomediada a una la  $\beta$ -caseína (proteína de origen vacuno), podría estar involucrada en la patogénesis de la DM1 (49; 50).

En bebés con un riesgo elevado de DM1, la introducción del cereal a la dieta podría inducir autoinmunidad y el desarrollo de DM1. En dos cohortes prospectivas de bebés con un riesgo elevado de DM1, la introducción del cereal previo a los tres meses de edad (51) o más tarde de los siete meses de edad (52) se asoció con un mayor riesgo de desarrollar autoanticuerpos de células de islote y DM1 (cociente de riesgo ajustado [HR] 3,33; IC 95%: 1,54 — 7,18) comparado con la introducción del cereal entre los cuatro y los seis meses (53).

### **3.3 DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

La DM es una de las enfermedades con mayor impacto sociosanitario, tanto por su frecuencia como por las consecuencias asociadas a las complicaciones crónicas que comporta la enfermedad, el importante papel que desempeña como factor de riesgo de aterosclerosis y patología cardiovascular. En individuos con DM, la ateromatosis de los grandes vasos se manifiesta como enfermedad cardiovascular (ECV), causa principal de morbilidad y mortalidad en estos pacientes, y la que en mayor medida contribuye al coste

directo e indirecto de la enfermedad (54; 55). Los individuos diagnosticados de DM desarrollan ECV con una frecuencia entre 2 a 4 veces mayor al compararlos con individuos sin DM, manteniendo ese exceso de riesgo tras ajustar con otros factores clásicos de riesgo CV (56). Como consecuencia, las complicaciones cardiovasculares atribuibles a la arteriosclerosis generan un importante gasto sanitario y una considerada reducción de la calidad de vida, siendo responsables del 80% de la mortalidad en los sujetos con DM y representando más del 75% del total de hospitalizaciones por complicaciones diabéticas (54; 55; 57-60).

En general, los eventos cardiovasculares son más frecuentes y ocurren más precozmente en los pacientes con DM1 que en la población general (64-65). La tasa de prevalencia de ECV en DM1 varía sustancialmente en base al tiempo de duración de la enfermedad, la edad de la cohorte, el sexo y las comorbilidades asociadas, y posiblemente también en relación con factores étnicos (61-63). La cohorte de Allegheny (Pittsburg, EE.UU.) demostró una incidencia de eventos coronarios en adultos jóvenes (entre 28 — 38 años) con DM1 de un 0,98% anual, superando el 3% anual después de los 55 años, lo que la convierte en la principal causa de mortalidad en ese grupo etario (64). En comparación, la incidencia del primer ECV en la población no diabética oscila entre 0,1% en personas de entre 35 a 44 años de edad, hasta llegar a un 7,4 % en adultos de 85 a 94 años (65).

No obstante, a pesar de un mayor riesgo de ECV en individuos con diagnóstico de DM1 (66), la fisiopatología subyacente a estos eventos, y la relación entre otros factores de riesgo de ECV y la DM1, no están bien documentadas. Muy recientemente, *Sousa et al.* (67) han comunicado que, en pacientes de la cohorte del DDCT/EDIC, la incidencia de ECV se asocia con la presencia de autoinmunidad cardiaca; en pacientes DM1 con mal control metabólico [hemoglobina glicada ( $HbA_{1c}$ ) > 9%], la presencia de 2

o más anticuerpos cardiacos al inicio del seguimiento se asoció a una mayor incidencia de ECV y calcificación coronaria décadas después. En contraposición, en pacientes con DM2 un control metabólico deficiente no parece asociarse con la presencia de autoinmunidad cardiaca, sugiriendo un posible mecanismo patogénico específico de la ECV en DM1. Del mismo modo, las anormalidades metabólicas asociadas al exceso de peso en la DM1, como el estado proinflamatorio subclínico, probablemente modifican el riesgo de ECV (66; 68), aunque de forma diferente a lo que acontece en la DM2 (56).

Los datos actuales y las recomendaciones de consenso apoyan que la DM, en general, debe ser considerada una situación de alto riesgo cardiovascular, en coexistencia de otros factores de riesgo cardiovasculares asociados, y en la mayoría de los pacientes tras 10 años del diagnóstico. Sin embargo, el enfoque diagnóstico-terapéutico encaminado a la prevención y reducción del riesgo de ECV en la DM1 se ha basado, en gran parte, de la extrapolación en la experiencia del manejo en la DM2 (56), en estudios poblacionales y ensayos clínicos aleatorizados en cohortes exclusivamente conformadas por pacientes con DM2, o del análisis de todos los pacientes con DM sin distinción del subtipo de la misma. Considerando las diferencias en el tiempo de evolución de la enfermedad, y la dispar fisiopatología subyacente a ambas entidades, es imprescindible aumentar la evidencia científica rigurosa acerca del incremento del riesgo cardiovascular y la presentación clínica de la ECV en la DM1.

La prevención de ECV en la DM1 se remonta en sus orígenes a los resultados del *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) (69), en el que se observó una tendencia hacia un menor número de eventos cardiovasculares en la rama de tratamiento intensivo en pacientes con DM1. Inmediatamente tras completar el DCCT (69), en el año 1993 se ofreció tratamiento intensivo a los pacientes del grupo convencional y el 93% de los participantes (n = 1.394) acordaron colaborar en su prolongación, el *Epidemiology of*



*Diabetes Interventions and Complications* (EDIC) (70). Al finalizar los 11 años de seguimiento del EDIC, la diferencia de HbA<sub>1c</sub> entre el brazo de tratamiento intensivo (HbA<sub>1c</sub> = 7,4 %) y el brazo de tratamiento convencional al final del ensayo DCCT (HbA<sub>1c</sub> = 9,1 %) se redujo considerablemente, con valores similares en ambas ramas de seguimiento (7,9% y 7,8%, respectivamente). La duración media de la terapia intensiva o convencional durante el DCCT fue de 6,5 años. Los eventos cardiovasculares en el EDIC incluyeron el infarto de miocardio no mortal, accidente cerebrovascular, muerte cardiovascular, angina documentada o revascularización coronaria. Durante todo el período de seguimiento (17 años de promedio), 46 eventos cardiovasculares ocurrieron en 31 pacientes de la rama intensiva, en comparación con 98 eventos en 52 pacientes del grupo de la rama convencional del DCCT (0,38 *versus* 0,80 eventos por 100 paciente-año) (70). Esta diferencia representó una disminución del 42% en cualquier evento cardiovascular (IC 95%: 9 — 63), así como una reducción del 57% de los eventos cardiovasculares graves (infarto de miocardio no mortal, accidente cerebrovascular o muerte por causa cardiovascular, IC 95%: 12 — 79) (70). En comparación con los pacientes de la rama de tratamiento convencional, aquellos pertenecientes al brazo de tratamiento intensivo del DCCT también presentaron una reducción de muerte de origen cardiovascular, durante el período de seguimiento de 17 años del EDIC (70). Más aún, en una publicación más reciente de DCCT / EDIC (71), con 1.429 pacientes seguidos aproximadamente durante 27 años, se observó una importante reducción relativa del riesgo, aunque modesta en términos absolutos, de mortalidad por todas las causas en pacientes inicialmente asignados a la rama de tratamiento intensivo (43 muertes en el grupo de terapia intensiva *versus* 64 en el grupo convencional [razón de riesgo (HR) 0,67; IC 95%: 0,46 — 0,99]) (71). Las causas más comunes de muerte fueron las ECV (22,4%), el cáncer (19,6%), y las complicaciones agudas de la DM (hipoglucemia y cetoacidosis

diabética, 17,8%). Por lo tanto, la rama intensiva de tratamiento durante el desarrollo del DCCT de tan solo 6,5 años de duración, redujo el riesgo de mortalidad durante al menos los siguientes 20 años, en comparación con la rama convencional, a pesar de ausencia en la diferencia en los niveles de HbA<sub>1c</sub> durante el período de observación posterior al DCCT. La presencia de albuminuria también se asoció de forma independiente con la ECV, pero las diferencias entre los dos grupos de tratamiento se mantuvieron después del ajuste de estos parámetros de afectación renal. Estos resultados apoyan que un control glucémico aceptable, mantenido en un periodo de tiempo (6,5 años de duración media del estudio DCCT) tiene un beneficio perdurable en la reducción de la morbilidad y mortalidad cardiovascular en los pacientes con DM1.

Los fundamentos propuestos para explicar este efecto incluyen una menor exposición a los productos finales de glicosilación avanzada (AGE), o el efecto en la reducción de la incidencia de la enfermedad renal y la neuropatía cardíaca autonómica (NCA), entidades que se han visto implicadas en el desarrollo de la ECV en pacientes con DM1. Una publicación derivada del estudio observacional EDIC (70) reveló que la progresión del grosor de la íntima-media carotídea, una medida de aterosclerosis subclínica, fue significativamente menor en aquellos pacientes de la rama intensiva en comparación con la rama convencional durante el DCCT (72).

Los resultados del DCCT/EDIC son respaldados por hallazgos similares de estudios observacionales. Como ejemplo, en un estudio de cohortes de 879 individuos con DM1 seguidos durante 20 años, los niveles elevados de HbA<sub>1c</sub> se asociaron con mortalidad cardiovascular y por todas las causas, independientemente de la duración de la DM1, el tabaquismo, la hipertensión y la proteinuria. Los individuos en el cuartil más alto de HbA<sub>1c</sub> ( $\geq 12\%$ ) mostraron un aumento de la mortalidad por todas las causas [riesgo

relativo (RR): 2,4; IC 95%: 1,5 — 3,8] y de origen cardiovascular (RR: 3,3; IC 95%: 1,8 — 6,1) en comparación con los individuos en el cuartil más bajo ( $\leq 9,4$  %) (73).

En la evaluación de la cohorte del *Swedish National Diabetes Registry*, en el que se siguieron a 33.915 pacientes con DM1 y 169.249 personas sin DM durante un periodo promedio de ocho años, la mortalidad fue mayor en las personas con DM1 (74). Aunque el riesgo se incrementó en aquellos sujetos con DM1 con los valores más elevados de HbA<sub>1c</sub> ( $\geq 9,7\%$ ), los pacientes con un HbA<sub>1c</sub>  $\leq 6,9$  % también tenían un incremento del riesgo respecto a la población sin DM. Sin embargo, estos hallazgos deben ser tomados con cautela dada la evaluación incompleta de los niveles de HbA<sub>1c</sub> para muchos de los pacientes durante el periodo de observación, lo que dificulta determinar si existe un exceso del riesgo de mortalidad en pacientes con adecuado control glucémico desde el momento del diagnóstico.

Resultado de los hallazgos del DCCT (69) y el EDIC (70; 75) se ha instaurado como objetivo del tratamiento de la DM1 el manejo intensivo frente a la terapia convencional. El manejo intensivo de la DM1 se ha convertido en el estándar del tratamiento y ha incrementado la longevidad de los pacientes con DM1 en nuestra práctica clínica habitual, mejorando su grado de control metabólico. Por otro lado, el fenotipo de la DM1 también se ha modificado, observándose un aumento de la prevalencia de obesidad y síndrome metabólico, que se asocia con parámetros de insulinoresistencia, y que repercute negativamente en el patrón de complicaciones crónicas tanto micro- como macrovasculares. Sin embargo, nuestro conocimiento de la ECV en la DM1 viene en gran parte, de la era anterior a los estudios previamente mencionados, con un control glucémico menos estricto del implementado en la actualidad. De ello deriva, el interés por obtener datos epidemiológicos y establecer la interrelación entre factores de riesgo y

eventos cardiovasculares en el perfil de pacientes que atendemos actualmente en nuestras consultas.

### **3.4 ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA EN LA DIABETES MELLITUS TIPO 1.**

La enfermedad arterial periférica (EAP) es una manifestación de la enfermedad oclusiva arterial arterioesclerótica en las extremidades inferiores. La EAP presenta una mayor prevalencia y se desarrolla de forma más prematura y extensa, en pacientes con DM en comparación con sujetos sin ella (76; 77). Mientras que la presencia de EAP es un factor de peso mayor para la amputación de miembros inferiores, especialmente en pacientes con DM (78-80), su presencia también es un marcador de enfermedad aterotrombótica en otros lechos vasculares del organismo (81). A pesar de que existe suficiente evidencia y conocimiento en relación con la EAP en la población general, en pacientes con DM su diagnóstico y manejo está menos establecido, careciendo de datos de calidad especialmente en población con DM1.

En mayo del año 2003, la ADA publicó un consenso sobre el manejo de la EAP en pacientes con DM (82). Después de un acuerdo de expertos en Endocrinología, Cardiología, Cirugía Vascular, Ortopedia y Podología, se intentó responder a las principales cuestiones que plantea el diagnóstico y manejo de la EAP en pacientes con DM de acuerdo a la evidencia existente en ese momento, aunque sin diferenciar claramente entre DM1 y la DM2.

Datos obtenidos del *Framingham Heart Study* (83) ponen de manifiesto que aproximadamente un 20% de los pacientes con EAP tienen un diagnóstico de DM, aunque

probablemente esta prevalencia esté infraestimada. Aproximadamente un 50% de los pacientes con EAP están asintomáticos o presentan síntomas atípicos (84), y aquellos pacientes con diagnóstico de EAP en un estadio clínico sintomático con claudicación intermitente tienen un compromiso arterial más grave (85). Sin embargo, es de crucial importancia subrayar que en aquellos pacientes considerados clínicamente como “asintomáticos”, la presencia de EAP subclínica es un marcador de enfermedad vascular con afectación sistémica de otros lechos arteriales como el coronario, el cerebral y el renal, elevando el riesgo de eventos cardiovasculares graves como infarto de miocardio o accidente cerebrovascular, lo que en definitiva se traduce en un aumento de la mortalidad cardiovascular (86-89). Este es uno de los motivos del creciente interés por la EAP, dada su capacidad predictiva tanto de enfermedad arteriosclerótica en otros territorios arteriales como de mortalidad cardiovascular (90).

Establecer la verdadera prevalencia de EAP en la población con DM es un reto por varios motivos: i) la forma de presentación más frecuente es la asintomática; ii) las modalidades de despistaje no están universalmente extendidas; y iii) la frecuente coexistencia de neuropatía diabética que puede enmascarar la sensación de dolor percibida por el paciente (76; 81; 82).

Asimismo, la estimación de la prevalencia de EAP se ve afectada por el método utilizado para su diagnóstico. Dos exploraciones ampliamente utilizadas para este fin son la palpación de pulsos periféricos en la exploración física y la presencia de síntomas compatibles con claudicación intermitente. Sin embargo, ambos abordajes diagnósticos carecen de la sensibilidad necesaria para el despistaje y diagnóstico de la enfermedad subclínica o paucisintomática (91). Una limitación similar caracteriza a los estudios de prevalencia basados en la tasa de amputación de miembros inferiores (82).

Con el fin de instaurar métodos de despistaje adecuados, consensuados y validados para la detección de las formas subclínicas de EAP en pacientes con DM1, que permitan establecer una actitud terapéutica preventiva efectiva en términos de reducción de mortalidad cardiovascular, es de vital importancia conocer su prevalencia. No obstante, como ya se ha comentado, los estudios de prevalencia y las indicaciones de despistaje de EAP actuales en pacientes con DM están basados en cohortes de sujetos con DM2, que no son necesariamente equiparables ni extrapolables a la población con DM1.

Aunque las guías de práctica clínica actuales difieren sustancialmente en las indicaciones de la realización del despistaje (Tabla 2), en general, se recomienda la utilización del índice tobillo-brazo (ITB) como prueba no invasiva inicial para excluir la EAP (82; 86; 92-97).

La validación de la medición del ITB mediante *eco-Doppler* en el despistaje de la EAP asintomática permite una estimación de la prevalencia más fiable que las exploraciones mencionadas previamente (86), con una sensibilidad del 95% y una especificidad cercana al 100% en estudios validados mediante confirmación angiográfica considerada como el patrón oro en el despistaje de la EAP (98). Un ITB menor de 0,9 es indicativo de EAP (82; 86; 99), permitiendo identificar una obstrucción superior al 50% en el territorio vascular de los miembros inferiores (100). Sin embargo, el rendimiento del ITB en pacientes con DM es variable, con sensibilidades y especificidades que rondan del 29% al 100%, y del 42% al 97%, respectivamente (91).

**Tabla 2.** Indicaciones de despistaje en pacientes con DM según las principales guías práctica clínica habitual. *Abreviaturas: CI, claudicación intermitente; DM, diabetes mellitus; ECV, enfermedad cardiovascular, EAP, enfermedad arterial periférica; ITB, índice tobillo-brazo; IDB, índice dedo-brazo.*

<b>Sociedad Científica</b>	<b>Año</b>	<b>Indicación de despistaje / Metodología (Nivel de Evidencia si disponible)</b>
<b><i>EAP en individuos con DM</i></b> (82)	American Diabetes Association <b>2003</b>	<p><b><u>Indicación</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\geq 50</math> años.</li> <li>▪ <math>&lt; 50</math> años y otros factores de riesgo incluyendo tabaquismo, hipertensión arterial, hipercolesterolemia o <math>&gt; 10</math> años de evolución de la DM.</li> </ul> <p><b><u>Metodología</u></b> ITB</p>
<b><i>Manejo de los pacientes con EAP</i></b> (96)	American College of Cardiology / American Heart Association <b>2011</b>	<p><b><u>Indicación</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\geq 1</math> de los siguientes: síntomas de CI, heridas con mala cicatrización, <math>&gt; 65</math> años o <math>&gt; 50</math> años con antecedentes de tabaquismo o DM</li> </ul> <p><b><u>Metodología</u></b> ITB (Nivel de evidencia: B)</p>
<b><i>Diagnóstico, Pronóstico y Manejo de la EAP en pacientes con úlceras del pie diabético</i></b> (97)	International Working Group on the Diabetic Foot <b>2015</b>	<p><b><u>Indicación</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No especificadas.</li> </ul> <p><b><u>Metodología</u></b> Historia clínica y palpación de pulsos periféricos. Se recomienda la combinación de pruebas no invasivas: el ITB, IDB y la morfología de onda de pulso arterial</p> <p>(Recomendación de GRADE: fuerte; Calidad de la evidencia: baja).</p>

<p><i>Manejo del Pie Diabético: Guía de práctica clínica</i> (95)</p>	<p>Society for Vascular Surgery / American Podiatric Association / Society for Vascular Medicine</p>	<p>2016</p>	<p><b><u>Indicación</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pacientes con DM <math>\geq</math> 50 años de edad</li> </ul> <p><b><u>Metodología:</u></b> ITB</p> <p>(Nivel de evidencia Grado 2C).</p>
<p><i>Guías Clínicas de Diagnóstico y Tratamiento de la EAP</i> (86)</p>	<p>European Society of Cardiology / European Society for Vascular Surgery</p>	<p>2017</p>	<p><b><u>Indicación</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No especificadas.</li> </ul> <p><b><u>Metodología:</u></b> ITB</p>
<p><i>Recomendaciones para el Pie Diabético en la Práctica Clínica</i> (92)</p>	<p>International Diabetes Federation</p>	<p>2017</p>	<p><b><u>Indicación</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pacientes con DM <math>\geq</math> 50 años. En &lt; 50 años en coexistencia de otros factores de riesgo (ECV o cerebrovascular, tabaquismo, hipertensión, hipercolesterolemia, o DM de más de 5 años de duración).</li> </ul> <p><b><u>Metodología</u></b> Historia clínica, palpación de pulsos periféricos e ITB.</p>
<p><i>Guías de Atención Médica</i> (94)</p>	<p>American Diabetes Association</p>	<p>2018</p>	<p><b><u>Indicación</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No especificadas.</li> </ul> <p><b><u>Metodología</u></b> Historia clínica y palpación de pulsos periféricos.</p>

No obstante, y pese a dichas limitaciones, se trata de un método de fácil implementación, no invasivo, reproducible, económico, con alto valor predictivo de estenosis arterial, y una buena relación coste-beneficio (100). La presencia de un ITB alterado se asocia a una mayor incidencia de complicaciones coronarias, cerebrovasculares y un mayor riesgo de mortalidad de origen cardiovascular (87-89; 101; 102), tanto en sujetos en prevención primaria como secundaria, e incluso tras ajustar por



los factores de riesgo cardiovascular clásicos. Por lo tanto, un ITB  $< 0,9$  es, además de una herramienta de despistaje para EAP, sinónimo de alto riesgo cardiovascular en pacientes con EAP asintomática.

Por otro lado, la extensión del uso del ITB ha permitido hacer una estimación de la prevalencia de EAP asintomática en DM. En un estudio publicado en el año 1999 (103) en una población con DM mayor de 40 años se comunica una prevalencia de EAP del 23%, mayor a la estimada previamente mediante otras técnicas de diagnóstico como síntomas compatibles o ausencia de pulsos periféricos. Este estudio contaba con un número escaso de pacientes con DM ( $n = 30$ ) sin historia previa de ECV o clínica de claudicación, de los que solo 4 padecían DM1. En otro estudio realizado en el ámbito de atención primaria, en pacientes con DM mayores de 50 años (edad media de 70 años) la prevalencia de EAP comunicada fue del 29% (104). En este estudio se incluyeron los datos de 6.400 pacientes, de los que 1.025 tenían DM sin especificar el subtipo.

En las actuales Guías de la Práctica Clínica de la ADA se recomienda de forma rutinaria la anamnesis dirigida para detectar la presencia de claudicación intermitente y la exploración sistemática de pulsos periféricos, complementando la evaluación de pacientes asintomáticos con la realización del ITB en función de la edad y factores de riesgo cardiovascular asociados (ver Tabla 2). No obstante, dichas recomendaciones están basadas en los estudios de prevalencia previamente comentados (82), lo que plantea dudas razonables acerca de la fiabilidad de su extrapolación a la población con DM1.

Otros estudios de prevalencia e incidencia de EVP en DM1 están basados en la presencia de amputación no traumática de miembros inferiores como criterio diagnóstico de EAP. Según estos trabajos, la tasa de amputación no traumática en DM1 es elevada, con una incidencia anual que oscila entre el 0,4% y 7,2% y una prevalencia de EAP aproximada del 2,4% (105). En la base de datos de pacientes con DM de Suecia, la

probabilidad acumulada de amputación de miembros inferiores a los 65 años de edad en sujetos con DM1, es del 11% para mujeres y el 21% para varones (78). Asimismo, la tasa de amputación de las extremidades inferiores entre los pacientes con DM1 es 86 veces superior a la de la población general. En la cohorte del EDIC, al inicio del estudio, la presencia de calcificación arterial en extremidades se registró en el 4,6% de la población, más comúnmente en los hombres y en individuos > 30 años de edad (106).

De nuevo, la principal limitación a la que nos enfrentamos en la interpretación de los estudios previamente comentados en población con DM1, es el diagnóstico de EAP basado en la amputación de extremidad inferior, que infraestima la enfermedad paucisintomática, e invalida estos hallazgos a la hora de establecer unas indicaciones de despistaje fiables.

### **3.5 FACTORES DE RIESGO PARA LA ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA. CALCIFICACIÓN ARTERIAL DE LA MEDIA COMO PROMOTOR EN LA ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA, Y SU RELACIÓN CON LA NEUROPATÍA CARDIACA AUTONÓMICA**

Entre los factores predictores de la EAP en pacientes con DM1 se incluyen la edad, el sexo masculino, la historia de lesiones o úlceras pedias, los valores de presión arterial diastólica, la presencia de hipertensión, las concentraciones de LDL-colesterol, la HbA<sub>1c</sub>, la duración de la DM, la tasa de excreción de albúmina, la tasa de filtrado glomerular, el tabaquismo y la presencia de retinopatía diabética (78; 105; 107; 108). En un meta-análisis de 5 estudios de pacientes con DM1, cada 1% de aumento en la HbA<sub>1c</sub>

aumentó en un 18% el riesgo de EAP (109). Sin embargo, el control glucémico agresivo con el objeto de reducir los niveles de HbA<sub>1c</sub> no pareció reducir las tasas de oclusión arterial periférica en el estudio DCCT/EDIC pese a disminuir la incidencia de calcificación arterial periférica (108).

Aunque tradicionalmente la EAP ha sido considerada como la presencia de enfermedad oclusiva arterial aterosclerótica en las extremidades inferiores, su fisiopatología no está completamente elucidada (110). La presencia de enfermedades sistémicas como la DM y la enfermedad renal crónica están asociadas con un proceso acelerado de calcificación vascular y un pronóstico desfavorable en el contexto de la EAP. Por ello, la visión tradicional de la EAP centrada en la aterosclerosis ha tornado hacia una orientación más novedosa en la que se define como un proceso de enfermedad sistémica complicada por la presencia de la calcificación arterial de la media (CAM) que actuaría como promotor de la propia EAP (110).

Aunque la calcificación localizada de la capa íntima es una característica típica de la aterosclerosis, la presencia de una CAM difusa y extensa, a menudo visible en una exploración radiológica simple, es una forma de presentación frecuente de la EAP en extremidades inferiores (111). En el estudio SEARCH (112), se concluyó, tras 5 años de seguimiento de jóvenes de 18 años edad con una media de 8 años de evolución de DM1, que un mal control metabólico y una alta prevalencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos como la disminución de la sensibilidad de insulina, el aumento del índice de masa corporal (IMC), la presencia de dislipemia o la hipertensión arterial estaban asociadas de manera independiente a un aumento de la rigidez arterial en estadios precoces de DM1.

La CAM provoca rigidez vascular y disminución de la distensibilidad de la pared de los vasos arteriales. Sin embargo, a pesar de un adecuado nivel de conocimiento acerca

de los efectos adversos de CAM en la rigidez a nivel aórtico, la presión arterial sistólica, y la perfusión coronaria, el efecto patológico de CAM en otros lechos vasculares como los periféricos es poco conocido. Es importante subrayar que la presencia de CAM, por sí misma, se asocia con aumento de la mortalidad cardiovascular. No obstante, la clave es si la CAM es un agente causal directo del evento cardiovascular, o si actúa en última instancia de forma indirecta acelerando el proceso de aterosclerosis o la ruptura de la placa. A día de hoy, se desconoce si la CAM precede o activa el desarrollo de la aterosclerosis en la EAP, conocimiento limitado por el solapamiento de factores de riesgo cardiovascular entre ambas entidades, la dificultad del diagnóstico por imagen y la longevidad de los pacientes.

En los pacientes con DM, la neuropatía es la complicación microangiopática más frecuente (81; 113; 114), y existe evidencia que demuestra que ésta aumenta el riesgo de EAP (114; 115). Múltiples factores de estrés celular presentes en la DM, tales como la inflamación sistémica subclínica, el estrés oxidativo, y la disregulación del sistema AGE/RAGE (productos finales de glicación avanzada / receptor para productos finales de glicación avanzada), podrían afectar simultáneamente al sistema nervioso y vascular (85; 111). La denervación simpática de las células de la musculatura lisa vascular está también implicada en la etiopatogenia de CAM (106; 110). Se ha objetivado una prevalencia de CAM mayor del 90% en las arterias pedias de pacientes con o sin DM sometidos a simpatectomía lumbar unilateral o bilateral (110; 111). La NCA es una complicación microangiopática muy prevalente en los pacientes con DM, y también se ha relacionado con un aumento de la morbilidad y mortalidad cardiovascular (116). El árbol vascular recibe inervación simpática que controla la resistencia periférica de los vasos sanguíneos. Estas fibras eferentes se encuentran a lo largo de toda la túnica media

y secretan neuroreguladores al fluido extracelular que rodea las células de la musculatura lisa vascular. No obstante, el cómo está orquestada esta relación bidireccional entre la musculatura vascular y el sistema nervioso autónomo, y las consecuencias de la pérdida de su regulación son factores poco conocidos. Evidencias previas, incluido el estudio *SEARCH Cardiovascular Disease* (117), sugieren que los pacientes jóvenes con DM1 pueden presentar signos precoces de disfunción autonómica. El sistema nervioso autónomo regula la frecuencia cardíaca y el tono vascular y, por lo tanto, su disfunción puede contribuir a la rigidez arterial en individuos con DM1. En la cohorte del *Pittsburgh Study* (118), tras 18 años de seguimiento en 144 adultos con DM1, se comunicó una asociación significativa entre parámetros de NCA y rigidez arterial medida por análisis de onda de pulso, no explicada por otros factores de riesgo cardiovascular clásicos.

La pared vascular arterial de un vaso sano está protegida de la calcificación a través de la producción y secreción activa de inhibidores de ésta por las células de la musculatura lisa vascular. Para que se desencadene el proceso de la calcificación vascular mediado por células de la musculatura lisa, es probable que varias circunstancias deban presentarse simultáneamente. En un microambiente desfavorable, donde podría coexistir la denervación simpática como cofactor etiopatogénico, las células de la musculatura lisa vascular pierden los mecanismos de defensa esenciales contra la calcificación como son la expresión de inhibidores de la misma, sometiéndose a un ciclo vicioso de muerte celular y transdiferenciación, que finalmente desencadena un fenotipo osteo/condrogénico que puede impulsar activamente la mineralización, típicamente caracterizada por el incremento de la expresión de marcadores relacionados con la transdiferenciación ósea, como la sialoproteína ósea, la fosfatasa alcalina, y el Runx2 (110).

El Runx2 se considera el principal regulador de esta diferenciación osteo/condrogénica, activando la expresión de genes relacionados con la osteosíntesis, y

suprimiendo la de marcadores de musculatura lisa vascular (110). Aunque la dinámica y los mecanismos implicados en este proceso siguen sin estar completamente esclarecidos, parece probable que el mantenimiento de la función contráctil normal de la célula de la musculatura lisa vascular sea un mecanismo de protección contra la calcificación vascular (119). Klotho, es una proteína transmembrana de 130 kDa, que se expresa especialmente en las células epiteliales del túbulo renal distal, conocida fundamentalmente por su función como cofactor de la fosfatonina o factor de crecimiento de fibroblastos-23 (FGF-23) (120). La escisión del dominio extracelular de Klotho genera una forma soluble de la proteína secretada (s-Klotho) que se puede medir a nivel sérico. Ratones transgénicos deficientes de Klotho desarrollan un síndrome similar a los pacientes con enfermedad renal crónica, con hiperfosfatemia y múltiples trastornos relacionados con el envejecimiento precoz, incluyendo la calcificación arterial difusa y extensa, asociado a una menor esperanza de vida (119). El déficit de Klotho potencia el desarrollo de una calcificación vascular acelerada dependiente de la vía del Runx2, revelando un papel bifuncional para esta proteína tanto a nivel vascular local como un inhibidor endógeno de la calcificación vascular, como cofactor requerido para la señalización vascular del FGF-23 (120). En DM1 se ha sugerido que los pacientes presentan unos niveles de s-Klotho inferiores que los sujetos sin DM (121), y que estos niveles se correlacionan de forma inversa con marcadores subclínicos precoces de arteriosclerosis y disfunción endotelial, por lo que s-Klotho podría tener un efecto protector a nivel cardiovascular en esta enfermedad.

### **3.6 DIMORFISMO SEXUAL Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS**

A pesar de que las diferencias en la prevalencia de EAP entre mujeres y hombres no han sido establecidas (82), existe una evidencia inapelable que indica una sustancial brecha de sexo en lo referente a la fisiopatología, estrategias preventivas, procedimientos diagnósticos, terapias médicas e intervencionistas, y la prevalencia desigual de eventos cardiovasculares en función del sexo (122).

La ECV en pacientes con DM no es una excepción, manifestando dimorfismo sexual en la forma de presentación, gravedad y mortalidad (123; 124). Si bien la ECV es más frecuente y acontece de forma más precoz en los hombres que en las mujeres de la población general, esta brecha de sexo es menor en los pacientes con DM, hasta el extremo de que el RR de eventos vasculares es mayor en mujeres con DM que en sus pares masculinos (123; 124). La evidencia actual sugiere que las mujeres con DM2 y DM1 presentan cardiopatía isquémica de forma más precoz y padecen una mayor mortalidad de causa cardiovascular que los varones (123; 125).

Las primeras publicaciones que hacen referencia a este dimorfismo sexual derivan de poblaciones con DM2 (123; 126). Los autores del *Rancho Bernardo Study* (128) reportaron que el exceso de riesgo de mortalidad cardiovascular atribuible a la DM era mayor en mujeres (3,5 veces superior respecto a no diabéticas) que en varones (2,4 veces superior respecto a no diabéticos), tras el ajuste de múltiples variables ( $P = 0,048$  para la modificación del efecto por sexo). El riesgo de sufrir un evento de cardiopatía isquémica fatal fue también tres veces superior en mujeres con DM2 respecto a aquellas sin DM (IC 95%: 1,9 – 4,8). Las mujeres con DM2 incluso presentaron un mayor HR de ECV mortal

(HR = 14,74; IC 95%: 6,16 – 35,27) que los varones con DM2 (HR = 3,77; IC 95%: 2,52 – 5,65) (123; 125).

La evidencia disponible en DM1, es congruente con los resultados obtenidos en cohortes de pacientes con DM2, y parece mantener la misma tendencia perjudicial para las mujeres. Un reciente meta-análisis, incluyendo más de 200.000 pacientes con DM1 estima que la ratio estandarizada de mortalidad para la relación por sexo (mujer/hombre) es de 1,37 (IC 95%: 1,21 – 1,56) para la mortalidad por todas las causas y de 1,86 (IC 95%: 1,62 – 2,15) para mortalidad de causa cardiovascular, concluyendo que las mujeres con DM1 presentan un de exceso de mortalidad por todas las causas del 40% y el doble de eventos cardiovasculares fatales en comparación con los hombres con DM1 (124). En lo referente a la ECV no mortal, el dimorfismo sexual en la enfermedad isquémica coronaria parece aún más marcado, presentando una relación mujer/hombre de 2,54 (IC 95%: 1,80 – 3,60) (124).

La insuficiencia cardíaca es otra entidad que presenta una mayor prevalencia en pacientes con DM que en la población general (123). El diagnóstico de DM incrementa en un 40% la probabilidad de presentar insuficiencia cardíaca en comparación con población sin DM, aumento del riesgo que se mantiene tras el ajuste por edad [OR: 2,8 (IC 95%: 2,2 – 3,6)] (123). El *Framingham Heart Study* también sugiere la presencia de dimorfismo sexual en el diagnóstico de insuficiencia cardíaca, ya que aunque el riesgo en varones diabéticos fue el doble que en no diabéticos varones ( $P < 0,05$ ), en mujeres diabéticas este riesgo fue 5 veces mayor ( $P < 0,01$ ) (127). Un meta-análisis incluyendo más de 12 millones de sujetos comunicó un riesgo dos veces y cinco veces superior de desarrollar insuficiencia cardíaca en mujeres con DM2 y DM1, respectivamente, respecto a mujeres sin DM. Los hombres con ambos tipos de DM también presentan un mayor riesgo de insuficiencia cardíaca que los hombres sin DM, aunque el riesgo fue menor que



sus homónimas femeninas (128). La causa subyacente de este aumento de riesgo en mujeres no se conoce con exactitud, aunque apoya la presencia del dimorfismo sexual de la ECV en pacientes con DM (123).

La evidencia disponible en relación con la enfermedad cerebrovascular y el sexo en pacientes con DM es controvertida, aunque parece también existir un exceso de riesgo en la mujer frente al varón tanto en DM2 como en DM1 (124; 129). A pesar de que la DM es un factor de riesgo bien establecido para el desarrollo de enfermedad cerebrovascular, la mayoría de los estudios no diferencian el subtipo de la diabetes (tipo 1 o 2) en el momento de categorizar el riesgo. En una reciente y extensa revisión sistemática y meta-análisis, incluyendo más de 12.000 eventos cerebrovasculares derivados de 64 cohortes, la presencia de DM2 fue un factor de riesgo más potente en el sexo femenino que en el masculino, con un RR de 2,28 (IC 95%: 1,93 — 2,69) para la mujer y de 1,83 (IC 95%: 1,60 — 2,08) para el hombre. En comparación con los hombres con DM2, las mujeres con DM2 presentaron un 27% más de riesgo de ictus tras el ajuste por otros factores de riesgo cardiovascular (RR = 1,27; IC 95%: 1,10 — 1,46) (129).

Los datos publicados sobre el exceso de riesgo en pacientes con DM1 son parecidos. Tanto DM1 como DM2 se han asociado a un riesgo sustancialmente aumentado de ictus en el *Nurses' Health Study* (130). Entre mujeres de edad media, aquellas con diagnóstico de DM1 presentaban un riesgo de ictus respecto a mujeres no diabéticas mayor (RR = 4,7; IC 95%: 3,3 — 6,6) que el de las mujeres con DM2 (RR = 1,8; IC 95%: 1,7 — 2,0). El riesgo observado en mujeres con DM1 mantuvo su significación tanto para el ictus isquémico como para el hemorrágico tras ajustar por múltiples variables.

En los pacientes con DM1, el exceso de riesgo está relacionado con el tiempo de evolución. Un meta-análisis, ya previamente mencionado (124), estima que la ratio estandarizada de incidencia de ictus en relación con el sexo (mujer/hombre) es de 1,37

(IC 95%: 1,21 – 1,56). Este dimorfismo sexual en la enfermedad cerebrovascular en pacientes con DM ya se ha incorporado a las guías de práctica clínica habitual. En el último consenso de Prevención del Ictus en la Mujer de la *American Heart Association*, se le otorga a la presencia de DM un riesgo mayor para el desarrollo de enfermedad cerebrovascular en la mujer que en el hombre (131).

Como es de esperar, la EAP, la ECV y la enfermedad cerebrovascular pueden coexistir en pacientes con DM, ya que la EAP es considerada como un equivalente de ECV y la aterosclerosis un proceso sistémico difuso. La evidencia disponible acerca del dimorfismo sexual en la EAP y la DM es muy escasa. Sin embargo, existen datos que sugieren que las mujeres con DM tienen más probabilidad de desarrollar claudicación intermitente que los hombres (132), a pesar de que la EAP en una gran proporción de pacientes con DM se presenta de manera asintomática o con síntomas atípicos debido a la coexistencia de neuropatía (82; 132).

En un estudio observacional de una cohorte japonesa compuesta por más de 700 individuos con EAP, las mujeres tenían más probabilidad de tener diagnóstico de DM y dislipemia, así como de presentar EAP en un estadio más avanzado, comparado con los varones (133). En línea con lo anterior, el tratamiento médico-quirúrgico en pacientes diabéticos con EAP tiene peor pronóstico en las mujeres que en los varones (123; 134). Las diabéticas con EAP responden peor a los ejercicios de rehabilitación, tienen una menor supervivencia tras revascularización, y una mayor morbimortalidad postquirúrgica que los hombres (134).

Pero, ¿qué factores contribuyen al dimorfismo sexual de los pacientes con DM? Los motivos subyacentes al dimorfismo sexual de la ECV en la DM no están elucidadas, pero es probable que sean de carácter multifactorial incluyendo divergencias fisiológicas

inherentes al sexo, el impacto de los esteroides sexuales, así como el tratamiento diferencial de los factores de riesgo cardiovascular entre mujeres y hombres (123). En la **Tabla 3** se resumen los factores posiblemente relacionados con el dimorfismo sexual de la ECV, así como un resumen los eventos vasculares en pacientes con DM.

**Tabla 3.** Diferencias en los factores de riesgo cardiovascular y eventos cardiovasculares según el sexo en pacientes con diabetes mellitus.

<b>FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR</b>	
<b>Diferencias observadas entre sexos</b>	
<b>Hormonas sexuales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Niveles altos de testosterona biodisponible predicen la incidencia de eventos coronarios en mujeres.</li> <li>- Niveles bajos de testosterona total predicen la incidencia de eventos coronarios en hombres.</li> </ul>
<b>Obesidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mayor prevalencia de obesidad en las mujeres en comparación a los hombres, especialmente en la menopausia.</li> </ul>
<b>Adiposidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Asociación más fuerte entre la adiposidad abdominal y la mortalidad cardiovascular en mujeres que en hombres con DM.</li> <li>- Mayor prevalencia de síndrome metabólico.</li> </ul>
<b>Dislipemia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Las mujeres tienen niveles más altos de HDL colesterol que los hombres.</li> </ul>
<b>Coagulación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diferencias estructurales de la fibrina. Las mujeres con DM presentan un perfil protrombótico mayor en estudios <i>in vitro</i>, con la formación de coágulos de fibrina más densos y una fibrinólisis prolongada.</li> </ul>
<b>Hipertensión arterial</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Las mujeres posmenopáusicas con DM tienen una prevalencia mayor de hipertensión (&gt; 60 años).</li> <li>- Los hombres con DM e hipertensión presentan un mayor riesgo de lesión renal.</li> </ul>
<b>Control de los factores de riesgo cardiovascular</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Las mujeres tienen un peor control de HbA<sub>1c</sub> y PA en comparación con los hombres.</li> <li>- Predictores de enfermedad coronaria en DM1 (<i>Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study</i>)               <ul style="list-style-type: none"> <li>-- Sólo mujeres: adiposidad abdominal, resistencia a la insulina, HbA<sub>1c</sub></li> <li>-- Hombres y mujeres: marcadores inflamatorios (fibrinógeno, recuento de glóbulos blancos), microalbuminuria.</li> </ul> </li> </ul>

---

## EVENTOS CARDIOVASCULARES

---

<b>Enfermedad coronaria</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Las mujeres duplican el riesgo de enfermedad coronaria en relación a los hombres con DM.</li><li>- IAM ocurre antes y tiene una mayor mortalidad en la mujer en comparación al hombre con DM</li><li>- La tasa de revascularización coronaria es menor en la mujer que en el hombre con DM.</li></ul>
<b>Insuficiencia cardiaca</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- La prevalencia de insuficiencia cardiaca es mayor en la mujer que el hombre con DM.</li></ul>
<b>Enfermedad cerebrovascular</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Los hombres con ictus tienen una mayor prevalencia de DM que las mujeres con ictus</li><li>- La DM es un factor de riesgo más potente para el accidente cerebrovascular en las mujeres que en los hombres</li></ul>
<b>Enfermedad arterial periférica</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- La DM es un factor de riesgo más importante para el desarrollo de claudicación intermitente en mujeres.</li><li>- Las mujeres con EAP y DM responden menos al entrenamiento con ejercicios en comparación con las mujeres sin DM, y los hombres con y sin DM.</li><li>- Disminución de la supervivencia a largo plazo tras revascularización y aumento de la mortalidad posquirúrgica en mujeres con DM.</li></ul>

---

*Abreviaturas: DM, diabetes mellitus; DMI, diabetes mellitus tipo 1; EAP, enfermedad arterial periférica; HbA<sub>1c</sub>, hemoglobina glicada; IAM, infarto agudo de miocardio; PA, presión arterial*

- **Obesidad:** La interacción entre el sexo y el exceso de peso podría explicar en parte el peor pronóstico de la ECV en mujeres con DM (135). Se observa una mayor prevalencia de obesidad en mujeres de la población general (10), comparado con hombres, especialmente a medida que aumenta la edad, y este efecto podría magnificar potencialmente las diferencias en pronóstico cardiovascular en las mujeres con DM. La *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) en el período de 10 años transcurrido entre 2003 a 2004 y 2011 a 2012 reveló que la prevalencia general de

obesidad en adultos en población norteamericana, se mantuvo estable en torno al 35% (11). Sin embargo, en mujeres  $\geq 60$  años de edad, esta prevalencia aumentó de un 32% a un 38% (11), sugiriendo que, en la menopausia, el riesgo de ECV en las mujeres con DM podría incluir el impacto deletéreo de la obesidad. Hay evidencia que sugiere que la obesidad abdominal y la resistencia a la acción de la insulina son fuertes predictores de ECV en mujeres con prediabetes y en mujeres con DM1 (136). Si bien es cierto que la obesidad no participa por sí misma en la patogenia de la DM1, en la actualidad la coexistencia de DM1 y obesidad es una situación que se observa con relativa frecuencia (68). El estudio *SEARCH* en jóvenes con DM1, utilizando mediciones antropométricas bajo un protocolo estandarizado, observó una prevalencia de sobrepeso del 22% en esta población, en contraste con una prevalencia del 16 % en los sujetos de similar edad sin DM1 del NHANES (11). En consonancia, estudios en adultos como la cohorte de *Pittsburgh* reportan una alta prevalencia de obesidad, con un aumento de la incidencia a lo largo del seguimiento (comprendido entre los años 2004 - 2007), alcanzando una prevalencia del 23% al finalizar el estudio (137). La evidencia emergente sugiere que la presencia de obesidad y síndrome metabólico en la DM1 contribuye a la aparición de resistencia a la insulina, dislipemia y complicaciones cardiovasculares en individuos con DM1, pudiendo ser un factor contribuyente al dimorfismo sexual (68).

- **Hipertensión arterial:** Las mujeres normotensas suelen tener valores más bajos de PA que los hombres normotensos. Sin embargo, con la menopausia, las mujeres presentan una mayor prevalencia de hipertensión arterial y peor control tensional que los hombres de edad similar (138). La causa subyacente no está del todo esclarecida, pero la presencia de disfunción autonómica con predominio del tono simpático podría estar involucrada en la patogenia de la hipertensión en mujeres posmenopáusicas (138; 139). El diagnóstico

de hipertensión arterial es más frecuente en ambos subtipos de diabetes, DM1 y DM2 (140), existiendo un dimorfismo sexual que podría estar en relación con la edad. Diversos estudios realizados en cohortes de países como Australia, China, España o Suecia demuestran una fuerte asociación entre DM2 e hipertensión arterial, especialmente en mujeres posmenopáusicas (140-142). Otro de los factores que pueden influir en la elevada prevalencia hipertensión arterial en pacientes con DM es la enfermedad renal crónica. La evidencia actual apoya que los hombres (especialmente aquellos con hipertensión arterial y DM) tienen mayor riesgo de sufrir daño renal, y la patogenia podría estar en relación con los andrógenos (143). En contraste, se postula que las mujeres presentan lesión renal menos frecuentemente, tal vez por un efecto protector de los estrógenos (143; 144).

A pesar de existir recomendaciones farmacológicas específicas para el tratamiento antihipertensivo según el origen étnico/racial (145), los consensos de práctica clínica habitual no distinguen entre mujeres y varones, a pesar de que la evidencia derivada de estudios clínicos ilustra que los mecanismos responsables de la hipertensión arterial difieren en función del sexo (146). Por otra parte, otros trabajos sugieren que el estrés oxidativo (principal mecanismo en el mantenimiento de la hipertensión en el hombre), puede presentar un papel menos predominante en la mujer, salvo en situaciones de inflamación sistémica o con un componente inmune asociado, tal como la preeclampsia o lupus eritematoso (146; 147).

- **HDL-colesterol:** En términos generales las mujeres presentan unas concentraciones superiores de HDL-colesterol en comparación con los varones (148). Sin embargo, en mujeres con resistencia a la insulina, los niveles de HDL-C pueden disminuir (149). Al mismo tiempo, evidencia preliminar sugiere que en mujeres posmenopáusicas, las

partículas de HDL-C son menos eficaces como agente antiinflamatorio y antioxidante (150).

- **Coagulación:** Estudios *in vitro* han descrito diferencias estructurales en la fibrina, según el sexo, en pacientes con DM (151). Las mujeres con DM presentan un perfil más protrombótico con formación de coágulos de fibrina más densos y una fibrinólisis enlentecida (151).
- **Factores sociales y culturales:** Sin duda, factores socio-económicos y culturales también contribuyen al dimorfismo sexual de la ECV en la DM (152). El estatus socioeconómico, evaluado por medio del nivel educativo, ocupación e ingresos, se asocia de manera inversa con la prevalencia de obesidad y DM2 en los países desarrollados (153). Los gradientes más pronunciados entre las mujeres se pueden observar en una encuesta poblacional de salud realizada a nivel nacional en Canadá (154). Este estudio encontró una asociación entre el bajo nivel educativo y de ingresos brutos, con la prevalencia de DM en las mujeres después de ajustar por la presencia de obesidad y la actividad física. De forma semejante, un estudio poblacional europeo (155) encontró que la asociación entre los indicadores de nivel socioeconómico con obesidad abdominal y actividad física fue más potente en mujeres,. Por otro lado, también el bajo nivel socioeconómico, evaluado por ocupación, se relaciona con el riesgo de intolerancia a los hidratos de carbono en los hombres, independientemente de otros factores de confusión. Tras el reporte de un meta-análisis de estudios de casos y controles, y estudios de cohortes, se podría concluir que un nivel socioeconómico bajo es un factor de riesgo importante para el desarrollo de DM2 en ambos sexos en todo el mundo (156).

- **Control metabólico de la diabetes y manejo de los factores de riesgo cardiovascular:** Unos de los mecanismos postulados para explicar el incremento paradójico de la ECV en la mujer con DM, es un peor manejo de los factores de riesgo (123). Estudios previos sugieren disparidad según sexos en la intensidad, frecuencia y grado de control de los diferentes factores de riesgo cardiovasculares, objetivándose un peor control de la PA, y un peor control metabólico en términos de HbA<sub>1c</sub> en mujeres con DM. Especialmente en pacientes con DM1, una de las posibles causas del exceso de mortalidad cardiovascular podría deberse a la mayor exposición a la hiperglucemia crónica consecuencia del peor control metabólico a lo largo de su vida, en comparación con los hombres con DM1 (135). En consonancia, en cohortes de pacientes con DM1 se han reportado notables diferencias en cuanto al control metabólico según el sexo (160-162). Las mujeres jóvenes y adultas con DM1 tienen más riesgo de presentar un peor control glucémico que los hombres jóvenes y adultos con DM1, a pesar de que el uso de bombas de perfusión continua subcutánea de insulina con el fin de mejorar el control metabólico está más extendido entre las pacientes (157-159). Este control glucémico insuficiente, podría ser atribuido a un deterioro en la sensibilidad a la insulina durante la pubertad de mujeres jóvenes, las ampliamente conocidas alteraciones del eje hipofiso-gonadal, o el aumento de la prevalencia de hiperandrogenismo durante la edad fértil de mujeres con DM1 (160; 161).

Por otro lado, también se ha descrito una menor frecuencia de prescripción de tratamiento farmacológico con estatinas o antiagregantes plaquetarios en la mujer, tanto en prevención primaria como en prevención secundaria (162). Las mujeres con DM tienen una probabilidad menor de recibir un tratamiento apropiado tanto de forma ambulatoria como tras un síndrome coronario agudo (123; 163). De la misma manera, la



implementación de revascularización coronaria mediante angioplastia o *bypass* arterial en diabéticos es menor en mujeres que en varones (164).

- **Neuropatía cardíaca autonómica:** La NCA en pacientes con DM1 conlleva anomalías en la respuesta de la vascularización coronaria ante el estímulo simpático, que puede manifestarse clínicamente como taquicardia en reposo, intolerancia al ejercicio, hipotensión ortostática, pérdida de la disminución fisiológica de la PA nocturna o “patrón *dipper*”, o isquemia miocárdica silente (116; 165). La forma de presentación oligosintomática podría acarrear un diagnóstico tardío de la ECV, en un estadio más evolucionado, y por lo tanto una mayor morbimortalidad en los pacientes con DM1. Un indicador precoz de la NCA es la reducción de la variabilidad de la frecuencia cardíaca, que puede evaluarse en reposo o tras la realización de las maniobras propuestas por *Ewing* y *Clark* (116; 165), las cuales involucran al X par craneal en su aferencia o eferencia.

Los factores de riesgo cardiovasculares clásicos como la elevación de PA, LDL-colesterol o triglicéridos y la obesidad central predicen la aparición de la NCA (116; 165). La estimación de la prevalencia global de la NCA en pacientes con DM1 varía ampliamente, en parte debido a las diferencias de la definición de la misma, así como la metodología diagnóstica utilizada. No obstante, independientemente de la prevalencia global, y a pesar de que existen resultados dispares, varios estudios han reportado una mayor frecuencia de NCA en mujeres con DM1 que en varones (117; 166; 167). De acuerdo con este concepto, estudios llevados a cabo en población adulta sana muestran un dimorfismo sexual en la regulación autonómica, objetivando un predominio del tono vagal en mujeres en edad fértil en comparación con los hombres de similar rango etario (168; 169). Aunque no se puede descartar un efecto cromosómico y de los genes sexuales

sobre la regulación autonómica cardiovascular, estos hallazgos podrían involucrar una influencia directa de los esteroides sexuales.

- **Efecto de los esteroides sexuales:** El impacto de los esteroides sexuales sobre el perfil de riesgo cardiovascular de ambos sexos continúa siendo incierto. La modulación del sistema autónomo por los esteroides sexuales, especialmente por los estrógenos, ha sido postulada como la razón detrás de ese incremento del tono parasimpático en mujeres en edad fértil (170). Tanto los andrógenos como los estrógenos podrían jugar un papel de crucial importancia en el desarrollo de ECV en ambos sexos (153). Aún más, resulta de extremo interés que los esteroides sexuales puedan tener efectos opuestos en hombres y mujeres (160), ya que niveles reducidos de andrógenos en hombres de todas las edades se han asociado con un mayor riesgo cardiovascular (171), mientras que el exceso de andrógenos en las mujeres se asociado a diversos factores de riesgo cardiovascular (160; 172). Los resultados contradictorios de los estudios con estrógenos o testosterona exógenos comparados con esteroides sexuales endógenos, sugieren la posibilidad de que los estudios experimentales no reflejen los mecanismos que acontecen fisiológicamente (123).

## **INTERÉS DEL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

El interés del presente trabajo radica en conocer:

1. El perfil de ateromatosis subclínica, especialmente de la EAP, en una cohorte consecutiva de pacientes asintomáticos con DM1 en una consulta especializada de nuestro entorno y los factores de riesgo a los que se asocia esta entidad.
2. Establecer en qué sujetos se debería realizar el cribado de la EAP y la NCA, entidades estrechamente ligadas tanto entre sí como a un incremento del riesgo cardiovascular, dado que no existen recomendaciones específicas o bien las existentes no parecen estar basadas en estudios de prevalencia específica para la población asintomática con DM1.
3. Valorar parámetros clínicos o bioquímicos de estratificación de riesgo cardiovascular en pacientes con DM1 y con EAP asintomática, con el objetivo de identificar subgrupos que se podrían beneficiar de la intensificación de la intervención sobre factores de riesgos cardiovascular modificables.

## **5. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

- La indicación del despistaje de la EAP en las Guías de Práctica Clínica no está basada en estudios de prevalencia especialmente diseñados en la población con DM1 asintomática para EAP. El estudio de la prevalencia específica de EAP asintomática en este subgrupo de pacientes puede modificar la indicación del despistaje actualmente recomendado en pacientes con DM1.
- La presencia de CAM en las arterias periféricas de pacientes asintomáticos con DM1 se asocia con una disminución de las concentraciones circulantes de s-Klotho, y ambos factores están relacionados con otros factores de riesgo cardiovascular y disfunción autonómica cardiovascular.
- La disfunción cardíaca autonómica, en particular la disautonomía parasimpática subclínica, se asocia con un aumento de la rigidez arterial periférica definida por un ITB elevado, independientemente de otros factores de riesgo cardiovascular clásicos.
- La prevalencia de disfunción cardíaca autonómica en pacientes con DM1 presenta dimorfismo sexual, predominando en el sexo femenino; y esa diferencia puede estar relacionada especialmente con la menopausia, en donde los esteroides sexuales tendrían un papel etiopatogénico fundamental.

## **6. OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

### **6.1. Primario**

- Determinar la prevalencia de la EAP asintomática en una cohorte consecutiva de pacientes con DM tipo 1  $\geq$  18 años.

### **6.2. Secundarios**

- Determinar la prevalencia de enfermedad carotídea aterosclerótica subclínica asintomática en una cohorte consecutiva de pacientes con DM1  $\geq$  18 años.
- Determinar qué factores de riesgo se asocian a un mayor riesgo de EAP o enfermedad carotídea aterosclerótica asintomática, entre antecedentes personales y/o familiares, datos de la exploración física, control y evolución de DM1 y marcadores bioquímicos.
- Evaluar la validez de las Guías de Práctica Clínica actualmente vigentes con respecto a la indicación de despistaje de EAP en una población específica con DM1.
- Analizar si la realización del despistaje de EAP universal mediante ITB en población con DM1 menor de 50 años sin factores de riesgo cardiovascular asociados modifica el manejo terapéutico en este subgrupo de pacientes.

- Determinar qué factores de riesgo que se asocian a un mayor riesgo de CAM periférica asintomática.
- Determinar los niveles circulantes de s-Kloto como marcador de CAM, en una cohorte de pacientes con DM1 y diagnóstico de CAM, en ausencia de EAP, comparándola con una cohorte pareada de pacientes con DM1 sin diagnóstico de CAM.
- Evaluar la prevalencia de la disfunción cardiovascular autonómica, y su asociación con la presencia de CAM, independientemente de la existencia de EAP asintomática en una serie consecutiva de pacientes con DM1.
- Explorar la presentación clínica de la NCA en función del sexo y la edad, y valorar la relación entre los esteroides sexuales y NCA, así como su correlación con los índices de evaluación de la disfunción cardíaca autonómica en una serie consecutiva de pacientes adultos con DM1.

## 7. METODOLOGÍA:

### 7.1. DISEÑO

Estudio observacional de corte transversal (*ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02910271*).

### 7.2. POBLACIÓN A ESTUDIO

Pacientes con DM1  $\geq$  18 años de edad atendidos consecutivamente en la Consulta Monográfica de DM1 y Consulta Monográfica de Bombas de Insulina del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

#### 7.2.1. Criterios de Inclusión

- DM1 diagnosticada a los 30 o menos años de edad.

Criterios diagnósticos de DM1 (6):

a) Síntomas de cardinales de DM (poliuria, polidipsia, pérdida de peso injustificada) con cifras de glucemia plasmática  $\geq$  200 mg/dl, o debut como cetoacidosis diabética.

b) Glucemia plasmática en ayunas ( $\geq$  8 h)  $\geq$  126 mg/dl.

c) Glucemia plasmática a las 2 h en la prueba de sobrecarga oral de glucosa (con 75 g de glucosa)  $\geq$  200 mg/dl.

d) HbA<sub>1c</sub>  $\geq$  6,5 % [según método certificado por el *National Glicohemoglobin Standardized Program* (NGSP) y estandarizado según el ensayo DCCT].

Los criterios b, c y d precisarían confirmación en días diferentes, salvo en casos de hiperglucemia con descompensación aguda (criterio a).

e) Constatación de una determinación positiva de títulos de autoanticuerpos séricos marcadores de destrucción inmune contra ICA, AAI, y/o GADA al momento del diagnóstico o durante el curso de la enfermedad.

- Aceptación de participación en el estudio y firma del consentimiento informado (ver **ANEXO II**: Consentimiento informado de los pacientes).

### **7.2.2. Criterios de exclusión**

- Diagnóstico previo de EAP, pie diabético, amputación de miembro inferior o clínica compatible con EAP según el cuestionario de Edimburgo para claudicación intermitente (ver **ANEXO III**).

- Diagnóstico previo de enfermedad cerebrovascular o de enfermedad carotídea aterosclerótica asintomática, así como cirugía de revascularización carotídea (angioplastia o endarterectomía carotídea).

- Diagnóstico de otros tipos de diabetes diferentes a la DM1 como DM2, diabetes gestacional, LADA o MODY.

- Gestación en curso, institucionalización, enfermedad grave o terminal o terapia renal sustitutiva.

- Rechazo para participar en el estudio o para firmar el consentimiento informado.

### **7.3.1 PROCEDIMIENTOS**

Tras constatar en los sujetos seleccionados el cumplimiento de todos los criterios de inclusión, la ausencia de criterios de exclusión, y tras la firma del consentimiento informado, se procedió a la realización de los siguientes procedimientos:



a) **Anamnesis:** Recogida de variables relacionadas con su DM1 (años de evolución, tratamiento, control metabólico), factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, dislipidemia, antecedentes previos de exposición al tabaco), complicaciones crónicas microvasculares, enfermedad cardiovascular (enfermedad coronaria o cirugía de revascularización previa), y antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular precoz.

b) **Exploración física y recogida de variables antropométricas según práctica clínica habitual:** peso (kg), talla (m), índice de masa corporal [IMC, (kg/m<sup>2</sup>)] perímetro abdominal (cm) y de cadera (cm), porcentaje de grasa corporal respecto al peso corporal total (TBF-300A Body Composition Analyzer, Tanita Corporation, Tokyo, Japan).

c) **Medición de la PA en consulta** según recomendaciones en práctica clínica habitual de la Sociedad Europea de Hipertensión/Sociedad Europea de Cardiología (173).

d) **Aplicación del cuestionario de Edimburgo** para la detección de síntomas de claudicación intermitente (174) (ver **ANEXO III**).

e) **Exploración del pie según práctica clínica habitual** siguiendo el protocolo Unidad de Pie Diabético Hospital Universitario Ramón y Cajal incluyendo exploración vascular de pulsos periféricos, cuestionario *Neuropathy Symptoms Score*, exploración con monofilamento, diapasón calibrado y valoración de reflejo aquileo de forma bilateral (ver **ANEXO IV**: Hoja de recogida de datos de la valoración clínica del pie diabético).

**f) Evaluación analítica y hormonal según práctica clínica habitual en revisión anual de pacientes con DM1:** Se obtuvieron las muestras de sangre venosa después de al menos 8 horas de ayuno nocturno y un período mínimo de 24 horas de abstinencia de alcohol y ejercicio físico vigoroso.

- Bioquímica estándar, perfil fosfocálcico, hemograma, hemostasia, perfil lipídico y HbA<sub>1c</sub>.
- Perfil tiroideo.
- Cociente albúmina/creatinina en muestra de orina puntual.

**g) Determinaciones analíticas fuera de práctica clínica habitual motivadas por la participación en el estudio:**

- Proteína C reactiva ultrasensible.
- Homocisteína.
- Determinación de niveles de parathormona, 25 (OH) vitamina D, y 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D.
- Suero y plasma de archivo: se almacenaron alícuotas de suero y plasma a -80°C en el laboratorio del Grupo de Investigación en Obesidad, Diabetes y Reproducción Humana del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS) y del Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM).
- ***Determinación de s-Klotho.*** Para las mediciones de s-klotho, las muestras de sangre se dejaron coagular durante 1 hora, para posteriormente ser centrifugadas a 1500 x g durante 10 minutos, y fueron almacenadas a - 80 ° C hasta su determinación por duplicado, empleando los kits de enzimas comerciales ligadas de ensayo inmunoabsorbente (ELISA)

del mismo fabricante y lote de ensayo (*código de catálogo: CSB-E13235 h, Cusabio Biotech Co., Ltd., Hubei, China*). El límite inferior de detección fue de 0,039 ng/ml y los coeficientes de variación (CV) intra e interensayo fueron  $< 8\%$  y  $< 10\%$ , respectivamente. Se determinó la concentración media de s-Klotho para toda la población del estudio, y los pacientes fueron posteriormente clasificados de acuerdo con este valor, en dos subgrupos: “subgrupo de pacientes con s-Klotho alto” y “subgrupo de pacientes con s-Klotho bajo”.

**-Determinación de esteroides sexuales.** Se determinaron las concentraciones de testosterona total, globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), LH, FSH y estradiol en muestras de suero de archivo. Los niveles séricos de testosterona total se analizaron por duplicado utilizando un radioinmunoanálisis (RIA) directo (*Spectria® Testosterone RIA, Orion Diagnostica Oy, Espoo, Finlandia*) con una sensibilidad analítica y funcional de 0,1 y 0,3 nmol / L, respectivamente. El CV intraensayo fue  $< 9\%$  para concentraciones  $\geq 1,3$  nmol / L, y los CV interensayos fueron 11,6% a 3,3 nmol/l y  $< 10\%$  para concentraciones  $\geq 4,9$  nmol/l. La reactividad cruzada fue inferior al 2,7% para todos los esteroides endógenos. El *Spectria® Testosterone RIA, distribuido por Cisbio Bioassays, Codolet, Francia* desde 2014, con el nombre comercial TESTO-CT2, ha sido validado frente a LC-MS / MS incluso para concentraciones muy bajas como las de las mujeres o los niños (175). Los niveles séricos de estradiol se midieron en una única determinación, utilizando un método de inmunoquimioluminiscencia automatizado (*Architect® Estradiol, División de diagnóstico Abbot Ireland, Lisnamuck, Longford, Co. Longford, Irlanda*) con límites de detección analíticos y funcionales de 37 y 92 pmol/l, respectivamente. El CV intraensayo fue  $< 5\%$  para concentraciones  $< 734$  pmol/l. La reactividad cruzada fue despreciable para todos los esteroides endógenos. La SHBG también se midió en un solo ensayo con una técnica de inmunoquimioluminiscencia automatizada (*IMMULITE 2000, Siemens Healthcare Sector, Erlangen, Alemania*) con

un límite inferior de detección de 0,02 nmol/l. La media de los CV intraensayos e interensayos fue < 10% para este ensayo. Calculamos las concentraciones libres de testosterona y estradiol a partir de sus concentraciones totales y de las concentraciones de SHBG (176). La LH y la FSH se midieron en una sola determinación utilizando un método automatizado de inmunoquimioluminiscencia (*Architect® FSH, Architect® LH, División de diagnóstico de Abbot Ireland, Lisnamuck, Longford, Co. Longford, Irlanda*) con límites de detección más bajos de 0,1 UI/l. La media de los CV intraensayo e interensayo fue < 10% para ambos ensayos.

Los esteroides sexuales se analizaron utilizando kits del mismo lote de producción. El laboratorio local desconocía el sexo y las características de los pacientes. El límite superior de normalidad interno en las mujeres fue de 2,3 nmol/l para la testosterona total y 35 pmol/l para la testosterona libre (177). El límite inferior de normalidad para la testosterona libre en hombres fue de 225 pmol/l (178).

**h) Monitorización ambulatoria de la PA durante 24 horas (MAPA)**, solo se realizó a aquellos pacientes con indicación según práctica clínica habitual (173):

- Pacientes con hipertensión arterial en consulta con el objetivo de descartar hipertensión de bata blanca.

- En pacientes con disfunción autonómica.

En el **ANEXO V** se recogen las normas para los pacientes que se realizaron una MAPA.

### 7.3.2 VALORACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA

- **TÉCNICA DE DESPISTAJE:** ÍNDICE TOBILLO-BRAZO (ITB).

Se determinó el ITB mediante ecografía *doppler* (*Minidop ES 8 Mhz HADECO®*, Miyamae-ku Kawasaki, Japan) a todos los pacientes incluidos en el estudio, en el contexto de práctica clínica habitual en aquellos pacientes con indicación clínica (82), o como procedimiento extraordinario por su participación en el estudio en aquellos pacientes que no cumplían criterios de despistaje clínico según recomendaciones vigentes. El ITB se midió siguiendo las recomendaciones actuales (179). Tras 5 min. de reposo en decúbito supino y con las extremidades descubiertas, se colocó el manguito inflable en la zona braquial de ambas extremidades superiores, 2 cm por encima de la flexura del codo y en ambas extremidades inferiores por debajo de la rodilla, 2 cm por encima de los maléolos. Se registró la PA sistólica de cada extremidad, y en las extremidades inferiores se recogieron las procedentes de las arterias tibial posterior y pedia. Se calculó el ITB para cada pierna como el cociente entre la PA sistólica obtenida en el tobillo (de ambas arterias la arteria tibial posterior y la arteria pedia) y la mayor de ambos brazos (180). *Interpretación del ITB:* Normal: 0,91 — 1,20; obstrucción arterial leve: 0,70 — 0,90; obstrucción arterial moderada: 0,40 — 0,69; obstrucción arterial grave: < 0,40; arterias pobremente compresibles > 1,20. Es importante resaltar, que los límites utilizados para la interpretación de un ITB patológico/normal en el presente estudio, difieren de los recomendados por los consensos relacionados con el diagnóstico de la EAP, sin embargo, fueron seleccionados estratégicamente en el diseño de nuestro estudio para aumentar la sensibilidad diagnóstica de nuestra prueba de despistaje, intentando disminuir al máximo la tasa de falsos negativos.

- **TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN:** ÍNDICE DEDO-BRAZO, MORFOLOGÍA ARTERIAL DE LA ONDA DE PULSO, Y CARTOGRAFÍA ARTERIAL ECOGRÁFICA.

Los pacientes con resultado alterados en el ITB ( $\leq 0,90$  o  $> 1,20$ ) fueron derivados al Servicio de Cirugía Vascular de nuestro Hospital con el fin de confirmar o descartar la presencia de EAP según las recomendaciones actuales de diagnóstico de EAP asintomática en los pacientes con DM, mediante el uso de la cartografía arterial ecográfica, la morfología de la onda de pulso arterial, y la medición del índice dedo-brazo (90; 99; 101; 103, 186-187).

La valoración ecográfica arterial (*Toshiba Nemio Model SSA-550<sup>a</sup> con sonda de 7.5-MHz, Toshiba Medical Systems S.A., Alcobendas, Madrid, Spain*) fue exhaustiva en los territorios de las arterias femoral, poplítea, tibial posterior, peronea, y pedia, focalizándose en la búsqueda de la reducción del diámetro arterial según los criterios diagnósticos de la Sociedad Americana de Ecocardiografía y de la Sociedad Americana de Cirugía Vascular (181), y examinando simultáneamente la morfología ecográfica de la onda de pulso arterial de los territorios vasculares previamente mencionados. La onda de pulso arterial fue categorizada como normal (onda de pulso trifásica) o anormal (onda de pulso bifásica, monofásica o ausente) (181). El índice dedo-brazo fue determinado mediante plestimografía (*Falcon Pro, Viasonix S.A. Ra'anana, Israel*) (182). De acuerdo con las recomendaciones vigentes para el diagnóstico en pacientes con DM (97; 181-183), la EAP se definió como un índice dedo-brazo  $< 0,7$  y/o la pérdida de patrón de onda de pulso trifásico y/o la presencia de criterios ecográficos diagnósticos de EAP o la visualización de placas ateromatosas.

▪ ECOGRAFÍA DEL TERRITORIO ARTERIAL CAROTÍDEO Y EXTRACRANEAL.

Todos los participantes con un ITB patológico ( $\leq 0.9$  o  $> 1.2$ ) fueron explorados para descartar la presencia de ateromatosis a nivel de las arterias carotídeas y vertebrales del territorio extracraneal, utilizando la misma sonda y equipo ecográfico mencionado previamente. El grosor de la íntima media carotídea fue también medido bilateralmente en la arteria carótida común. La media de ambas determinaciones fue calculada para cada paciente. Se exploró de forma exhaustiva la presencia de placas ateromatosas en los territorios de ambas carótidas internas, carótidas externas, carótidas comunes y arterias vertebrales (181). La presencia de un grosor de la íntima media carotídea  $\geq 1,5$  mm protruyendo dentro del lumen arterial fue considerado como placa ateromatosa (184). La ateromatosis carotídea se definió como la presencia de al menos una placa en alguno de los territorios arteriales explorados. La estenosis arterial fue clasificada como ausente, leve ( $< 50\%$ ), moderada (50-70%), grave ( $> 70\%$ ), y/o subtotal /total (181).

Los pacientes permanecieron en reposo durante al menos 10 minutos antes de la exploración ecográfica cervical y la toma de medidas. La exploración vascular se realizó bajo condiciones estandarizadas (habitación tranquila, temperatura confortable) y tras el ayuno nocturno con la intención de eliminar la posible interferencia de la hiperglucemia postprandial (181; 184).

### 7.3.3 EVALUACIÓN Y DEFINICIÓN DE LA NEUROPATÍA CARDIACA AUTONÓMICA

La función cardiaca autonómica (función parasimpática) fue evaluada mediante el uso de la batería pruebas propuesta por *Ewing y Clarke (185)* y actualmente recomendadas por la ADA (186). Utilizamos una modificación de la escala de *Ewing (185)* para diagnosticar la presencia de NCA, puntuando la variabilidad de la frecuencia cardiaca en respuesta a la respiración profunda, la prueba postural, y la maniobra de *Valsalva*, así como la respuesta de la PA a la bipedestación en una respuesta normal (0 puntos), respuesta límite (0,5 puntos) o respuesta patológica (1 punto). Una puntuación  $\geq 1$  definió el diagnóstico de NCA. Con efecto descriptivo, la NCA fue clasificada según la gravedad en leve cuando la puntuación de *Ewing* fue entre 1 y 2, y como definitiva cuando la puntuación fue  $\geq 2$  (185). Ante la presencia de hipotensión ortostática asociada a dos o más pruebas de variabilidad de la frecuencia cardiaca patológicas, la NCA fue considerada como grave (185). Las pruebas de variabilidad de la frecuencia cardiaca se determinaron entre las 7:00 y 9:00 AM en todos los participantes después reposo en posición supina durante 10 minutos, en una habitación mantenida a temperatura estable; utilizando el sistema Monitor OneDx® (*Qmed, Inc., Eatontown, NJ*). A modo de resumen, la respuesta de la frecuencia cardiaca durante la respiración (prueba de respiración profunda) se estimó mediante la relación de las frecuencias cardiacas máximas y mínimas durante seis ciclos de respiración profunda [ratio de inspiración/expiración profunda (Ratio E / I)]. La respuesta de la frecuencia cardiaca a la maniobra de *Valsalva* se evaluó mediante el cálculo de la relación del intervalo R-R más largo después de la maniobra, con el intervalo más corto durante o poco después de la maniobra. La respuesta de frecuencia cardiaca a la bipedestación o prueba de ortostatismo



se calculó como la relación del intervalo R-R más largo (que se encuentra aproximadamente en el latido 30) con el intervalo más corto (que se encuentra en aproximadamente el latido 15) después de ponerse de pie (ratio 30:15). La inervación adrenérgica fue evaluada mediante el cambio en la PA y frecuencia cardiaca después de 5 minutos tras la bipedestación con respecto a los valores registrados durante el reposo en decúbito supino.

Los valores de PA sistólica y diastólica en reposo se midieron tres veces con un esfigmomanómetro aneroide y un estetoscopio mientras los sujetos estaban sentados durante al menos 5 minutos antes de tomar una lectura (187). La PA sistólica y diastólica en la consulta se calculó mediante el promedio de tres mediciones realizadas en reposo a cada paciente. La hipotensión ortostática se definió como un descenso de  $> 20$  mm Hg en la PA sistólica o  $> 10$  mm Hg en la PA diastólica en respuesta a la bipedestación (114). La frecuencia cardiaca en reposo se midió palpando el pulso radial y contando el número de latidos durante 60 segundos. La taquicardia en reposo se definió por una frecuencia cardíaca de  $> 100$  latidos por minuto.

Las pruebas de función autonómica se realizaron después del ayuno nocturno para evitar el posible efecto de la interferencia por la hiperglucemia postprandial (188). La toma de medicamentos del día de la exploración, incluida la insulina de acción corta, fue suspendida de forma puntual hasta la finalización de la misma. Al mismo tiempo, se advirtió a los pacientes de que se abstuvieran de realizar ciertas actividades de la vida cotidiana como la realización de ejercicio, fumar o ingerir cafeína inmediatamente antes de la evaluación.

En el **ANEXO VI** de detalla el protocolo de monitorización de la función cardiovascular, el orden de realización de la exploración y los valores de normalidad.

## **8. RETIRADA DE SUJETOS DEL ESTUDIO**

Los pacientes que tras su incorporación al estudio y posteriormente a la firma del consentimiento informado no hubiesen completado el mismo, tal y como estaba previsto en el protocolo, se clasificarían como “pérdidas de seguimiento”, siendo su causa expuesta y registrada claramente.

Los pacientes fueron libres de retirar su consentimiento para participar en el estudio por cualquier razón y en cualquier momento, sin necesidad alguna de justificación y sin que ello le suponga ninguna penalización o perjuicio. El investigador también fue libre de poner fin a la participación de un sujeto en el estudio en cualquier momento si así lo hubiese considerado conveniente.

La participación de un paciente en este estudio clínico contempló además interrumpirse por cualquiera de los siguientes motivos:

1) Aparición de cualquier situación o circunstancia médica que exponga al paciente a un riesgo sustancial, que le impida cumplir los requisitos del protocolo, o que indiquen al investigador la no conveniencia de participar en el estudio.

2) Violación del protocolo o de los procedimientos relacionados con el estudio (a criterio del investigador).

3) Terminación del estudio por las autoridades reguladoras.

No obstante, durante la ejecución y hasta la finalización de la fase experimental, no se registró ninguna pérdida de seguimiento de los individuos reclutados.

## **9. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS**

El cumplimiento de criterios de inclusión, ausencia de criterios de exclusión, la entrega de la hoja de información, y los datos de la anamnesis, exploración física y antropométrica, variables analíticas, MAPA, resultados del ITB, así como los datos de la exploración cardiaca autonómica se recogieron en un cuaderno de recogida de datos codificado por parte del investigador principal y sus colaboradores. Una vez finalizado el protocolo se procedió al análisis estadístico de los datos.

### **9.1. Cálculo del tamaño muestral**

Para el cálculo del tamaño muestral necesario para alcanzar el objetivo principal del estudio se utilizó el programa Ene 3.0 (<http://www.e-Biometria.com>). No existían estudios en la literatura estableciendo la prevalencia de la EAP asintomática en pacientes con DM1. No obstante, teniendo en cuenta una prevalencia de DM1 en la población general del 0,4% (<https://www.cdc.gov/diabetes/data/statistics/statistics-report.html>) estimamos que la población de pacientes con DM1 de nuestra área sanitaria se situaba en torno a 2.000 sujetos. La prevalencia comunicada de EAP sintomática y asintomática en población con DM1 se sitúa en torno al 6,3% (189) y se estima que un 90% corresponde a pacientes asintomáticos (104). Por lo tanto, para conseguir una precisión del 2,5% en la estimación de la prevalencia mediante un intervalo de confianza asintótico normal con corrección para poblaciones finitas al 95% bilateral, asumiendo que la proporción esperada es del 5,7% y que el tamaño total de la población es de 2.000 pacientes, era necesario incluir 284 unidades experimentales en el estudio. Asumiendo un porcentaje de abandonos del 5% sería necesario reclutar 299 unidades experimentales en el estudio.

## 9.2. Análisis estadístico

La estadística descriptiva de las variables evaluadas de este estudio se presenta en forma de media  $\pm$  desviación típica (IC 95%) o mediana (rango intercuartílico) para las variables cuantitativas según su distribución, o números crudos [porcentaje (IC 95%)] para las variables cualitativas, utilizando el método de Newcombe-Wilson sin corrección de continuidad. La normalidad de las variables se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, procediéndose a su transformación matemática para asegurar la normalidad de las mismas en caso necesario antes de realizar las comparaciones. Utilizamos para ello la transformación logarítmica o el método de transformación por dos pasos de *Templeton* (190). Se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis de aquellas variables que mantenían una distribución anormal tras su transformación. La comparación de las medias se realizó mediante la prueba t de *Student*, la prueba de U de *Mann-Whitney* o prueba de ANOVA, según fue necesario. La diferencia de las medias entre los diferentes grupos fue analizada *post hoc* mediante los métodos de *Bonferroni* o *Tamhane T2*, según se consideró apropiado. Se procedió a análisis de la covarianza (ANCOVA) en el caso de ser necesario ajustar por covariantes en las comparaciones entre grupos. La asociación entre variables cuantitativas se analizó mediante la prueba de correlación de *Pearson*, *Spearman* y correlaciones parciales. Las variables discretas se compararon mediante la prueba  $\chi^2$ , exacta de *Fisher* o regresión logística binaria según fue necesario. Para establecer modelos predictivos para la presencia de EAP asintomática se implementaron modelos de regresión binaria logística introduciendo como variables independientes aquellas con significación en los análisis univariantes o aquellas con significación clínica a juicio del investigador principal. Se analizaron modelos completos y por pasos de regresión lineal múltiple (probabilidad para la entrada  $\leq 0.05$ , probabilidad para la salida  $\geq 0.10$ ) para determinar los principales determinantes de las pruebas de

disfunción cardiovascular autonómica, así como los principales determinantes de los niveles séricos de s-Klotho. Se procedió al cálculo del valor predictivo positivo del ITB para el diagnóstico de EAP y su IC 95% fue calculado considerando como verdaderos positivos aquellos individuos que presentaron resultados patológicos en las pruebas de confirmación de EAP (índice dedo-brazo, morfología de la onda de pulso arterial o diagnóstico de ateromatosis en la cartografía ecográfica arterial). Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS 15.0.

## **10. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Al tratarse de un estudio observacional de prevalencia, el presente proyecto no pretendió establecer la secuencia ni asociación temporal entre diferentes variables clínicas, por lo que no sustenta inferencia de causalidad con los diferentes factores de riesgo asociados ni establece riesgos relativos directos, permitiendo sólo establecer asociaciones generales.

Si bien es cierto que los estudios de prevalencia están sujetos a potenciales sesgos de selección que conllevan el análisis de una muestra de sujetos no representativa de la población general, en el caso de la patología a estudio este factor es poco probable dado que:

- Los pacientes con DM1 son mayoritariamente derivados a para seguimiento a Consulta Especializada de Endocrinología y Nutrición independientemente del grado de afectación o control metabólico.
- En el Servicio de Endocrinología y Nutrición los pacientes con DM1 son atendidos de forma casi exclusiva en Consulta Monográfica de esta patología.

Estos dos factores sugieren firmemente que los pacientes atendidos en nuestra consulta monográfica realmente son un reflejo fiel de la diversidad de la población con DM1 de nuestro entorno.

## 11. PLAN DE TRABAJO

En la **Figura 1** se esquematiza el cronograma de plan de trabajo seguido durante la fase de ejecución del proyecto.

- **PERIODO DE SELECCIÓN E INCLUSIÓN DE PACIENTES (24 MESES):**

Desde el 23 de enero 2016 al 31 de diciembre de 2017.

**1.1)** Selección de pacientes candidatos de la Consulta Monográfica de DM1 y de la Consulta Monográfica de Bombas de Insulina del Servicio de Endocrinología y Nutrición del H.U. Ramón y Cajal e inclusión de aquellos que acepten su participación en el estudio.

**1.2)** Realización de la evaluación completa:

**1.2.1)** Anamnesis, exploración física, valoración antropométrica y exploración del pie diabético en Consulta Monográfica de DM1 y en la Consulta Monográfica de Bombas de Insulina del centro.

**1.2.2)** Extracción analítica y almacenamiento de muestras de archivo para posterior determinación: Área de Diagnóstico y Terapéutica del Servicio de Endocrinología y Nutrición (ADYTEN) del H.U Ramón y Cajal. Almacenamiento: Instalaciones del Laboratorio del Grupo de Investigación en Obesidad, Diabetes y Reproducción Humana del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS) y del Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM).

**1.2.3)** Colocación y retirada de dispositivo de MAPA y evaluación de la posible presencia de disfunción autonómica: Consulta Monográfica DM1 y en la Consulta Monográfica de Bombas de Insulina del centro.

**1.2.4)** Realización del ITB: ADYTEN, Consulta Monográfica DM1 y de la Consulta Monográfica de Bombas de Insulina del centro.

**1.2.5)** Valoración por cirugía vascular para descartar o confirmar la presencia de enfermedad arterial periférica asintomática según protocolo del estudio: Servicio de Cirugía Vascular del Hospital Ramón y Cajal.

- **DETERMINACIÓN EN MUESTRAS DE ARCHIVO DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN CRÓNICA SUBCLÍNICA Y DETERMINACIONES HORMONALES:**

Del 1 de enero de 2018 al 31 de marzo de 2018. Instalaciones del Laboratorio del Grupo de Investigación en Obesidad, Diabetes y Reproducción Humana del H.U. Ramón y Cajal.

- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS, COMUNICACIÓN Y PUBLICACIÓN DE RESULTADOS:**

Del 1 de marzo de 2018 al 31 de diciembre de 2018.

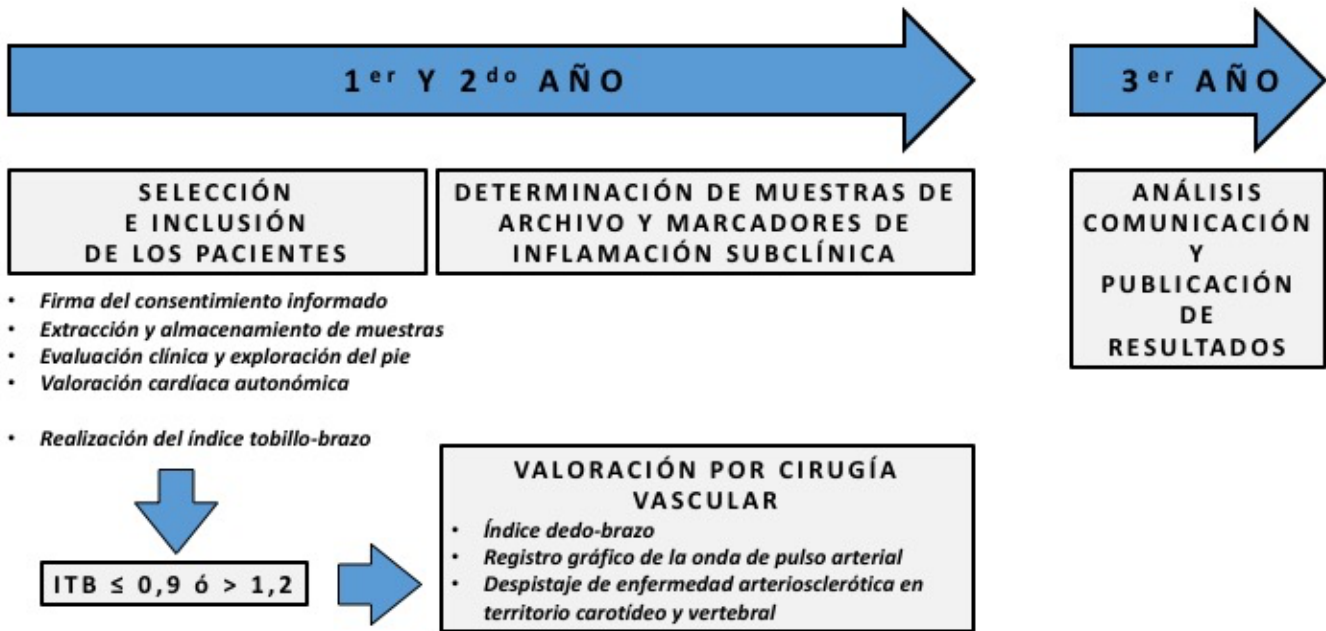
**3.1.)** Análisis estadístico de datos.

**3.2.)** Comunicación y publicación de resultados.



**FIGURA 1**

## **CRONOGRAMA DE PLAN DE TRABAJO**



## **12. ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudio se realizó con arreglo al protocolo, a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki, a las directrices de buenas prácticas clínicas del Comité Internacional de Armonización y a la ley de Investigación Biomédica (14/2007, de 3 de julio).

El protocolo del estudio, la información para el paciente y el consentimiento informado, la información disponible sobre seguridad, los procedimientos de reclutamiento de pacientes, y los documentos que demostraban la cualificación del investigador fueron remitidos al Comité Ético de Investigación Clínica para su revisión ética y su aprobación con arreglo a las normativas locales, antes del inicio del estudio (fecha de aprobación: 22 de enero 2016; protocolo ID: 464 / 15) (ver **ANEXO I**).

### **12.1. Confidencialidad de los pacientes**

Los investigadores preservaron la confidencialidad de todos los pacientes que participaron en el estudio, con arreglo a las BPC, Declaración de Helsinki y a la legislación local aplicable en el momento de su implementación (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal).

La información obtenida y difundida por la puesta en marcha del presente estudio fue considerada confidencial y deberá ser tratada en todo momento como tal. Los pacientes del estudio se identificaron con un código numérico tanto en el cuaderno de recogida de datos en papel como en una base informatizada. Sólo aquellos datos de la historia clínica que estaban relacionados con el estudio fueron objeto de comprobación. Esta comprobación se hizo en presencia del Investigador Principal / Investigadores Colaboradores, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias clínicas pertenecientes a los pacientes participantes en el estudio.

Los datos recogidos para el estudio fueron identificados mediante un código y solo el investigador principal / colaboradores pueden relacionar dichos datos con el paciente y con su historia clínica.

El tratamiento de los datos se realizó con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal y se comunicó a los pacientes que pueden ejercer el derecho de acceso, rectificación y cancelación de sus datos. Tanto los investigadores responsables del estudio, como un representante de las Autoridades Sanitarias y el CEIC del Hospital Universitario Ramón y Cajal han dispuesto de acceso a la información registrada a lo largo del estudio. En la publicación de los resultados del estudio no se reveló en ningún caso la identidad de los participantes.

## **12.2. Procedimiento de consentimiento informado (CI).**

Previamente a la participación de un paciente en el estudio, el Investigador obtuvo su libre consentimiento por escrito, tras una explicación suficiente de los objetivos, los métodos, los beneficios esperados y los posibles riesgos del estudio, antes del inicio de cualquier procedimiento de selección descrito en el protocolo. Se facilitó a los pacientes la oportunidad de realizar preguntas y recibir respuestas satisfactorias a sus cuestiones y tuvieron tiempo suficiente para decidir si participan o no en el estudio.

En la obtención y documentación del CI, el Investigador cumplió los requisitos de regulación aplicables, y respetó las BPC y los principios éticos en la Declaración de Helsinki. El formulario de consentimiento CI fue aprobado por el CEIC antes de proporcionárselo a los participantes. El CI se documentó en los registros médicos del paciente. El CI fue firmado y fechado personalmente por el paciente y el médico (IP o colaboradores) que hayan llevado a cabo la entrevista de CI. El CI original firmado se

conserva con arreglo a las normativas de la institución, y se entregó una copia del mismo firmado al paciente. La fecha de otorgamiento de CI se registró también en el CRD.

### **12.3. Compensación a los sujetos**

No se compensó económicamente a los pacientes que completaron el estudio por las molestias ocasionadas por el mismo, dado que la inmensa mayoría de los procedimientos forman parte de la realización de una práctica clínica habitual de excelencia según guías clínicas de atención de pacientes con DM1.

### **12.4. Seguro de Responsabilidad Civil**

El presente estudio no precisó de la contratación de un seguro de responsabilidad civil dado que se trató de un estudio observacional no intervencionista, y en el que los procedimientos diagnósticos no fueron invasivos y se realizó en su mayor parte dentro del contexto de la práctica clínica habitual.

### **12.5. Difusión de resultados**

El investigador se comprometió a publicar los resultados derivados del presente estudio, independientemente de los resultados y conclusiones del mismo, y respetando siempre la confidencialidad de la identidad de los sujetos participantes.

### 13. PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACION.

El presente trabajo ha dado lugar hasta la fecha a las siguientes publicaciones en REVISTAS INTERNACIONALES que presentan en la siguiente sección.

- *Nattero-Chávez L, Luque-Ramírez M, Moncayo S, Alonso-Díaz S, Fernández Durán E, Redondo-López S, García-Ureña M, Escobar-Morreale HF. [Circulating soluble klotho is not associated with an elevated ankle-brachial index as a surrogate marker of early arterial calcification in patients with type 1 diabetes mellitus and no evidence of renal dysfunction.](#) *Diabetes Metab.* 2018 Jan 18. S1262-3636(18)30031-4.*

**FI: 4,008. Categoría: Endocrinology and Metabolism: Quartil: Q2. Fuente: JCR 2018 (WoS).**

- *Nattero-Chávez L, Redondo López S, Alonso Díaz S, Garnica Ureña M, Fernández-Durán E, Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M. [The peripheral atherosclerotic profile in patients with type 1 diabetes mellitus warrants a thorough vascular assessment of asymptomatic patients.](#) *Diabetes Metab Res Rev.* 2018 Oct 19; 35:e3088.*

**FI: 4,758. Categoría: Endocrinology and Metabolism: Quartil: Q1. Fuente: JCR 2018 (WoS).**

- *Nattero-Chávez L, Redondo López S, Alonso Díaz S, Garnica Ureña M, Fernández-Durán E, Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M. [Association of cardiovascular autonomic dysfunction with peripheral arterial stiffness in patients with type 1 diabetes.](#) *J Clin Endocrinol Metab*, July 2019, 104(7):2675–2684.*

**FI: 5,605. Categoría: Endocrinology and Metabolism: Quartil: Q1. Fuente: JCR 2018 (WoS).**

- *Nattero-Chávez L, Alonso Díaz S, Jiménez-Mendiguchia L, García-Cano A, Fernández-Durán E, Dorado Avendaño B, Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M. [Sex dimorphism and sex steroids influence on the cardiovascular autonomic neuropathy of patients with type 1 diabetes.](#) *Diabetes Care*, 2019. *In Press.**

**FI: 15,270. Categoría: Endocrinology and Metabolism: Quartil: Q1. Fuente: JCR 2018 (WoS).**

**14. El presente trabajo ha dado lugar hasta la fecha a las siguientes comunicaciones en CONGRESOS INTERNACIONALES.**

- **Nattero-Chávez L**, Redondo López S, Alonso Díaz S, Garnica Ureña M, Fernández-Durán E, Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M. [The Association Between Vascular Calcification and Subclinical Cardiac Autonomic Neuropathy in Type 1 Diabetes Mellitus Patients.](#) *Endocrine Reviews Volume 38, Issue 3 Supplement, June 2017.*
- **Nattero-Chávez L**, Alonso Díaz S, Montanez Laura, Fernández-Durán E, Redondo López S, Garnica Ureña, Bayona Ane, M Escobar-Morreale HF, and Luque-Ramírez M. [Influence of Sex on Cardioautonomic Neuropathy in Patients with Type 1 Diabetes.](#) *Diabetes 68 (Supplement 1), 2019.*  
[https://diabetes.diabetesjournals.org/content/68/Supplement\\_1/567-P](https://diabetes.diabetesjournals.org/content/68/Supplement_1/567-P)
- Lecumberri E, Luque-Ramírez M, Quiñones Silva J, Fernández E, Alonso Díaz S, Escobar-Morreale H.F and **Nattero-Chávez L**. [Prevalence of Metabolic Syndrome in Patients with Type 1 Diabetes: Impact on Microvascular Complications and Subclinical Inflammation.](#) *Diabetes 68 (Supplement 1) 2463-PUB, 2019.*  
[https://diabetes.diabetesjournals.org/content/68/Supplement\\_1/2463-PUB](https://diabetes.diabetesjournals.org/content/68/Supplement_1/2463-PUB)

**15. El presente trabajo ha dado lugar hasta la fecha a las siguientes comunicaciones en CONGRESOS NACIONALES.**

- S. Alonso Díaz, S. Redondo López, M. Garnica Ureña, M. Cortes Peiró, E. Fernández Durán, E. Benito Martínez, E. Santacruz Cerdá, M. Luque-Ramírez, H.F. Escobar-Morreale y **L. Nattero Chávez**. [Rigidez arterial en pacientes con diabetes mellitus tipo 1. Factores determinantes y su relación con la presencia de neuropatía cardiovascular subclínica.](#) *Endocrinol Nutr.* 2016;63(Espec Cong 2):280
- S. Alonso-Díaz, S. Redondo, M. Garnica, M. Cortes, E. Fernández, E. Benito, L. Montánez, M. Luque-Ramírez, H.F. Escobar-Morreale y **L. Nattero**. [Estudio de prevalencia y características clínicas de la enfermedad vascular periférica asintomática en pacientes con diabetes mellitus tipo 1.](#) *Endocrinol Nutr.* 2016;63(Espec Cong 3):1-23
- S. Alonso Díaz, S. Redondo López, M. Garnica Ureña, E. Fernández Durán, M. Luque-Ramírez, H.F. Escobar-Morreale y **L. Nattero Chávez**. [Prevalencia de la enfermedad vascular periférica asintomática en la diabetes mellitus tipo 1: resultados preliminares.](#) *Endocrinol Nutr.* 2017;64(Espec Cong 1):5
- S. Alonso Díaz, S. Redondo López, M. Garnica Ureña, E. Fernández Durán, E. Benito Martínez, L. Montánez, A. Bayona, M. Luque-Ramírez, H.F. Escobar-Morreale y **L. Nattero Chávez**. [Perfil ambulatorio de presión arterial 24 horas en diabetes mellitus tipo 1 con afectación cardiovascular autonómica](#)



y su relación con la presencia de rigidez arterial periférica. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2017;64(Espec Cong 2):1-24


- J. Quiñones, S. Alonso, P. Benavent, L. Montáñez, A. Bayona y **L. Nattero**. Prevalencia del síndrome metabólico en la diabetes mellitus tipo 1: impacto en el diagnóstico de complicaciones microangiopáticas y parámetros de inflamación subclínica. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2018;65(Espec Cong 2):1-25.
- L. Montáñez Fernández, A. Bayona Cebada, J. Quiñones Silva, S. Alonso Díaz y **M.L. Nattero-Chávez**. Asociación del índice de masa corporal y la adiposidad central en la disfunción cardioautonómica en una cohorte de pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2018;65(Espec Cong 2):1-25.
- V. Martínez Vaello, J. Quiñones, L. Montanez, S. Alonso<sup>1</sup>, E. Fernández Durán, B. Dorado Avendaño, B. Arias Zamorano, M. Luque-Ramírez, H-F. Escobar-Morreale y **L. Nattero-Chávez**. Influencia de los esteroides sexuales en la disfunción cardioautonómica de pacientes con diabetes mellitus tipo 1. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2019.(Espec Cong 2). Aceptado pendiente de publicación.



PUBLICACIONES DERIVADAS DE  
PRESENTE TRABAJO DE  
INVESTIGACIÓN

## RESEARCH ARTICLE

# The peripheral atherosclerotic profile in patients with type 1 diabetes warrants a thorough vascular assessment of asymptomatic patients

Lía Nattero-Chávez<sup>1,3</sup> | Sandra Redondo López<sup>2</sup> | Sara Alonso Díaz<sup>1</sup> |  
Marta Garnica Ureña<sup>2</sup> | Elena Fernández-Durán<sup>3</sup> | Héctor F. Escobar-Morreale<sup>1,3,4</sup> |  
Manuel Luque-Ramírez<sup>1,3,4</sup> 

<sup>1</sup>Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Vascular Surgery, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Diabetes, Obesity and Human Reproduction Research Group, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain

<sup>4</sup>University of Alcalá, Spain

## Correspondence

Lía Nattero Chávez and Manuel Luque-Ramírez, Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitario Ramón y Cajal, E-28034 Madrid, Spain.

Email: marialia.nattero@salud.madrid.org; manuel.luque@salud.madrid.org

## Funding information

Fondo de Investigación Sanitaria from Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and European Regional Development Fund, Grant/Award Number: PI1400649, PI151686 and PIE1600050; Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)

## Abstract

**Aims:** Epidemiological data on subclinical atherosclerotic disease in type 1 diabetes mellitus (DM1) are scarce. We aimed to estimate the subclinical atherosclerosis profile of asymptomatic patients with DM1 and an abnormal ankle-brachial index (ABI).

**Material and methods:** In a cross-sectional design (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02910271), we estimated ABI in 289 consecutive asymptomatic patients with DM1. An abnormal ABI led to measurements of toe-brachial index (TBI) and peripheral doppler ultrasound (DUS) to diagnose peripheral artery disease (PAD) and/or atherosclerotic carotid plaques (ACP).

**Results:** A reduced ( $\leq 0.9$ ) or increased ( $> 1.2$ ) ABI was detected in 17 (6%) and 75 (26%) patients, respectively. PAD was confirmed by TBI and DUS in 9 (53%) patients with a reduced ABI and 28 (37%) patients with an increased ABI, resulting in a 12.8% (9.4–17.2) prevalence of asymptomatic PAD. Fourteen patients with an abnormal ABI also exhibited ACP [4.8% (2.9–7.9)], with 64% of these patients showing bilateral disease. Artery stenosis was mild or moderate in 21% and 29% of patients, respectively. Thus, 46 [16% (12–21)] patients showed asymptomatic PAD, ACP, or both. According to our data, we would have to explore three asymptomatic patients with DM1 and normal pulses to unmask one case of PAD, and seven asymptomatic patients showing abnormal ABI values to detect one carotid disease.

**Conclusions:** Peripheral artery disease is often undiagnosed in asymptomatic patients with DM1. However, its presence may change medical management in a substantial percentage of cases, highlighting the potential benefit of a thorough vascular assessment on these patients.

## KEYWORDS

ankle-brachial index, carotid atherosclerotic disease, peripheral artery disease, prevalence, type 1 diabetes mellitus

## 1 | INTRODUCTION

Patients with type 1 diabetes mellitus (DM1) are at risk of early atherosclerosis. However, most recommendations that address the amelioration of cardiovascular events are extrapolated from studies conducted in patients with type 2 diabetes or from mixed populations of diabetic patients.<sup>1</sup>

Peripheral artery disease (PAD) is prevalent in subjects with diabetes mellitus.<sup>2,3</sup> Although, current guidelines substantially differ in indications for screening,<sup>2-8</sup> the ankle-brachial index (ABI) is recommended as non-invasive test to exclude PAD.<sup>4</sup> However, the sensitivity and specificity of ABI in asymptomatic patients are reduced compared with those in the general population and individuals with symptomatic disease.<sup>9</sup> Thus, the actual prevalence of PAD in DM1 might be underestimated, partly because these patients are frequently asymptomatic,<sup>10</sup> and because current data rely mostly on amputation rates.<sup>11</sup> Clinical features of PAD in asymptomatic subjects also vary from those observed in the general population, leading to poorer outcomes.<sup>12</sup> Therefore, an early diagnosis is important for patients with DM1, because PAD is a major risk factor for amputation, and it is closely associated with cardiovascular morbimortality.<sup>13</sup>

Patients with DM1 appear to be also at risk for subclinical atherosclerotic carotid disease compared with age-matched and sex-matched healthy subjects.<sup>1</sup> Carotid stenosis by atherosclerotic carotid plaques (ACP) is prevalent in outpatients with PAD,<sup>5</sup> certainly increasing their risk for cardiovascular events. While screening low-risk asymptomatic populations is not recommended,<sup>14</sup> such a strategy may be reasonable in patients at high risk such as those with DM1 who already have atherosclerotic disease in another vascular bed,<sup>1</sup> although this association has not been explored so far.

In this work, we estimated the subclinical atherosclerosis profile of patients with DM1, addressing their asymptomatic PAD (aPAD) and ACP prevalence. To achieve this goal, we used the currently recommended screening test, the ABI. In the subset of patients with an abnormal ABI, we performed an exhaustive vascular examination using toe-brachial index (TBI) and peripheral vascular Doppler

ultrasonography (DUS). We also explored extracranial internal carotid and vertebral arteries using vascular sonography.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study population

We conducted a cross-sectional study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02910271) in 289 patients with DM1 consecutively recruited at the Diabetes Unit from an academic hospital in Madrid, Spain (Figure 1).

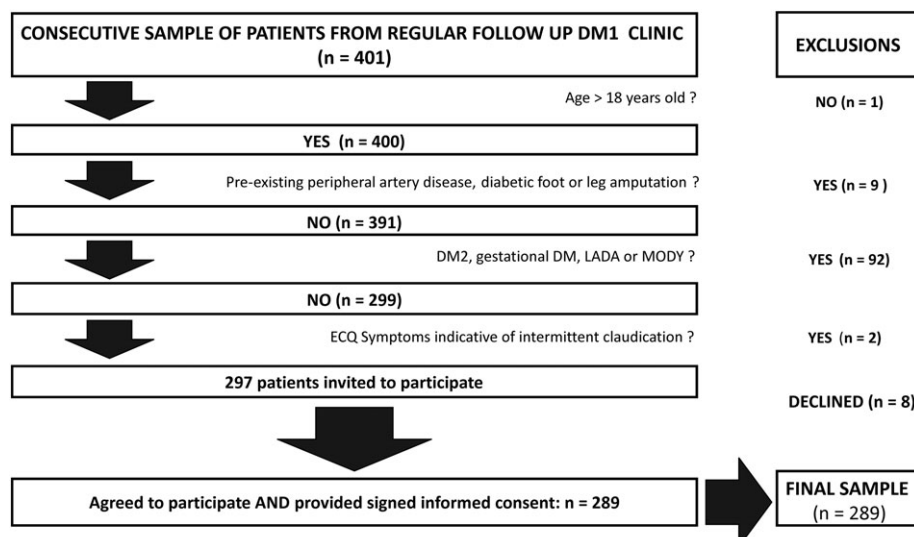
Inclusion criteria were as follows: (1) diagnosis of diabetes mellitus, as defined by ADA criteria, before the age of 30<sup>15</sup>; (2) presence of circulating islet-specific pancreatic autoantibodies against the 40 K fragment of tyrosine phosphatase, glutamic acid decarboxylase, and/or insulin at diagnosis or during the course of disease; and/or (3) presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis.

Exclusion criteria were as follows: (1) symptomatic intermittent claudication;<sup>16</sup> (2) previous diagnosis of PAD (including revascularization), diabetic foot, or lower extremity amputation; (3) renal transplantation or renal replacement therapy; (4) previous diagnosis of cerebrovascular disease or ACP (including angioplasty or endarterectomy); (5) ongoing pregnancy; and (6) other types of diabetes mellitus.

Written informed consent was obtained from each patient included in the study. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee.

### 2.2 | Clinical, anthropometric, and biochemical variables

We reviewed the medical history and recorded the parameters related to DM1 and cardiovascular risk factors: microvascular complications including any diabetes mellitus-related eye disease; neuropathy, including any diabetes mellitus-related neurological complication; and



**FIGURE 1** Flow chart of the study

nephropathy, including any diabetes mellitus-related kidney disease. Non-exclusive macrovascular complications, such as coronary heart disease, and smoking status were also recorded. Current smoking was defined as having smoked cigarettes within the last 30 days preceding the survey. Individuals who smoked regularly but were not current smokers were considered past smokers. Only individuals who had never smoked were considered nonsmokers.

Patients were submitted to a complete anthropometric evaluation that included weight, height, waist circumference, and hip circumference measurements.<sup>17</sup> Patients were classified according to their BMI. All patients were carefully assessed for peripheral diabetic neuropathy.<sup>4</sup> A fasting blood sample and urine collection were collected to assess renal function (creatinine and estimated glomerular filtration rate [MDRD-4]) and to measure the urinary albumin-to-creatinine ratio, serum lipids, and HbA<sub>1c</sub>.

### 2.3 | Assessment of peripheral vascular disease

The aPAD prevalence was evaluated by using four noninvasive tests (pulse examination, ABI, TBI, and peripheral vascular DUS). Lower extremities were checked for signs of PAD, and peripheral pulses were examined at both dorsalis pedis and tibialis posterior arteries.<sup>4</sup> We measured ABI using a Minidop ES 8 Mhz sonographic device (Hadeco, Inc., Miyamae-ku Kawasaki, Japan).<sup>18</sup> To calculate ABI, we used the lowest ankle systolic blood pressure (SBP) for each leg divided by the highest brachial SBP to have a higher positive test rate in a screening population.<sup>19</sup> ABI results were categorized as normal (ABI 0.91-1.20); mild impairment (ABI 0.70-0.90); moderate impairment (ABI 0.40-0.69); severe impairment (ABI <0.40); or incompressible artery (ABI >1.20). This cutoff was used to increase sensitivity as a screening tool. Nonetheless, we performed another sensitivity analyses using the currently recommended cut-off and ABI calculation in standard care.<sup>5</sup> To standardize the performance of measurements, the principal investigator (L.N.C) was trained under the guidance of a consultant vascular surgeon before the beginning of the study (S.R.L.).

All subjects with abnormal ABI (either  $\leq 0.9$  or  $> 1.2$ ), were subsequently explored by two experienced vascular surgeons (S.R.L. and M. G.U.) who corroborated or ruled out aPAD diagnosis using a combination of TBI and peripheral arterial DUS. Waveform analyses from femoral, popliteal, tibial posterior and anterior, peronea and pedial arterial territories were performed, focusing on the diagnostic criteria for arterial diameter reduction.<sup>20</sup> A Toshiba Nemio Model SSA-550A Basic Diagnostic Ultrasound System (Toshiba Medical Systems S.A., Alcobendas, Madrid, Spain) with a 7.5-MHz probe was used for DUS assessments. Waveform was categorized as normal (triphasic waveform) or abnormal (biphasic, monophasic or absent).<sup>20</sup>

Toe-brachial index test was performed by a plethysmographic detection device (Falcon Pro model, Viasonix S.A. Ra'anana, Israel).<sup>21</sup> According to the current recommendations for patients with diabetes,<sup>13,20-22</sup> such a diagnosis was defined by a TBI <0.7 and loss of the waveform triphasic pattern, visualization of atherosclerotic plaques, or PAD diagnostic criteria in arterial DUS assessment.<sup>20</sup> For final analyses, data were available in all patients for peripheral arterial

DUS, but the TBI could not be performed in 11 subjects for technical reasons.

### 2.4 | Extracranial carotid and vertebral artery ultrasonography

Participants with an ABI  $\leq 0.9$  or  $> 1.2$  underwent a carotid ultrasound examination<sup>23</sup> using the same sonographic device and linear array transducer previously described. Carotid intima-media thickness (cIMT) was calculated for both common carotid arteries. The means of these measurements were displayed for each patient. Common carotid, internal carotid, external carotid, and vertebral arteries were also scanned for the presence of ACP.<sup>20</sup> ACP was defined as cIMT  $\geq 1.5$  mm protruding into the lumen.<sup>23</sup> Subclinical carotid atherosclerosis was defined as the presence of at least one plaque in any of the territories explored. The criteria for categorizing arterial stenosis were defined as absent, mild (<50%), moderate (50-70%), severe (>70%); subtotal or total occlusion.<sup>20</sup>

Participants rested in supine position for at least 10 minutes before pressure measurements were taken. All vascular tests were conducted under standardized conditions (quiet room, comfortable temperature) after an overnight fasting to avoid the possible interference of a postprandial surge in glucose levels.

### 2.5 | Sample size calculation

Sample size analysis used the Ene 3.0 software (<http://www.e-Biometria.com>). Considering that the prevalence of DM1 in the general population is approximately 0.4% (<https://www.cdc.gov/diabetes/data/statistics/statistics-report.html>), we estimated that out of the residential population of approximately 500 000 people in the area assigned by the public health system of our Department, there were 2000 patients with DM1. We used the prevalence of symptomatic- and asymptomatic PAD in DM1 of 6.3%,<sup>24</sup> with approximately 90% of patients being asymptomatic.<sup>10</sup> We concluded that we would need 284 subjects to assume an expected proportion of 5.7%, with an absolute precision of 2.5% at both sides of the proportion, and an asymptotic bilateral 95% confidence interval with correction for a finite population as the normal range.

### 2.6 | Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean  $\pm$  SD with its respective 95% confidence intervals (95%CI). Normality of continuous variables was checked by the Kolmogorov-Smirnov test and ensured by applying logarithmic transformations or by a two-step transformation method.<sup>25</sup> We used non-parametric tests to analyse variables that remained skewed even after transformation. The differences in means were analysed by Student *t* or Mann-Whitney *U* tests. Discrete variables were presented according to their absolute, relative frequency, and 95%CI determined using the Wilson method without continuity correction. The differences between proportions were estimated using the  $\chi^2$  or Fisher's exact tests. The positive predictive value (PPV) of ABI for aPAD diagnosis and its 95%CI were calculated considering

as true positives those individuals showing also abnormal findings in the TBI and/or DUS. The statistical significance was set at the  $P < 0.05$  level.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Prevalence of peripheral and carotid artery disease

Clinical characteristics of the whole population and as a function of ABI categories are shown in Table 1. Pulse palpation showed 13 subjects [4.5% (2.7-7.6)], in whom no pulsation was detected in the dorsalis pedis, posterior tibial, or both arteries. In addition, 22 patients had a reduced, but not absent, dorsalis pedis artery pulsation in at least one limb, and seven showed similar findings at the posterior tibial artery.

Seventeen out of 289 asymptomatic patients had an ABI  $\leq 0.9$  [5.9% (3.7-9.2)] (Figure 2, Panel A). Artery impairment was considered mild in all patients. Nine out of 17 patients with ABI values  $\leq 0.9$  had an abnormal TBI and/or DUS study. Accordingly, an ABI  $\leq 0.9$  had a PPV for diagnosing aPAD of 53% (31-74).

Another 75 patients had ABI values  $> 1.2$  [26% (21-31)] (Figure 2, Panel A). aPAD was found in 28 cases by the presence of an abnormal TBI and/or DUS study. The PPV for diagnosing aPAD was 49% (38-60).

Hence, 37 of the patients showing an abnormal ABI (either  $\leq 0.9$  or  $> 1.2$ ) had a TBI  $< 0.7$  and/or an abnormal DUS study (Figure 2, Panel B). Thus, the actual aPAD prevalence among our study subjects was 12.8% (9.4-17.2).

We performed a limb-specific analysis of the 28 patients with ABI  $> 1.2$  and an abnormal TBI and/or DUS (56 ABI measurements for each leg including tibialis posterior and pedal arteries for a total of 112 ABI measurements). A total of 43 legs (23 rights legs and 20 lefts legs) showed abnormal TBI and/or DUS results. Fifteen patients showed a bilateral involvement. Of the 43 legs with an abnormal TBI and/or DUS, 20 arteries (23%) showed an ABI between 1.21 and 1.30, 12 arteries (14%) showed an ABI between 1.31 and 1.40 and 30 arteries (35%) showed an ABI  $> 1.40$ . We found 24 arteries (28%) with an ABI between 0.91 and 1.20 in patients having an ABI  $> 1.20$  in another arterial bed.

Only four subjects with abnormal ABI values (two with an ABI  $\leq 0.9$  and two with a value  $> 1.2$ ) had bilateral non-complicated atherosclerotic plaques in the proximal femoral territories in peripheral arterial DUS evaluation. One case showed multilevel compromise by the presence of a concomitant pedal plaque. All four subjects showed abnormal waveform and TBI results. No patients went on to revascularization procedure.

Fourteen out of 289 asymptomatic patients, showing an abnormal ABI, had ACP (4.8% [2.9-7.9]) in the internal carotid artery with nine patients showing bilateral impairment (Figure 2, panel B). Seven cases showed no hemodynamic changes, whereas artery stenosis was categorized as mild in three patients (21%) and moderate in four cases (29%). We did not find any patient with vertebral artery atherosclerosis. As a function of ABI values, only four out of 17 patients with values  $\leq 0.9$  had ACP (with two cases showing bilateral disease),

whereas 10 of the 75 patients showing ABI values  $> 1.2$  suffered from ACP, with seven patients having bilateral carotid involvement (Figure 2, panel B).

In summary, 46 asymptomatic patients with DM1, captured by ABI screening, showed subclinical atherosclerosis at lower extremity and/or carotid levels (16% [12-21]) (Figure 2). Of these 46 patients, 32 patients had aPAD alone (with 11 showing bilateral involvement), including four patients who showed macroscopic atherosclerotic plaque visualization in peripheral DUS studies. Another nine patients presented ACP at extracranial carotid exploration (with seven showing bilateral involvement) but no evidence of aPAD. Finally, five patients had both aPAD (with four of them showing bilateral involvement) and concomitant extracranial carotid disease (that was also bilateral in two cases) (Figure 2, panel B).

#### 3.2 | Clinical features of patients with abnormal ABI, aPAD, and carotid artery disease

The percentage of patients having an ABI  $\leq 0.9$  or  $> 1.2$  was independent of sex (Table 1). Patients with ABI values  $\leq 0.9$  or  $> 1.2$  were older compared with subjects with normal ABI (Figure 3, panel A).

Subjects with an ABI  $\leq 0.9$  had longer diabetes duration, were more likely to have microangiopathy, and more frequently used antiaggregant and antihypertensive drugs than individuals with normal ABI (Table 1). Compared with patients with normal ABI, those with an ABI  $> 1.2$  had microangiopathy, used statins, antihypertensive, and antiplatelet drugs more frequently, and had cardiovascular risk factors. No clinical variable discriminated subjects with normal or abnormal TBI and/or DUS results in patients showing abnormal ABI values (Table 2).

Patients with ACP were older and had higher SBP values compared with their counterparts showing normal carotid ultrasound scans (Table 2). ACP was observed earlier both in terms of age and of DM1 duration in men than in women. The youngest male patient was in his third decade of life, whereas no female patient under the age of 40 had ACP. Similarly, ACP was found in three men with a DM1 duration between 11 and 20 years, whereas such findings were not observed in women with a disease duration shorter than 20 years.

Compared with patients with a normal carotid evaluation, individuals presenting ACP used statins more frequently (Table 2).

#### 3.3 | Impact of systematic subclinical peripheral atherosclerosis screening on clinical practice

The use of a different screening criteria for asymptomatic patients would have had a significant impact on the diagnosis missing over 30% of aPAD in some cases.<sup>4,6,26</sup> Furthermore, recent guidelines on PAD<sup>5</sup> recommend defining arterial stiffness by an ABI  $> 1.40$ . Among the 29 patients with an ABI  $> 1.4$ , 14 finally had aPAD. Therefore, another 14 patients actually having aPAD and with an ABI between 1.21 and 1.4 would have remained undiagnosed. Similarly, six carotid diseases would have been missed among patients with arterial stiffness.

**TABLE 1** Demographic and clinical features of the participants both as a whole and as a function of ankle-brachial index categories

Variable	All Patients (n = 289)	Ankle-Brachial Index			P	Abnormal (n = 92)	P
		≤ 0.90 (n = 17)	0.91-1.20 (n = 197)	> 1.20 (n = 75)			
Women/men [N (%)]	125 (43) / 164 (57) [38-49] / [51-62]	8 (47) / 9 (53) [26-69] / [31-74]	92 (47) / 105 (53) [40-54] / [46-60]	25 (32) / 50 (68) [24-45] / [55-76]	0.022	33 (36) / 59 (64) [27-46] / [54-73]	0.083
Age (yr-old)	36 ± 12 [35-37]	48 ± 15 [45-51]	33 ± 11 [31-35]	42 ± 11 [39-45]	<0.001***	43 ± 12 [41-45]	<0.001***
DKA at diagnosis [N (%)]	125 (43) [38-49]	6 (5) [17-59]	85 (68) [36-50]	34 (27) [35-57]	0.810	40 (44) [34-54]	0.958
Duration of diabetes (yr)	20 ± 11 [19-21]	29 ± 12 [23-35]	17 ± 10 [16-18]	26 ± 9 [24-28]	<0.001***	26 ± 10 [24-28]	<0.001***
Microangiopathy [N (%)]	65 (23) [18-28]	10 (59) [36-78]	26 (13) [1-19]	29 (39) [28-50]	<0.001***	39 (42) [33-53]	<0.001***
Cardiovascular disease [N (%)]	6 (2) [1-5]	1 (6) [1-27]	2 (1) [0-4]	3 (4) [1-11]	0.117	4 (4) [4-11]	0.084
Smoking habit [N (%)]	117 (41) [35-46]	10 (59) [36-78]	78 (40) [33-57]	29 (39) [28-50]	0.957	39 (42) [33-53]	0.652
Antiaggregant therapy [N (%)]	22 (8) [5-11]	6 (35) [17-59]	5 (3) [1-6]	11 (15) [8-24]	<0.001***	17 (19) [12-28]	<0.001***
Statin therapy [N (%)]	83 (29) [24-34]	7 (41) [22-64]	36 (18) [14-24]	40 (53) [42-64]	<0.001**	47 (51) [41-61]	<0.001***
Antihypertensive therapy [N (%)]	44 (15) [12-20]	8 (47) [26-69]	18 (9) [6-14]	18 (24) [16-35]	<0.001***	26 (28) [20-38]	<0.001***
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25 ± 4 [25-26]	24 ± 3 [23-26]	25 ± 4 [24-26]	27 ± 4 [26-28]	<0.001**	26 ± 4 [25-27]	0.006
Obesity [N (%)]	25 (9) [6-12]	0 (0) [0-2]	14 (7) [4-12]	11 (16) [8-24]	0.051	11 (13) [7-20]	0.142
Waist circumference (cm)	84 ± 12 [83-85]	86 ± 11 [80-89]	82 ± 12 [80-84]	89 ± 12 [87-92]	<0.001**	89 ± 12 [87-92]	<0.001***
Systolic BP (mmHg)	120 ± 16 [118-122]	127 ± 23 [115-139]	117 ± 14 [115-119]	127 ± 15 [124-131]	<0.001**	127 ± 17 [124-131]	<0.001***
Diastolic BP (mmHg)	72 ± 10 [71-73]	72 ± 10 [67-77]	70 ± 9 [69-71]	75 ± 12 [73-78]	<0.001**	74 ± 12 [72-77]	<0.005***
Heart rate (bpm)	74 ± 12 [73-75]	77 ± 15 [69-85]	74 ± 12 [72-76]	74 ± 12 [72-77]	0.665	75 ± 13 [72-78]	0.699
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	94 ± 18 [92-96]	85 ± 19 [75-95]	96 ± 17 [94-98]	90 ± 18 [86-94]	<0.005	89 ± 18 [85-93]	<0.005***
HbA <sub>1c</sub> (%)	7.6 ± 1.3 [7.5-7.8]	7.9 ± 1.1 [7.3-8.5]	7.5 ± 1.3 [7.3-7.7]	7.6 ± 1.3 [7.3-7.9]	0.640	7.7 ± 1.3 [7.4-8.0]	0.413
Total cholesterol (mmol/L)	4.5 ± 1.7 [4.3-4.7]	4.6 ± 0.8 [4.2-5.0]	4.5 ± 2.1 [4.2-4.8]	4.5 ± 0.8 [4.3-4.7]	0.966	4.5 ± 0.8 [4.3-4.7]	0.977
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.5 ± 0.4 [1.5-1.6]	1.4 ± 0.5 [1.1-1.7]	1.5 ± 0.3 [1.4-1.5]	1.5 ± 0.4 [1.4-1.6]	0.513	1.4 ± 0.4 [1.3-1.5]	0.811
LDL-cholesterol (mmol/L)	2.6 ± 0.6 [2.5-2.7]	2.7 ± 0.7 [2.3-3.1]	2.6 ± 0.6 [2.5-2.7]	2.6 ± 0.7 [2.4-2.8]	0.548	2.6 ± 0.7 [2.5-2.7]	0.345
Triglycerides (mmol/L)	0.9 ± 0.4 [0.9-1]	1.2 ± 0.9 [0.7-1.7]	0.8 ± 0.4 [0.7-0.9]	0.9 ± 0.5 [0.8-1]	0.010	1.0 ± 0.6 [0.9-1.1]	<0.005***
Toe brachial index	NA	0.74 ± 0.18 [0.7-0.8]	NA	0.79 ± 0.14 [0.7-0.8]	0.306	0.76 ± 0.15 [0.7-0.8]	NA
Abnormal waveform [N (%)]	NA	6 (35) [28-79]	NA	11 (15) [8-24]	0.078	17 (19) [12-28]	NA

Continuous and discrete variables are shown as mean ± SD and raw numbers (percentage), respectively. Figures below those statistics denote confidence intervals.

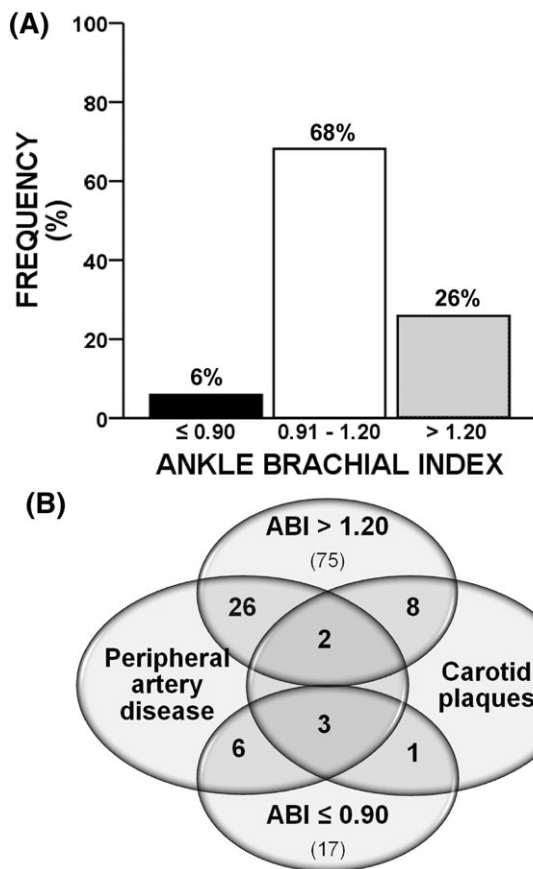
Abbreviations: BP, blood pressure; DKA, diabetic ketoacidosis; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HDL, high density-lipoprotein; LDL, low density-lipoprotein; NA, not available; ns, non-significant.

\*P < 0.005 normal ABI compared with reduced ABI.

\*\*P < 0.005 normal ABI compared with increased ABI.

\*\*\*P < 0.005 normal ABI compared with abnormal ABI.



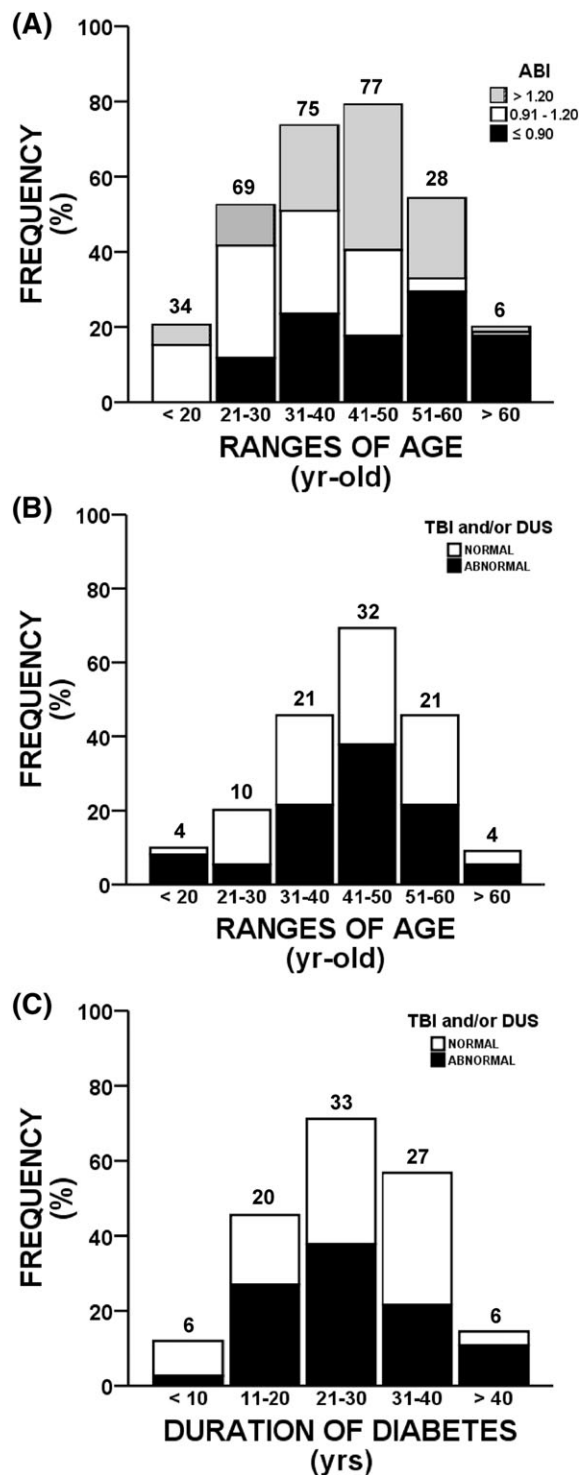


**FIGURE 2** Prevalence of PAD and arterial stiffness defined by ABI in the group of asymptomatic patients with type 1 diabetes mellitus considered as a whole (A), and distribution of patients with abnormal ABI and observed agreements with more specific techniques for aPAD diagnosis and carotid artery disease (B)

The calculation of the ABI also had a significant impact on PAD diagnosis. If we had used a common ABI assessment, ie, the highest SBP of that measured in each arm as the denominator divided by the highest SBP of the tibialis posterior or pedal arteries at each ankle, as recommended for clinical practice,<sup>13</sup> only six patients would have an ABI <0.9, with four of them also showing an abnormal TBI and/or DUS study. That means that our calculation increased the percentage of patients with abnormal ABI from 11.4% to 12.8%, even though, the false positive rate with both approaches would be virtually identical taking into account those patients with high ABIs. In other words, we needed 11 more confirmative explorations with our study's ABI calculation, but 2.23 fold more cases of hidden disease were detected (five more patients with aPAD, one of them with concomitant carotid disease).

Among the asymptomatic patients with normal peripheral pulses and abnormal ABI values ( $n = 71$ ), 23 finally had aPAD. Of those 23 patients, eight patients were not being treated with statins and would not have any other absolute indication of treatment except for secondary prevention due to the newly PAD diagnosis.<sup>5,27</sup> Accordingly, we would have to explore three asymptomatic patients with DM1 and normal pulses to unmask one case of aPAD, and nine individuals to start a new statin treatment.

Among the individuals with ACP, only six out of 14 patients (Table 2) were using single antiplatelet therapy according to current



**FIGURE 3** Distribution of abnormal ABI values and aPAD according to age ranges and duration of type 1 diabetes mellitus. The figures above the bars represent the number of patients included in each range of age. The likelihood of having an abnormal ABI increased with age ( $P < 0.001$ ), becoming statistically significant in patients over age 40 compared with the youngest ones

recommendations.<sup>27</sup> Twelve of these patients were already taking statins, yet only one patient had low density lipoprotein-cholesterol levels below 1.8 mmol/L. Hence, we would have to explore seven asymptomatic patients of the 92 showing abnormal ABI values to detect one carotid disease, and nine to begin a new antiplatelet or statin treatment.

**TABLE 2** Demographic and clinical features of the participants as a function of the presence of peripheral and carotid artery disease

Variable	Carotid Artery Disease		P	Peripheral Artery Disease		P
	Yes (n = 14)	No (n = 78)		Yes (n = 37)	No (n = 55)	
Women/men [N (%)]	5 (36) / 9 (64) [16-61] / [39-84]	28 (36) / 50 (64) [26-47] / [53-74]	0.990	14 (38) / 23 (62) [24-54] / [46-76]	19 (34) / 36 (66) [23-48] / [52-77]	0.747
Age (yr-old)	51 ± 15 [42-60]	42 ± 10 [40-44]	<0.005	43 ± 12 [39-47]	44 ± 11 [41-47]	0.639
DKA at diagnosis [N (%)]	7 (50) [27-73]	33 (42) [32-53]	0.593	20 (54) [38-69]	20 (36) [25-50]	0.093
Duration of diabetes (yr)	31 ± 10 [25-37]	26 ± 10 [24-28]	0.101	26 ± 10 [23-29]	27 ± 10 [24-30]	0.798
Microangiopathy [N (%)]	7 (50) [27-73]	32 (41) [31-52]	0.532	19 (51) [36-67]	20 (36) [25-50]	0.154
Cardiovascular disease [N (%)]	2 (14) [4-40]	2 (3) [0-9]	0.108	2 (5) [2-17]	2 (4) [1-12]	1.000
Smoking habit [N (%)]	9 (64) [39-84]	30 (39) [28-50]	0.072	14 (38) [24-54]	25 (46) [33-58]	0.469
Antiaggregant therapy [N (%)]	6 (43) [21-67]	11 (14) [8-24]	0.020	7 (19) [10-34]	10 (18) [10-30]	0.929
Statin therapy [N (%)]	12 (86) [60-96]	35 (45) [34-56]	<0.005	18 (49) [33-64]	29 (53) [40-65]	0.701
Antihypertensive therapy [N (%)]	8 (57) [33-79]	18 (23) [15-34]	0.020	13 (35) [22-51]	13 (24) [14-36]	0.230
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	26 ± 4 [24-28]	26 ± 4 [25-27]	0.730	25 ± 5 [23-27]	26 ± 3 [25-27]	0.357
Obesity [N (%)]	2 (14) [4-40]	9 (13) [6-21]	1.000	6 (17) [8-31]	5 (10) [4-20]	0.515
Waist circumference (cm)	91 ± 14 [83-99]	89 ± 11 [87-92]	0.566	87 ± 13 [83-91]	90 ± 11 [87-93]	0.227
Systolic BP (mmHg)	142 ± 19 [131-153]	124 ± 15 [121-127]	<0.005	124 ± 15 [119-129]	128 ± 18 [123-133]	0.149
Diastolic BP (mmHg)	79 ± 22 [66-92]	73 ± 09 [72-73]	0.138	73 ± 10 [70-76]	75 ± 14 [71-79]	0.352
Heart rate (bpm)	73 ± 14 [65-81]	75 ± 13 [72-78]	0.681	77 ± 12 [73-81]	73 ± 13 [69-77]	0.141
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	85 ± 17 [75-95]	90 ± 18 [86-94]	0.370	87 ± 22 [80-94]	91 ± 15 [87-95]	0.209
HbA <sub>1c</sub> (%)	7.5 ± 1.3 [6.8-8.3]	7.7 ± 1.3 [7.4-8.0]	0.685	7.7 ± 1.2 [7.3-8.1]	7.6 ± 1.3 [7.2-8.0]	0.696
Total cholesterol (mmol/L)	4.4 ± 0.7 [4.0-4.8]	4.6 ± 0.8 [4.4-4.8]	0.464	4.4 ± 0.8 [4.1-4.7]	4.6 ± 0.8 [4.4-4.8]	0.337
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.5 ± 0.4 [1.3-1.7]	1.4 ± 0.4 [1.3-1.5]	0.953	1.4 ± 0.4 [1.3-1.5]	1.5 ± 0.4 [1.4-1.6]	0.871
LDL-cholesterol (mmol/L)	2.5 ± 0.6 [2.2-2.8]	2.7 ± 0.7 [2.5-2.9]	0.245	2.5 ± 0.7 [2.3-2.7]	2.7 ± 0.6 [2.5-2.9]	0.180
Triglycerides (mmol/L)	1.0 ± 0.6 [0.7-1.3]	1.0 ± 0.4 [0.9-1.1]	0.251	1.0 ± 0.6 [0.8-1.2]	1.0 ± 0.5 [0.9-1.1]	0.889
Ankle-brachial index	1.17 ± 0.19 [0.48-1.86]	1.23 ± 0.19 [1.20-1.27]	0.295	1.20 ± 0.28 [1.11-1.29]	1.22 ± 0.15 [1.18-1.26]	0.798
cIMT (mm)	0.74 ± 0.15 [0.65-0.83]	0.69 ± 0.15 [0.66-0.72]	0.293	0.70 ± 0.17 [0.64-0.76]	0.70 ± 0.14 [0.66-0.74]	0.889

Continuous and discrete variables are shown as mean ± SD and raw numbers (percentage), respectively. Figures below those statistics denote confidence intervals.

Abbreviations: BP, blood pressure; cIMT, carotid intima-media thickness; DKA, diabetic ketoacidosis; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HDL, high density-lipoprotein; LDL, low density-lipoprotein; ns, non-significant.

## 4 | DISCUSSION

We report that the prevalence of aPAD among unselected patients with DM1 screened by ABI and corroborated by the recommended techniques was 12.8%. If excluded symptomatic patients had been added to those presenting aPAD, the global prevalence of PAD

(asymptomatic plus symptomatic) would have been 17.0% (13.1-21.7). The overall prevalence of ACP in our cohort was 4.8%. Of note, 13.5% of patients with aPAD also have asymptomatic ACP.

There is large evidence that most cases of PAD go undetected in routine clinical practice.<sup>10</sup> As a result, there is considerable interest in the detection of PAD through routine screening,<sup>13</sup> aiming to identify

early PAD, to avoid disease progression and major complications, and to prevent patients at high risk from other cardiovascular events. However, a systematic review of guidelines for PAD screening found divergent recommendations from major organizations.<sup>28</sup> Thus, it is not surprising that a recent review focused on cardiovascular disease and DM1<sup>1</sup> recommends the acquisition of further evidence on this issue, as the available data for DM1 are scarce and mostly derived from diabetic foot or lower extremity amputation rates.<sup>1</sup> Furthermore, epidemiologic data of peripheral artery diseases both in European populations and in women are also lacking.<sup>27</sup> All these gaps in knowledge raise critical questions regarding the goals, suitability, and optimal approach to screening that need to be addressed.

Estimating the actual prevalence of PAD in diabetes mellitus is challenging. Firstly, the presence of peripheral neuropathy may mask symptoms of intermittent claudication. Secondly, the screening tool used to diagnose PAD can impact the final statistics.<sup>29</sup> Moss et al<sup>11</sup> reported that the prevalence of PAD—defined by lower extremity amputation—was over 2.4% in 906 patients with DM1. However, this approach does not take into account subclinical disease in patients at high risk of having atherosclerosis at other sites. Welborn et al<sup>30</sup> reported a PAD prevalence of 14% in an Australian rural population of 1084 patients with diabetes mellitus of whom 179 had DM1. The diagnosis of PAD was based on a standard questionnaire for intermittent claudication, or on the absence of peripheral pulses. Nonetheless, palpation of peripheral pulses should not be used as the sole diagnostic technique to detect PAD because of its high inter-observer variability and lack of sensitivity.<sup>31</sup> Moreover, the PARTNERS programme<sup>10</sup> included 6,389 subjects of whom 41% had diabetes and showed that classic intermittent claudication was uncommon among patients with PAD in keeping with our findings. Accordingly, current clinical guidelines for diabetes mellitus standard care recommend PAD screening by ABI in all symptomatic patients and in asymptomatic patients with weak or absent lower limb peripheral pulses.<sup>4</sup>

Using ABI, Walters et al<sup>32</sup> found a PAD prevalence, defined by an ABI  $\leq 0.9$ , of 8.7% (95%CI 4.9–12.5) among 1077 patients with diabetes mellitus from England. This study included 213 patients with DM1 of similar age at inclusion and participants' duration of disease to our study population, but a larger percentage of smokers and patients who showed a worse metabolic control. Nonetheless, the ABI is problematic in patients with diabetes. ABI performance is reported to be variable, with sensitivities and specificities ranging from 29% to 100%, and from 42% to 97%, respectively.<sup>9</sup> Because medial artery calcification can be found in up to 47% of patients with DM1,<sup>33</sup> the ABI underestimates the true PAD prevalence if defined only by an index  $\leq 0.9$ .<sup>34</sup> Thus, some authors recommend that an increased ABI should be considered as a PAD-equivalent in diabetes mellitus.<sup>35,36</sup> In our population, the prevalence of aPAD defined by abnormal TBI and DUS increased from 6% (when only a reduced ABI was used for screening) to 13% when patients with an increased ABI were also considered for extensive vascular studies. Thus, an elevated ABI may be associated with aPAD in more than one third of patients with DM1 as hereby reported.

But, the PPV of ABI was about 50% in our population. Therefore, aPAD requires a two-step approach to be diagnosed in patients with DM1. A variety of noninvasive examinations is available to this goal including the calculation of pressure index values, exercise testing,

segmental volume plethysmography, transcutaneous oxygen measurements, and photoplethysmography.<sup>5,8,13,20,26</sup> Among them, exercise testing is usually performed to confirm PAD in symptomatic patients with normal resting ABI, being secondary its role in asymptomatic patients.<sup>37</sup> The TBI is a good indicator of limb perfusion in patients with diabetes because the small vessels in the toes are frequently spared from medial artery calcification.<sup>21</sup> Also, DUS has gained a prominent role in the noninvasive assessment of peripheral vasculature, overcoming the limitations of other noninvasive methods and providing a precise anatomic localization and accurate grading of lesion severity.<sup>5,8,26</sup> Although, catheter-based arteriography remains as the gold-standard vascular imaging modality, it must be only considered when surgical intervention is an option.<sup>20</sup>

We have also addressed the prevalence of asymptomatic carotid disease in our patients with DM1 and abnormal ABI. A recent meta-analysis<sup>38</sup> suggests that carotid atherosclerosis prevalence is increased on these patients. Despite screening recommendations for asymptomatic patients with diabetes mellitus are lacking, we report an overall 5% prevalence of ACP among this subgroup of patients, a half of cases with hemodynamic changes, that raises to 14% among patients with confirmed aPAD. The presence of ACP has been shown to be a good predictor of future cardiac events.<sup>39</sup> In those individuals with diabetes mellitus and carotid artery disease, statin treatment to reduce LDL-cholesterol is a reasonable approach for ischemic stroke and other ischemic cardiovascular events prevention.<sup>5,8,26</sup>

Our present study shows an accurate clinical picture of subclinical atherosclerotic disease in DM1 in the setting of an academic hospital. To our best knowledge, we report for the first time a prevalence study in asymptomatic patients with DM1 supported by an adequate sample size calculation. We confirmed the presence of aPAD and ACP by performing vascular sonography in all patients with an abnormal ABI.

Do our findings suggest that current screening for peripheral artery diseases should be changed in patients with DM1? In our opinion, our data may challenge current screening guidelines. If we take into consideration that 73% of patients with aPAD were under 50 years old, 49% did not have microangiopathy, and 62% were non-smokers, most recent recommendations might be too conservative missing one-third of diagnoses in our asymptomatic patients.<sup>4,6,8</sup> According to our findings, we can only disregard PAD screening in those patients with less than 5 years of duration of disease. As seen, the detection of peripheral artery diseases in those subjects is accompanied by changes in their therapeutic management in more than 10% of cases. That intervention is likely to prevent or delay disease progression. Given the well-known impact on patients' quality of life and economic burden of already advanced peripheral vascular diseases, a comprehensive assessment could be cost-effective. However, we cannot ignore that further prospective studies focused on the impact of aPAD screening on strong outcomes and costs are needed to validate this approach.

We are aware of our study limitations. Most of our patients were Caucasian Spaniards. This lack of ethnic diversity may be, in part, unrepresentative for a different population, considering that our cardiovascular disease rates are among the lowest worldwide.<sup>40</sup> We included a significant proportion of young patients that may impact our prevalence figures. Furthermore, glycemic control is reasonably good in our cohort. In this academic setting, patients with DM1 may

be better managed than in the general clinical realm, where prevalence of disease might be higher than that found in our study. Vascular function was not explored thoroughly in the patients with normal ABI results. Hence, possibility exists that some of them actually have aPAD and/or ACP. As a consequence, we have not been able to establish false negative rates, sensitivity and negative predictive values. However, patients with a normal ABI were younger and had a markedly shorter duration of disease than those with an abnormal test. Thus, we would not foresee to find many diagnoses of aPAD among these patients. In conceptual agreement, the percentage of patients with microangiopathy and a normal ABI was significantly lower than that observed among subjects with an abnormal ABI.

In summary, in our representative asymptomatic population of patients with DM1, the overall prevalence of subclinical atherosclerotic disease was 16%. Such a diagnosis had consequences for medical management in a substantial percentage of cases. Reduced or increased ABI showed similar frequencies of peripheral artery diseases. Considering the large prevalence of subclinical conditions, and its consequences for the long-term management, a routine thorough vascular assessment might be warranted in patients with DM1.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Beatriz Dorado Avendaño from the Diagnostic and Therapeutic Facilities of the Department of Endocrinology; and Ms. Cristina Perez of the Vascular Surgery Department of Hospital Universitario Ramón y Cajal, for their excellent technical help.

## CONFLICT OF INTEREST

None declared.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.N.C. recruited subjects, researched and analysed data, and wrote the manuscript. M.L.-R. designed the study, recruited subjects, researched and analysed data, wrote the manuscript, and reviewed/edited the manuscript. S.R.L., S.A.D. and M.G.U. recruited patients, researched data, contributed to the discussion. E.F.D. processed samples and contributed to the discussion. H.F.E.-M. researched data, contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. All the authors approved the final version of the manuscript and take public responsibility for the work as a whole.

## FINANCIAL SUPPORT

This work has been supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (PI1400649, PI151686, and PIE1600050) from Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. M.L.-R. also had a local grant for clinical research from Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). CIBERDEM is also an initiative of Instituto de Salud Carlos III, partially supported by European Regional Development Fund. There were no other sources of funding. The funding organizations played no role on the study design, collection, analysis, and interpretation of data, on the writing of the report; nor on the decision to submit the report for publication.

## ORCID

Manuel Luque-Ramírez  <http://orcid.org/0000-0002-6002-4237>

## REFERENCES

- de Ferranti SD, de Boer IH, Fonseca V, et al. Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation*. 2014;130(13):1110-1130.
- IDF. International Diabetes Federation. Clinical Practice Recommendation on the Diabetic Foot: a guide for health care professionals. 2017.
- IWGF. Guidance on the diagnosis, prognosis and management of peripheral artery disease in patients with foot ulcers in diabetes. 2015.
- American Diabetes Association. 10. Microvascular complications and foot care: standards of medical care in diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S105-S118.
- Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries. Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*. 2018;39(9):763-816.
- Hingorani A, LaMuraglia GM, Henke P, et al. The management of diabetic foot: a clinical practice guideline by the Society for Vascular Surgery in collaboration with the American Podiatric Medical Association and the Society for Vascular Medicine. *J Vasc Surg*. 2016;63(2 Suppl):35-215.
- American Diabetes Association. Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(12):3333-3341.
- Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, et al. 2011 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with peripheral artery disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(19):2020-2045.
- Ozdemir BA, Brownrigg JR, Jones KG, Thompson MM, Hinchliffe RJ. Systematic review of screening investigations for peripheral arterial disease in patients with diabetes mellitus. *Surg Technol Int*. 2013;23:51-58.
- Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *Jama*. 2001;286(11):1317-1324.
- Moss SE, Klein R, Klein BE. The 14-year incidence of lower-extremity amputations in a diabetic population. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 1999;22(6):951-959.
- Elgzyri T, Larsson J, Thorne J, Eriksson KF, Apelqvist J. Outcome of ischemic foot ulcer in diabetic patients who had no invasive vascular intervention. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2013;46(1):110-117.
- Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation ACC/AHA 2005 guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): executive summary a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and

- Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease) endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation*. 2006;113(11):e463-e654.
14. Meschia JF, Bushnell C, Boden-Albala B, et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014;45(12):3754-3832.
  15. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S13-S27.
  16. Leng GC, Fowkes FG. The Edinburgh Claudication Questionnaire: an improved version of the WHO/Rose Questionnaire for use in epidemiological surveys. *J Clin Epidemiol*. 1992;45(10):1101-1109.
  17. *Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation*. Geneva: World Health Organization; 2008.
  18. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, et al. Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;126(24):2890-2909.
  19. Taylor-Piliae REFJ, Varady AN, Hlatky MA, et al. Ankle brachial index screening in asymptomatic older adults. *Am Heart J*. 2011;161(5):979-985.
  20. Gerhard-Herman M, Gardin JM, Jaff M, Mohler E, Roman M, Naqvi TZ. Guidelines for noninvasive vascular laboratory testing: a report from the American Society of Echocardiography and the Society for Vascular Medicine and Biology. *Vasc Med*. 2006;11(3):183-200.
  21. Hoyer C, Sandermann J, Petersen LJ. The toe-brachial index in the diagnosis of peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2013;58(1):231-238.
  22. Hinchliffe RJ, Brownrigg JR, Apelqvist J, et al. IWGDF guidance on the diagnosis, prognosis and management of peripheral artery disease in patients with foot ulcers in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2016;32(Suppl 1):37-44.
  23. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008;21(2):93-111. quiz 189-190.
  24. Secrest AM, Costacou T, Gutelius B, Miller RG, Songer TJ, Orchard TJ. Associations between socioeconomic status and major complications in type 1 diabetes: the Pittsburgh epidemiology of diabetes complication (EDC) Study. *Ann Epidemiol*. 2011;21(5):374-381.
  25. Templeton GF. Approach for transforming continuous variables to normal: implications and recommendations for IS research. *Comm Assoc Inform Syst*. 2011;28(4).
  26. American College of Cardiology F, American Heart Association Task F, Society for Cardiovascular A, et al. 2011 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with peripheral artery disease (updating the 2005 guideline). *Vasc Med*. 2011;16(6):452-476.
  27. American Diabetes Association. 9. Cardiovascular disease and risk management: standards of medical care in diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S86-S104.
  28. Ferket BS, Spronk S, Colkesen EB, Colkesen EB, Hunink MG. Systematic review of guidelines on peripheral artery disease screening. *Am J Med*. 125(2):198-208.
  29. Jude EB, Eleftheriadou I, Tentolouris N. Peripheral arterial disease in diabetes—a review. *Diabet Med*. 2010;27(1):4-14.
  30. Welborn TA, Knuijan M, McCann V, Stanton K, Constable IJ. Clinical macrovascular disease in Caucasoid diabetic subjects: logistic regression analysis of risk variables. *Diabetologia*. 1984;27(6):568-573.
  31. Lundin M, Wiksten JP, Perakyla T, et al. Distal pulse palpation: is it reliable? *World J Surg*. 1999;23(3):252-255.
  32. Walters DP, Gatling W, Mullee MA, Hill RD. The prevalence, detection, and epidemiological correlates of peripheral vascular disease: a comparison of diabetic and non diabetic subjects in an English community. *Diabet Med*. 1992;9(8):710-715.
  33. Costacou T, Huskey ND, Edmundowicz D, Stolk R, Orchard TJ. Lower-extremity arterial calcification as a correlate of coronary artery calcification. *Metabolism*. 2006;55(12):1689-1696.
  34. Faglia E, Favales F, Quarantiello A, et al. Angiographic evaluation of peripheral arterial occlusive disease and its role as a prognostic determinant for major amputation in diabetic subjects with foot ulcers. *Diabetes Care*. 1998;21(4):625-630.
  35. Aboyans V, Ho E, Denenberg JO, Ho LA, Natarajan L, Criqui MH. The association between elevated ankle systolic pressures and peripheral occlusive arterial disease in diabetic and nondiabetic subjects. *J Vasc Surg*. 2008;48(5):1197-1203.
  36. Suominen V, Rantanen T, Venermo M, Saarinen J, Salenius J. Prevalence and risk factors of PAD among patients with elevated ABI. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2008;35(6):709-714.
  37. Hiatt WR, Hirsch AT, Regensteiner JG, Brass EP. Clinical trials for claudication. Assessment of exercise performance, functional status, and clinical end points. *Vascular Clinical Trials*. *Circulation*. 1995;92(3):614-621.
  38. Sun YP, Cai YY, Li HM, Deng SM, Leng RX, Pan HF. Increased carotid intima media thickness (CIMT) levels in patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM): a meta analysis. *J Diabetes Complications*. 2015;29(5):724-730.
  39. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016;69(10):939.
  40. Marrugat J, Subirana I, Comin E, et al. Validity of an adaptation of the Framingham cardiovascular risk function: the VERIFICA study. *J Epidemiol Community Health*. 2007;61(1):40-47.

**How to cite this article:** Nattero-Chávez L, Redondo López S, Alonso Díaz S, et al. The peripheral atherosclerotic profile in patients with type 1 diabetes warrants a thorough vascular assessment of asymptomatic patients. *Diabetes Metab Res Rev*. 2019;35:e3088. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3088>

# Association of Cardiovascular Autonomic Dysfunction With Peripheral Arterial Stiffness in Patients With Type 1 Diabetes

Lía Nattero-Chávez,<sup>1,2</sup> Sandra Redondo López,<sup>3</sup> Sara Alonso Díaz,<sup>1</sup> Marta Garnica Ureña,<sup>3</sup> Elena Fernández-Durán,<sup>2</sup> Héctor F. Escobar-Morreale,<sup>1,2,4</sup> and Manuel Luque-Ramírez<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitario Ramón y Cajal, 28034-Madrid, Spain; <sup>2</sup>Diabetes, Obesity and Human Reproduction Research Group, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, 28034-Madrid, Spain; <sup>3</sup>Department of Vascular Surgery, Hospital Universitario Ramón y Cajal, 28034-Madrid, Spain; and <sup>4</sup>Department of Medicine and Medical Specialties, University of Alcalá, 28801-Madrid, Spain

**ORCID numbers:** 0000-0002-6002-4237 (M. Luque-Ramírez); 0000-0002-6890-1644 (H. F. Escobar-Morreale).

**Context:** Cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) appears to contribute to peripheral arterial stiffness (AS) in type 1 diabetes. Whether CAN in patients with AS is associated with concomitant asymptomatic peripheral arterial disease (aPAD) remains unclear.

**Objective:** To assess the risk of CAN in patients with type 1 diabetes and AS and its potential association with atherosclerosis.

**Design:** Cross-sectional study.

**Setting:** Type 1 diabetes clinic in an academic hospital.

**Patients:** Two hundred sixty-four patients with type 1 diabetes.

**Intervention:** AS was defined as an ankle-brachial index (ABI) >1.2, aPAD by the toe-brachial index and Doppler sonography, and CAN by blood pressure and heart rate responses to active standing and Ewing and Clarke tests.

**Main Outcome Measures:** Odds of having CAN among patients with AS. Odds for CAN were also calculated as a function of the presence of AS and concomitant aPAD.

**Results:** The study population's mean age was  $35 \pm 11$  years, with a duration of disease of  $19 \pm 10$  years and mean hemoglobin A1c of  $7.5\% \pm 1.3\%$ . Seventy-three patients (28%) had peripheral AS, of whom 28 showed aPAD. The prevalence of CAN among patients with AS was 48% but it was only 23% in subjects with normal ABI (OR: 3.1 [1.7; 5.4]). Concomitant aPAD increased the OR for CAN (OR: 4.5 [2.0; 10.1]). After adjustments for aPAD and relevant cardiovascular risk factors, AS remained associated with parasympathetic dysfunction.

**Conclusions:** In type 1 diabetes, both peripheral AS and atherosclerosis were associated with CAN. A simple method, such as the ABI, may identify a subset of patients with undiagnosed dysautonomia. (*J Clin Endocrinol Metab* 104: 2675–2684, 2019)

**A**rterial stiffness (AS) is a marker of subclinical vascular disease that has been documented among young patients with type 1 diabetes (1). The early development of AS in these patients may be a consequence of the exposure of blood vessels to the chronic detrimental effects of hyperglycemia.

Peripheral AS results from medial arterial calcification (MAC), which is a complex dynamic process modified by a variety of molecular signaling pathways (2). Although peripheral AS has been linked to peripheral arterial disease (PAD) (3), the impact of MAC on peripheral vascular beds is poorly understood, even though advanced stages, characterized by loss of elasticity in arterial walls, are associated with worse tissue perfusion ending in arterial flow stasis (4). In the past, MAC was considered a benign condition, even though concomitant PAD was present in a large subset of patients, at least in those with type 1 diabetes (5). Nowadays, arterial wall stiffness is recognized as a key risk factor for cardiovascular morbidity and mortality and is a strong, independent predictor of future cardiovascular events and all-cause mortality (6).

Cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) is another common, yet often underdiagnosed, complication of type 1 diabetes (7, 8) that may lead to severe morbidity and mortality. Although not fully understood from a pathophysiological point of view, CAN may result in a wide spectrum of clinical manifestations, from resting tachycardia to structural cardiomyopathy (9). An early indicator of CAN is reduced heart rate (HR) variability derived both from the loss of parasympathetic regulation and from sympathetic override (9). Such an imbalance may be easily detected in the clinical setting, permitting an early diagnosis of CAN at subclinical stages (10).

The relationship between CAN and atherosclerosis is well known (11–13). The autonomic nervous system regulates HR and vascular tone, and its dysfunction may contribute to the development of atherosclerosis and AS in patients with diabetes mellitus (8). The SEARCH Cardiovascular Disease study (7) suggested that even young patients with type 1 diabetes may present with signs of early autonomic dysfunction. Likewise, CAN and AS have been related independent of the presence of other classic cardiovascular risk factors in these subjects (8). However, whether the presence of CAN is associated with concomitant asymptomatic PAD (aPAD) in patients diagnosed with AS has not been elucidated.

We hypothesized that CAN may be associated with both peripheral AS—as defined by an ankle-brachial index (ABI) >1.2—and the concomitant occurrence of aPAD. With this hypothesis in mind, our study explored the autonomic cardiovascular function of patients with

type 1 diabetes with or without AS, using methods that can be easily implemented in routine clinical practice, to clarify the putative role that CAN may play in the development of aPAD in patients who have type 1 diabetes and present with AS.

## Methods

### Study population

The present preplanned study is part of a larger clinical trial (ClinicalTrials.gov no. NCT02910271) designed to address the prevalence and clinical features of the asymptomatic peripheral atherosclerotic profile of patients with type 1 diabetes (5). A detailed description of this trial has been reported elsewhere (5). In short, inclusion criteria included diagnosis of type 1 diabetes before the age of 30 years (14), supported by (i) the presence of circulating islet-specific pancreatic autoantibodies against the 40K fragment of tyrosine phosphatase, glutamic acid decarboxylase, and/or insulin at diagnosis or during the course of disease, and/or (ii) the presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis, and (iii) an absolute requirement for intensive insulin replacement therapy because of permanent insulinopenia since initial diagnosis or after a honeymoon phase. Exclusion criteria were (i) symptomatic intermittent claudication according to the Edinburgh Claudication Questionnaire (15), (ii) previous diagnosis of PAD, (iii) renal transplantation or renal replacement therapy, (iv) previous diagnosis of cerebrovascular disease, (v) ongoing pregnancy, and (vi) other types of diabetes mellitus.

Of 401 consecutive patients attending our diabetes unit, 272 adult patients ( $\geq 18$  years old) with type 1 diabetes matched these criteria and entered the study, even though the data from only 264 were finally analyzed for technical reasons (Fig. 1). The study protocol conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki as revised in 2008 and was approved by the local ethics committee (date of approval: 22 January 2016; protocol ID: 464/15). Informed consent was obtained from all participants included in the study.

### Anthropometric, biochemical, and clinical variables

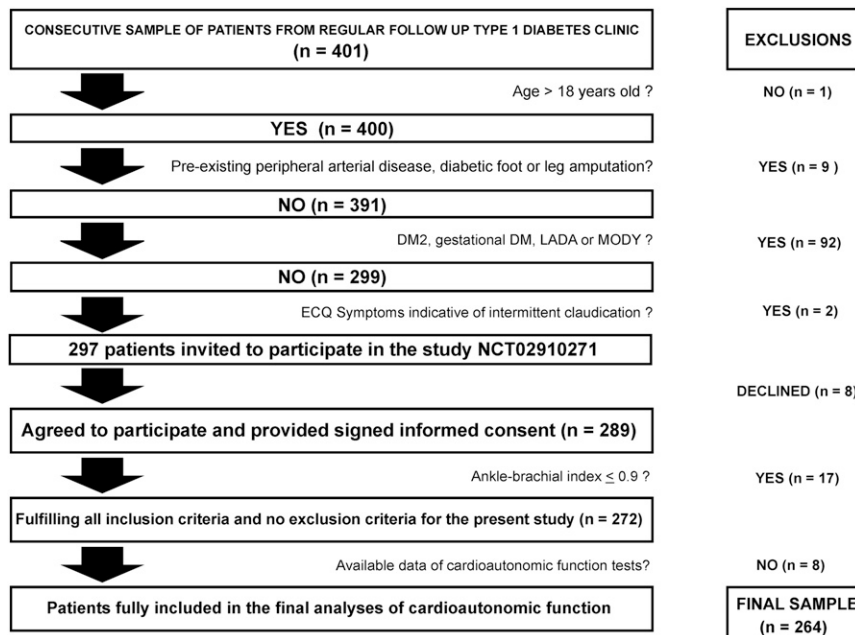
The medical records of the patients were reviewed for their medical history and current medications, including clinical parameters related to type 1 diabetes. Patients were also asked about their current smoking status.

Study subjects were submitted to a complete anthropometric evaluation and were classified according to their body mass index (BMI). Renal function, serum lipid profiles, hemoglobin A1c concentrations, and proinflammatory profiles were also assayed.

All patients were assessed for diabetic peripheral neuropathy (16) by means of a detailed clinical history and clinical tests for large-fiber function, protective sensation, and detection of feet at risk for ulceration by a 128-Hz tuning fork for vibration perception, ankle reflexes, and a 10-g monofilament test.

### Assessment of peripheral vascular disease

Patients were examined for signs of chronic circulatory insufficiency in their lower extremities, and their dorsalis pedis and tibialis posterior pulses were also categorized as present, weak, or absent. Peripheral AS was assessed noninvasively



**Figure 1.** Flowchart of the study. DM, diabetes mellitus; DM2, type 2 diabetes mellitus; ECQ, Edinburgh Claudication Questionnaire; LADA, latent autoimmune diabetes of adulthood; MODY, maturity onset diabetes of the young.

by measuring bilateral ABI using a Minidop ES 8-Mhz sonographic device (Hadeco, Inc., Kawasaki, Japan). ABI was calculated by dividing the systolic blood pressure (BP) measurement obtained at the tibialis posterior and dorsalis pedis arteries of the left and right ankles by the highest of the systolic BP measurements obtained at the left and right brachial arteries (17) and was categorized as normal (ABI = 0.91 to 1.20), reduced (ABI ≤ 0.90), or increased (ABI > 1.20). The latter was assumed to be an equivalent of AS.

Seventeen patients showing reduced ABI were submitted to the Department of Vascular Surgery for full assessment of peripheral atherosclerotic disease and were excluded from the current study (Fig. 1). In all patients with increased ABI, the presence of aPAD was subsequently investigated by using a combination of the toe-brachial index (TBI) and peripheral artery Doppler ultrasonography. TBI tests were performed by a plethysmographic detection device (Falcon Pro; Viasonix S.A., Ra'anana, Israel). Waveform analyses from femoral, popliteal, anterior and posterior tibial, peroneal, and pedal artery territories were performed, focusing on arterial diameter reduction as described earlier (18). A Nemio Model SSA-550A Basic Diagnostic Ultrasound System (Toshiba Medical Systems S.A., Madrid, Spain) with a 7.5-MHz probe served for peripheral artery Doppler ultrasonography assessments. Waveform was categorized as normal (triphasic waveform) or abnormal (biphasic, monophasic, or absent waveform) (18). The diagnosis of PAD was defined by a TBI < 0.7 (19) and loss of the triphasic waveform pattern, visualization of atherosclerotic plaques, or PAD diagnostic criteria in an arterial Doppler ultrasonography examination (18).

### Assessment of cardiovascular autonomic function

Cardiovascular autonomic function (parasympathetic innervation) was assessed by the tests proposed by Ewing and Clarke (10) and recommended by the American Diabetes

Association consensus statement on standardized measures in individuals with diabetes (20). We used a modification of the Ewing score (10) to diagnose the presence of CAN, which scored the responses of HR variability to deep breathing, standing, and the Valsalva maneuver, and the response of BP to active standing as normal (0 points), borderline (0.5 point), or positive (1 point). A composite score ≥ 1 was diagnostic of CAN. For descriptive purposes, CAN was classified as early or mild when the Ewing score was between 1 and 2 and as definitive when ≥ 2 (10). In patients showing two or more abnormal HR variability tests and an abnormal BP test, CAN was considered severe (10).

HR variability was measured between 7:00 and 9:00 AM in all participants after they rested in a supine position for 10 minutes in a room maintained at stable temperature; a Monitor OneDx<sup>®</sup> System (Qmed, Inc., Eatontown, NJ) was used. In brief, the HR response during respiration (deep breath test) was estimated by calculating the ratio of the maximum and minimum HRs during six cycles of paced deep breathing Expiration/Inspiration (E/I) ratio. HR response to the

Valsalva maneuver (Valsalva test) was assessed by calculating the ratio of the longest R-R interval after the maneuver to the shortest interval during or shortly after the maneuver. HR response to standing [orthostatism test] was calculated as the ratio of the longest R-R interval (found at about beat 30) to the shortest interval (found at about beat 15) after standing up (30:15 ratio).

Adrenergic innervation was assessed by changes in BP and HR after 5 minutes of active standing with respect to the values recorded during resting while supine. Systolic and diastolic BP values at resting were measured three times using an aneroid sphygmomanometer and stethoscope while the subjects were seated for at least 5 minutes before a reading was taken (21). The average of the three measurements was used as an estimation of office systolic and diastolic BP readings. Orthostatic hypotension was defined by a fall of > 20 mm Hg in systolic BP or > 10 mm Hg in diastolic BP in response to standing (20). The HR at resting was measured by palpating the radial pulse and counting the number of beats during 60 seconds. Resting tachycardia was defined by an HR > 100 beats per minute.

Both vascular and autonomic function tests were conducted after an overnight fast to avoid the possible interference of a postprandial surge in glucose levels (22). Early morning medications, including short-acting insulin, were withheld until the tests were completed. In addition, patients were advised to refrain from certain lifestyle activities immediately before the assessments, including exercise, smoking, and caffeine intake. Data were available for all BP tests, 99.6% of the E/I ratios, 95.5% of the 30:15 ratios, and 97.3% of the Valsalva tests. In eight of 272 study subjects (2.9%), no data were available from any Ewing test because of technical reasons, and these patients were excluded from the final analyses (Fig. 1).

### Sample size calculation

A sample size of 284 subjects was calculated for the primary objective of the clinical trial (NCT02910271), which was the



prevalence of aPAD in a population of subjects with type 1 diabetes attending our diabetes unit, as already published (5). For the current study, we used the online sample size and power calculator provided by the Institut Municipal d'Investigació Mèdica from Barcelona, Spain, version 7.12 (<https://www.imim.cat/ofertadeserveis/software-public/granmo/>). Assuming a prevalence of CAN of 34%, as already published for French patients with type 1 diabetes presenting without symptomatic PAD (23), and setting  $\alpha$  at 0.1 and  $\beta$  at 0.2 for a one-sided test, the inclusion of at least 73 patients with type 1 diabetes and AS (cases) and 191 patients without AS (controls) would allow recognition of an OR > 2 by a Poisson approximation as statistically significant.

### Statistical analysis

Data are shown as mean  $\pm$  SD, 95% CI [lower limit; upper limit], and counts (%) as appropriate. Normality of continuous variables was ensured by applying logarithmic transformation and was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. We applied nonparametric tests to variables that did not follow the normal distribution even after transformation. Comparisons of discrete variables among study subgroups were performed using the  $\chi^2$  or Fisher exact test or logistic binary regression. Continuous variables were compared by *t* test or Mann-Whitney *U* test and one-way ANOVA. Mean differences among groups were analyzed by *post hoc* Bonferroni or Tamhane T2 methods, as appropriate. Using the Newcombe-Wilson method without continuity correction, we also calculated the OR and 95% CI for CAN of patients with AS and aPAD with respect to their counterparts showing normal ABI (24). Spearman correlation analysis was used to evaluate the association between ABI values and measurements of CAN. To perform the Spearman correlation, we used the highest ABI result, as done in earlier studies (25). Finally, multiple linear regression full and stepwise models (probability for entry  $\leq 0.05$ , probability for removal  $\geq 0.10$ ) were performed to ascertain the main determinants of the variability in the tests of cardiovascular autonomic function. In addition to the presence of AS and aPAD (both coded as no = 0, yes = 1), age, sex (coded as female = 0, male = 1), duration of diabetes, presence of microangiopathy (coded as no = 0, yes = 1), antiaggregant therapy (coded as absent = 0, present = 1), BMI, waist circumference, and systolic and diastolic BP levels were also introduced as independent variables. The level of statistical significance was set at a *P* value <0.05.

## Results

### Study population characteristics

The mean age of the patients at diagnosis of type 1 diabetes was  $16 \pm 8$  years, whereas the mean age at inclusion was  $35 \pm 11$  years. Mean duration of type 1 diabetes was  $19 \pm 10$  years. All patients were under intensive insulin treatment (basal-bolus regimen), with 54 patients (21%) receiving continuous subcutaneous insulin infusion. Mean BMI was  $25 \pm 4$  kg/m<sup>2</sup>. Thirty-five patients (13%) had hypertension and 72 (27%) had dyslipidemia. Mean hemoglobin A1c value of patients at inclusion was  $7.5\% \pm 1.3\%$ . Demographic and clinical characteristics of the participants are shown with details in Table 1.

In 73 patients (28% [23; 33]), an ABI >1.2 suggested the presence of AS. These patients were older and had a longer duration of disease, as well as greater BMI, waist circumference, and systolic BP values (Table 1). Among patients with type 1 diabetes and peripheral AS, aPAD was found in 28. Fifteen patients showed bilateral involvement, and only two subjects had bilateral non-complicated atherosclerotic plaques in the proximal femoral territories on arterial Doppler ultrasonography assessments. No patients needed revascularization procedures.

### Tests of cardiac autonomic function and prevalence of CAN

The prevalence of CAN was significantly greater in patients with AS than in those showing normal ABI values ( $\chi^2$ : 15.6; *P* < 0.001) (Fig. 2), with the former being 3.1 times more likely to exhibit CAN than the latter (Fig. 2).

In patients with a normal ABI, CAN was categorized as early/mild in 41 subjects (21.5%), definitive in three subjects (1.6%), and severe in only one subject. Among patients with AS, 32 subjects (43.8%) had an early/mild form of CAN and three (4.1%) had definitive CAN, whereas no patients presented with severe disease. Orthostatic hypotension was present in only two patients who also had AS. Finally, four patients (2.1%) with a normal ABI and three patients (4.1%) with AS had resting tachycardia.

The subgroup of patients with type 1 diabetes showing the highest prevalence of CAN was composed of those showing AS and aPAD concomitantly. The odds of having CAN were 4.5 times higher among them than in patients showing a normal ABI. However, the presence of AS without aPAD was also associated with higher odds of having CAN (Fig. 1).

Parasympathetic function outcomes, including the E/I ratio and 30:15 ratio (orthostatism test), were reduced in patients with AS compared with patients with normal ABI values (Table 2). Nonetheless, reduction in the 30:15 ratio was observed only in patients with concomitant aPAD (Table 2). Regarding sympathetic function outcomes, the percentage of change in HR in response to active standing was also reduced in patients with AS (Table 2). In agreement, increasing ABI values correlated with decreasing HR variability, suggesting both sympathetic and parasympathetic dysautonomy (Fig. 3).

### Main determinants of cardiac autonomic function tests

In the linear regression models (Fig. 4), after evaluation of the relative contributions of independent variables to variability in the tests of cardiovascular autonomic

**Table 1. Demographic and Clinical Characteristics of All Study Participants and as a Function of the Presence or Absence of Arterial Stiffness and Peripheral Arterial Disease in Those With Arterial Stiffness**

Variable	All Patients (n = 264)	Normal ABI (n = 191)	Arterial Stiffness (n = 73)	P	Arterial Stiffness		P
					No PAD (n = 45)	PAD (n = 28)	
Women/men, n (%)	115 (44)/149 (56) [38; 50]/[50; 62]	90 (47)/101 (53) [40; 54]/[46; 60]	25 (34)/48 (66) [24; 46]/[54; 76]	0.059	15 (33)/30 (67) [21; 48]/[52; 79]	10(36)/18 (64) [21; 54]/[49; 79]	0.835
Age, y	35 ± 11 [34; 37]	33 ± 11 [31; 35]	42 ± 11 [39; 44]	<b>&lt;0.001</b>	43 ± 10 [40; 46]	41 ± 12 [36; 46]	0.355 <sup>a,b</sup>
DKA at diagnosis, n (%)	116 (44) [38; 50]	83 (44) [37; 51]	33 (45) [34; 57]	0.798	18 (40) [27; 55]	15 (44) [36; 71]	0.257
Duration of diabetes, y	19 ± 10 [18; 20]	17 ± 10 [15; 18]	26 ± 9 [24; 28]	<b>&lt;0.001</b>	26 ± 9 [25; 27]	25 ± 10 [21; 29]	0.567 <sup>a,b</sup>
Microangiopathy, n (%)	55 (21) [16; 26]	26 (14) [10; 19]	29 (40) [29; 51]	<b>&lt;0.001</b>	17 (38) [25; 52]	12 (43) [27; 61]	0.666 <sup>a,b</sup>
Cardiovascular disease, n (%)	5 (2) [1; 4]	2 (1) [0; 4]	3 (4) [1; 11]	0.131	1 (2) [0; 12]	2 (7) [2; 23]	0.554
Smoking habit, n (%)	103 (39) [33; 45]	75 (39) [33; 46]	28 (38) [28; 50]	0.892	21 (45) [33; 61]	7 (25) [13; 43]	0.064
Antiaggregant therapy, n (%)	15 (6) [4; 9]	4 (2) [1; 5]	11 (15) [9; 25]	<b>&lt;0.001</b>	7 (16) [8; 29]	4 (14) [6; 35]	1.000 <sup>a,b</sup>
Statin therapy, n (%)	72 (27) [22; 33]	34 (18) [13; 24]	38 (52) [41; 63]	<b>&lt;0.001</b>	24 (53) [39; 67]	14 (50) [33; 67]	0.782 <sup>a,b</sup>
Antihypertensive therapy, n (%)	35 (13) [10; 18]	17 (9) [6; 14]	18 (25) [16; 36]	<b>0.001</b>	10 (22) [13; 36]	7 (25) [13; 43]	0.957 <sup>a,b</sup>
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	25 ± 4 [25; 25]	25 ± 4 [24; 25]	26 ± 4 [25; 27]	<b>&lt;0.001</b>	26 ± 3 [26; 27]	26 ± 5 [24; 28]	0.560 <sup>b</sup>
Obesity, n (%)	26 (10) [7; 14]	16 (8) [5; 13]	10 (14) [8; 23]	0.194	4 (9) [4; 21]	6 (21) [10; 40]	0.168
Waist circumference, cm	84 ± 12 [82; 85]	82 ± 12 [80; 84]	89 ± 12 [86; 92]	<b>&lt;0.001</b>	91 ± 10 [88; 94]	87 ± 13 [82; 92]	0.166 <sup>b</sup>
Systolic BP, mm Hg	119 ± 15 [117; 121]	117 ± 14 [115; 119]	127 ± 16 [123; 130]	<b>&lt;0.001</b>	129 ± 17 [124; 134]	122 ± 12 [117; 127]	<b>0.048<sup>b</sup></b>
Diastolic BP, mm Hg	71 ± 10 [70; 73]	70 ± 9 [69; 71]	74 ± 13 [71; 77]	<b>0.003</b>	75 ± 15 [71; 79]	73 ± 9 [70; 77]	0.548
HR, bpm	74 ± 12 [73; 76]	74 ± 12 [72; 76]	74 ± 13 [72; 77]	0.847	73 ± 13 [69; 76]	77 ± 11 [73; 81]	0.111
eGFR, mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	94 ± 18 [92; 96]	96 ± 17 [94; 98]	90 ± 18 [86; 94]	<b>0.028</b>	92 ± 15 [87; 96]	86 ± 22 [78; 95]	0.209 <sup>a</sup>
HbA <sub>1c</sub> , %	7.5 ± 1.3 [7.4; 7.7]	7.5 ± 1.3 [7.3; 7.7]	7.6 ± 1.3 [7.3; 7.9]	0.740	7.6 ± 1.4 [7.1; 8.0]	7.7 ± 1.2 [7.2; 8.2]	0.657
Total cholesterol, mmol/L	174 ± 70 [166; 182]	174 ± 81 [162; 185]	174 ± 31 [166; 182]	0.266	178 ± 27 [166; 185]	166 ± 35 [154; 178]	0.543
HDL cholesterol, mmol/L	58 ± 15 [54; 58]	54 ± 12 [54; 58]	58 ± 15 [54; 62]	0.787	58 ± 15 [50; 62]	58 ± 15 [50; 66]	0.743
LDL cholesterol, mmol/L	100 ± 23 [97; 104]	100 ± 23 [97; 104]	100 ± 23 [97; 108]	0.537	104 ± 23 [97; 112]	97 ± 27 [85; 108]	0.326
Triglycerides, mmol/L	80 ± 35 [71; 80]	71 ± 35 [71; 80]	80 ± 44 [71; 89]	0.205	80 ± 35 [71; 89]	80 ± 53 [62; 97]	0.502
Ankle-brachial index	1.17 ± 0.20 [1.15; 1.20]	1.09 ± 0.07 [1.08; 1.10]	1.40 ± 0.27 [1.33; 1.46]	<b>&lt;0.001</b>	1.34 ± 0.22 [1.27; 1.40]	1.49 ± 0.30 [1.37; 1.61]	0.077 <sup>b</sup>

Continuous and discrete variables are shown as mean ± SD and counts (%), respectively. Figures below those statistics denote 95% CIs. The boldface *P* values denote statistical significant comparisons.

Abbreviations: bpm, beats per minute; DKA, diabetic ketoacidosis; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HbA<sub>1c</sub>, hemoglobin A1c; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density-lipoprotein.

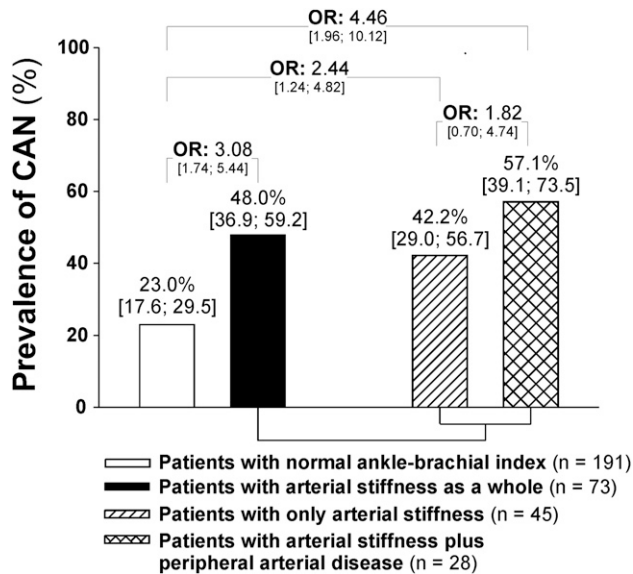
<sup>a</sup>*P* < 0.005, high ABI with peripheral arterial disease compared with normal ABI.

<sup>b</sup>*P* < 0.005, high ABI without peripheral arterial disease compared with normal ABI.

function, the diagnosis of AS remained a determinant of reduced E/I ratio. Likewise, the presence of concomitant aPAD determined a reduced HR variability in response to orthostatism (30:15 ratio) after adjustment for other independent variables. Neither the presence of AS nor concomitant aPAD was a significant determinant of other tests of cardiovascular autonomic function (data not shown).

## Discussion and Conclusions

The current study evaluated the association between CAN and AS—defined by an ABI ≥1.2—in patients with type 1 diabetes while thoroughly screening for aPAD using vascular sonography. We hereby report that the compliance of peripheral arteries is related to cardiovascular autonomic dysfunction among young adults



**Figure 2.** Prevalence of CAN presented as percentage (%) and 95% CI. ORs [95% CIs] are also shown for CAN in patients with arterial stiffness and asymptomatic peripheral arterial disease relative to their counterparts with a normal ABI.

with type 1 diabetes who maintain acceptable glycemic control. Our findings also show that the prevalence of CAN in patients with AS is threefold that of patients with normal ABI values, with the highest prevalence in the subset of patients with both AS and concomitant aPAD; in addition, this association persisted even after adjustments for the presence of other relevant cardiovascular risk factors and aPAD. Furthermore, in what appears to be another link between CAN and cardiovascular

morbidity, in our cohort of patients with type 1 diabetes, peripheral AS appeared to foster the association of cardiovascular autonomic dysautonomia and atherosclerosis.

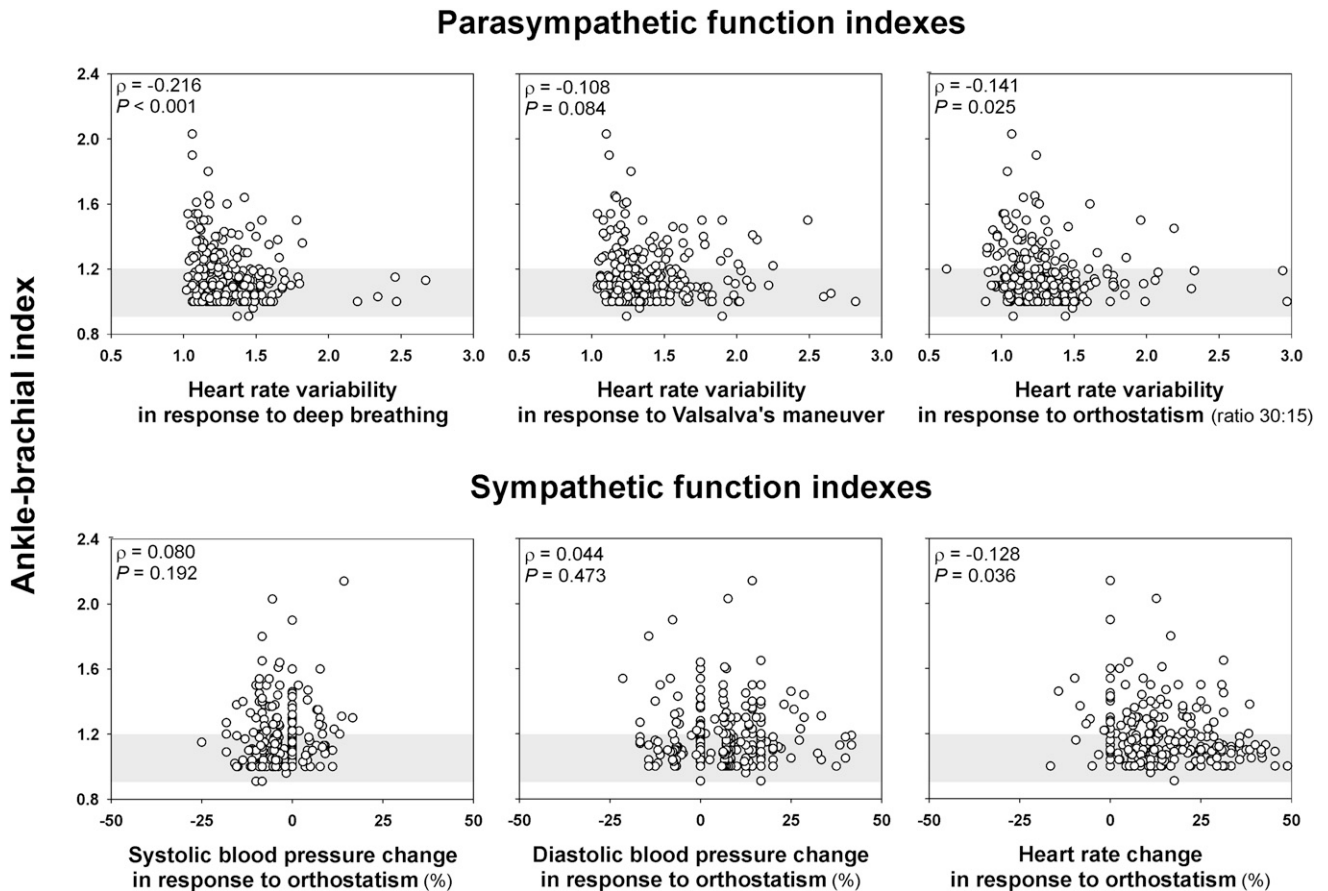
This dual pathogenic pathway from cardiac autonomic dysfunction to AS and atherosclerosis is not only suggested by our findings but is also supported by mounting evidence from others. Chronic hyperglycemia is associated with CAN and vascular disease in both type 2 and type 1 diabetes. In agreement, disorders in autonomic system modulation seem to precede the development of subclinical atherosclerosis—namely, an increase in carotid intima thickness—in patients with type 2 diabetes (26). Furthermore, indices of HR variability are reduced in patients with type 2 diabetes and PAD compared with their counterparts without peripheral disease as measured by ABI (13), even though the positive predictive value for the diagnosis of PAD with this exploration is only ~50% when not followed by any confirmatory tests (5). Also in type 2 diabetes, it has been reported that the cardiovascular autonomic response of patients with a reduced ABI is different from that of their counterparts showing increased ABI, suggesting that by regulating HR and vessel diameter, the autonomic nervous system may contribute to both peripheral atherosclerosis and AS (27). Although it has been less studied than in patients with type 2 diabetes, the association between CAN and atherosclerosis has been reported in patients with type 1 diabetes as well (12, 28). Increased carotid intima thickness was recently related to CAN in individuals with type 1 diabetes (12). Furthermore,

**Table 2. Parasympathetic and Sympathetic Function Tests in Patients With Arterial Stiffness Compared With Their Counterparts With Normal ABI: Influence of Presence of Coexisting Peripheral Arterial Disease on Autonomic Responses**

	Normal ABI (n = 191)	Arterial stiffness (n = 73)	P	Arterial Stiffness		P
				No PAD (n = 45)	PAD (n = 28)	
Parasympathetic function tests, HR variability (%)						
Deep breathing	36 ± 25 [32; 40]	23 ± 21 [18; 28]	<b>&lt;0.001</b>	22 ± 24 [15; 29]	23 ± 16 [17; 29]	0.798
Valsalva maneuver	44 ± 36 [39; 49]	39 ± 32 [32; 46]	0.252	44 ± 35 [33; 55]	32 ± 24 [23; 41]	0.125
Orthostatism (30:15 ratio)	33 ± 34 [28; 39]	24 ± 33 [16; 32]	<b>0.025</b>	32 ± 38 [21; 43]	11 ± 13 [6; 16]	<b>0.001</b>
Sympathetic function tests, percentage of change in response to orthostatism						
Systolic BP, mm Hg	-4 ± 6 [-5; 3]	-2 ± 7 [-3; 0]	0.208	-1 ± 7 [-4; 2]	-5 ± 6 [-7; -3]	0.077
Diastolic BP, mm Hg	7 ± 13 [5; 9]	6 ± 11 [3; 9]	0.932	7 ± 11 [4; 10]	6 ± 12 [1; 11]	0.608
HR, bpm	16 ± 13 [14; 19]	11 ± 11 [8; 14]	<b>&lt;0.001</b>	10 ± 11 [6; 14]	13 ± 11 [9; 17]	0.108

Data are mean ± SD [95%CI]. HR variability is shown as a percentage derived from the HR variability index [(HR variability index - 1) × 100]. The boldface P values denote statistical significant comparisons.

Abbreviations: ABI, ankle-brachial index; BP, blood pressure; bpm, beats per minute; HR, heart variability; PAD, peripheral arterial disease.



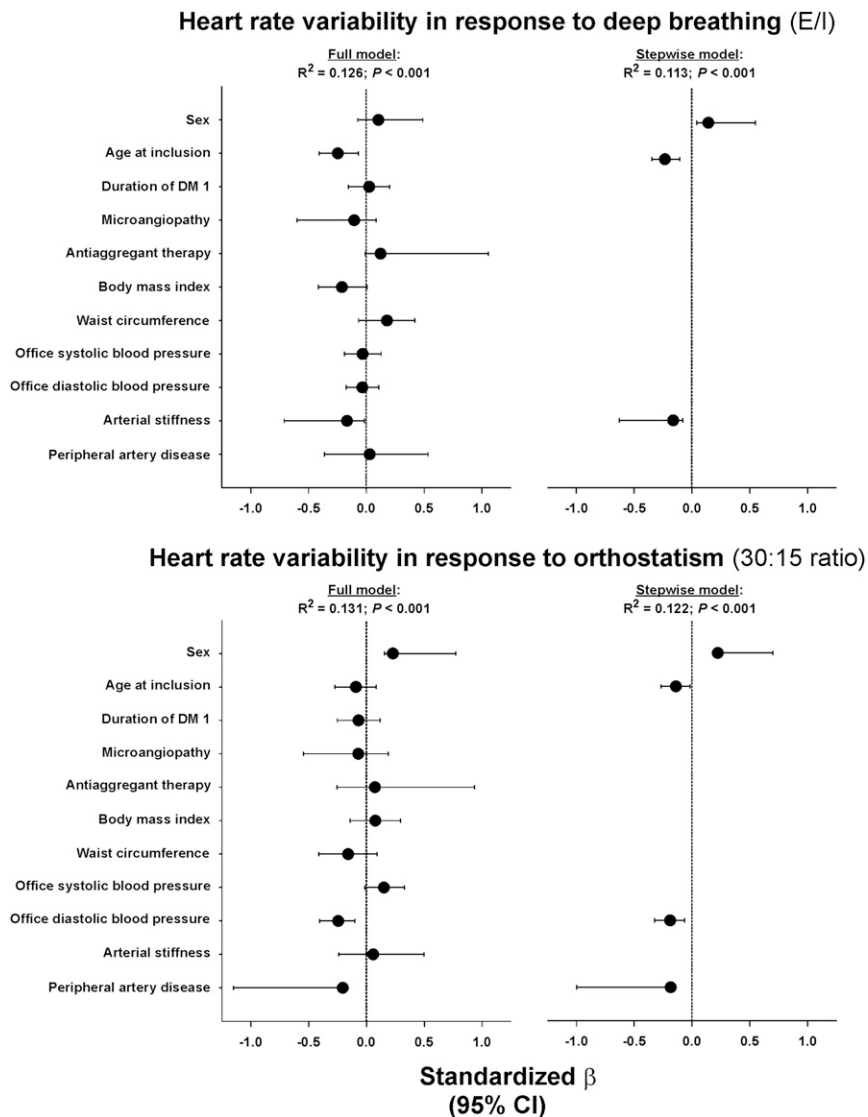
**Figure 3.** Spearman correlations are shown between ABI values and cardiovascular autonomic function measurements of parasympathetic autonomic functions (deep breathing, Valsalva maneuver, and orthostatism indexes, upper panels) and sympathetic autonomic functions (percentage of change in HR and systolic and diastolic blood pressure levels in response to active standing, lower panels). Gray areas indicate the normal range of ABI values (0.91–1.20).

impacts on carotid intima thickness were more negative with the combination of type 1 diabetes and CAN than when the individual impacts of these traits were summed (12). Similarly, the Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes study (28) reported that abnormal HR variability may be linked to the progression of coronary artery calcification, indicating that the presence of autonomic neuropathy contributes to the process of atherosclerosis.

On the other hand, cardioautonomic dysfunction has been found in patients with type 1 diabetes and lower-extremity arterial calcification (29) or markers of AS (8, 30, 31). In a cohort of 144 patients with childhood-onset type 1 diabetes, the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications study (30) showed that CAN, as defined by abnormal HR variability after deep breathing, was prospectively associated with AS, regardless of classic cardiovascular risk factors. Also, the SEARCH Cardiovascular Disease study (8) explored the relationships between HR variability and several measures of AS in young patients with type 1 diabetes and healthy controls using a cross-sectional design. CAN was associated with AS in both the central and peripheral vascular beds

regardless of other classic cardiovascular risk factors, such as BP, lipid profiles, obesity-related parameters, microalbuminuria, and smoking (8). Also recently, abnormal HR variability during paced deep breathing was associated with aortic AS in a large sample of patients with type 1 diabetes from the Steno Diabetes Center, even after adjustments for age, sex, blood pressure, diabetes duration, glycemic control, and renal function (31). However, to the best of our knowledge, although those prior studies agree with our results, none of them considered the influence of aPAD on the association of CAN with peripheral AS we did, despite the frequent coexistence of AS and aPAD in these patients (5).

What putative mechanisms link cardioautonomic dysfunction, atherosclerosis, and AS? The physiologic equilibrium of peripheral vascular beds and heart autonomic innervation is driven by complex interactions, including metabolic processes such as oxidative stress and inflammation (27), which are altered in patients with diabetes. Although CAN may lead to a proinflammatory state (28), other mechanisms such as BP dysregulation may also play a role in the development of AS and



**Figure 4.** Full and stepwise multiple linear regression models were performed to ascertain the main determinants of selected cardiovascular autonomic function tests (dependent variables). The dots show the standardized regression coefficients, and the error bars indicate their 95% CI. R<sup>2</sup> = coefficient of determination. DM1, type 1 diabetes mellitus.

atherosclerosis (4). It is well known that parasympathetic downregulation alters the physiologic fall in BP at night (*i.e.*, the so-called nondipping pattern) from early stages of CAN (32). The relative sympathetic overload and exposure of the vascular bed to increased BP values during sleep in subjects with CAN may, at least in theory, promote vascular injury, AS, and atherosclerosis.

In another way, a decrease in artery elasticity and autonomic dysfunction may develop together from early stages of type 1 diabetes (8, 33); however, their order of appearance and the potential involvement of causality in such an association are unsolved issues. Our present findings indicated an association between CAN and AS that was only explained in part by the coexistence of AS and aPAD. However, our cross-sectional design precluded any conclusions about causality. Theoretically,

AS may contribute to cardiovascular dysautonomia by inducing baroreceptor dysfunction (4); conversely, CAN may favor AS by increasing HR, as an increase in HR *per se* results in arterial stiffening independently of changes in autonomic nervous system activity (34). In addition, cardiovascular dysautonomia may impair the elasticity of the arterial wall by modulating the vascular tone of large vessels (35).

However, instead of being causally related, CAN and AS may develop in parallel as a consequence of aging in the presence of hyperglycemia. Hyperglycemia itself contributes to the atherosclerotic process by several mechanisms, such as endothelial dysfunction and hypercoagulability (36). Chronic hyperglycemia promotes the accumulation of advanced glycation end products that perturb the adhesion properties of the basement membrane of endothelial cells and activate inflammatory cells in the vessel wall, favoring atherogenesis (36). Likewise, advanced glycation end products cause collagen cross-linking within the vascular wall, leading to the loss of collagen elasticity (37) and subsequently to reduction in arterial and myocardial compliance (38).

In any case, our study was not free of limitations. Our series of patients, composed almost entirely of Caucasian Spaniards, may not be representative of racially and ethnically diverse patients with type 1 diabetes. Also, because our

patients were followed up at a highly specialized diabetes unit, their glycemic control was likely better than that of patients attending a general clinical practice, where the prevalence of AS and CAN may be higher than in our study. Moreover, our study design excluded subjects with severe microvascular and macrovascular complications, making it vulnerable to survival bias. Lastly, we did not conduct one of the HR variability tests for the Ewing score (*i.e.*, the BP response to sustained handgrip), and vascular function was not explored thoroughly in the subset of patients with normal ABI results.

In conclusion, in our population of adult patients with type 1 diabetes, peripheral AS identified by ABI was associated with CAN, and this association occurred in a substantial proportion of cases independently of aPAD and other classic cardiovascular risk factors. Because

both AS and CAN have been related to cardiovascular morbidity and mortality, the routine use of a noninvasive method such as the ABI may identify a subset of patients with undiagnosed CAN who could benefit from early and aggressive management of cardiovascular risk factors. We cannot forget that the presence of CAN—often underdetected—is a mandatory diagnosis in all patients with diabetes mellitus (39) and carries risks for cardiovascular events and silent ischemia that are even greater than the risks with smoking and low-density lipoprotein cholesterol level (40, 41). Prospective studies targeting intensive management of cardiovascular risk factors in these patients are warranted.

## Acknowledgments

We thank Ms. Beatriz Dorado Avendaño from the Diagnostic and Therapeutic Facilities of the Department of Endocrinology at the Hospital Universitario Ramón y Cajal for excellent technical help.

**Financial Support:** This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (PI1400649, PI151686, and PIE1600050; to M.L.-R. and H.F.E.-M.) from the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas is also an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, partially supported by the European Regional Development Fund. There were no other sources of funding. The funding organizations played no role in the study design; collection, analysis, and interpretation of data; writing of the report; or the decision to submit the report for publication.

**Clinical Trial Information:** ClinicalTrials.gov no. NCT02910271 (registered 22 September 2016).

**Author Contributions:** L.N.-C. recruited subjects, researched and analyzed data, and wrote the manuscript. M.L.-R. designed the study, recruited subjects, researched and analyzed data, wrote the manuscript, and reviewed/edited the final version. S.R.L., S.A.D., and M.G.U. recruited patients, researched data, and contributed to the discussion. E.F.-D. processed samples and contributed to the discussion. H.F.E.-M. researched data, contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. All the authors approved the final version of the manuscript and take public responsibility for the work as a whole.

**Correspondence and Reprint Requests:** Manuel Luque-Ramírez, PhD, Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar Viejo, Km 9.1, 28034-Madrid, Spain. E-mail: [manuel.luque@salud.madrid.org](mailto:manuel.luque@salud.madrid.org).

**Disclosure Summary:** The authors have nothing to disclose.

## References

- Urbina EM, Wadwa RP, Davis C, Snively BM, Dolan LM, Daniels SR, Hamman RF, Dabelea D. Prevalence of increased arterial stiffness in children with type 1 diabetes mellitus differs by measurement site and sex: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *J Pediatr*. 2010;156(5):731–737.e1.
- Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1800–1809.
- Brewer LC, Chai HS, Bailey KR, Kullo IJ. Measures of arterial stiffness and wave reflection are associated with walking distance in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*. 2007;191(2):384–390.
- Ho CY, Shanahan CM. Medial arterial calcification: an overlooked player in peripheral arterial disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(8):1475–1482.
- Nattero-Chávez L, Redondo López S, Alonso Díaz S, Garnica Ureña M, Fernández-Durán E, Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M. The peripheral atherosclerotic profile in patients with type 1 diabetes warrants a thorough vascular assessment of asymptomatic patients. *Diabetes Metab Res Rev*. 2019;35(2):e3088.
- Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(13):1318–1327.
- Jaiswal M, Divers J, Urbina EM, Dabelea D, Bell RA, Pettitt DJ, Imperatore G, Pihoker C, Dolan LM, Liese AD, Marcovina S, Linder B, Feldman EL, Pop-Busui R; SEARCH for Diabetes in Youth Study Group. Cardiovascular autonomic neuropathy in adolescents and young adults with type 1 and type 2 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth Cohort Study. *Pediatr Diabetes*. 2018;19(4):680–689.
- Jaiswal M, Urbina EM, Wadwa RP, Talton JW, D'Agostino RB Jr, Hamman RF, Fingerlin TE, Daniels SR, Marcovina SM, Dolan LM, Dabelea D. Reduced heart rate variability is associated with increased arterial stiffness in youth with type 1 diabetes: the SEARCH CVD study. *Diabetes Care*. 2013;36(8):2351–2358.
- Dimitropoulos G, Tahrani AA, Stevens MJ. Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2014;5(1):17–39.
- Ewing DJ, Martyn CN, Young RJ, Clarke BF. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care*. 1985;8(5):491–498.
- Liao D, Carnethon M, Evans GW, Cascio WE, Heiss G. Lower heart rate variability is associated with the development of coronary heart disease in individuals with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Diabetes*. 2002;51(12):3524–3531.
- Mala S, Potockova V, Hoskocova L, Pithova P, Brabec M, Kulhankova J, Keil R, Riedlbauchova L, Broz J. Cardiac autonomic neuropathy may play a role in pathogenesis of atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017;134:139–144.
- Canani LH, Copstein E, Pecis M, Friedman R, Leitão CB, Azevedo MJ, Triches C, Rados DR, Moreas RS, Gross JL. Cardiovascular autonomic neuropathy in type 2 diabetes mellitus patients with peripheral artery disease. *Diabetol Metab Syndr*. 2013;5(1):54.
- American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes-2018*. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S13–S27.
- Lend GC, Fowkes FG. The Edinburgh Claudication Questionnaire: an improved version of the WHO/Rose Questionnaire for use in epidemiological surveys. *J Clin Epidemiol*. 1992;45(10):1101–1109.
- American Diabetes Association. 10. Microvascular complications and foot care [published correction appears in *Diabetes Care*. 2017;40(7):986]. *Diabetes Care*. 2017;40(Suppl 1):S88–S98.
- Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C, Fowkes FG, Hiatt WR, Jönsson B, Lacroix P, Marin B, McDermott MM, Norgren L, Pande RL, Preux PM, Stoffers HE, Treat-Jacobson D; American Heart Association Council on

- Peripheral Vascular Disease, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;126(24):2890–2909.
18. Gerhard-Herman M, Gardin JM, Jaff M, Mohler E, Roman M, Naqvi TZ; American Society of Echocardiography Society of Vascular Medicine and Biology. Guidelines for noninvasive vascular laboratory testing: a report from the American Society of Echocardiography and the Society of Vascular Medicine and Biology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2006;19(8):955–972.
  19. Høyer C, Sandermann J, Petersen LJ. The toe-brachial index in the diagnosis of peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2013;58(1):231–238.
  20. Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, Sosenko JM, Ziegler D. Diabetic neuropathy: a position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2017;40(1):136–154.
  21. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbigele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2018;71(6):e13–e115.
  22. Urbina EM, Williams RV, Alpert BS, Collins RT, Daniels SR, Hayman L, Jacobson M, Mahoney L, Mietus-Snyder M, Rocchini A, Steinberger J, McCrindle B; American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Youth Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young. Noninvasive assessment of subclinical atherosclerosis in children and adolescents: recommendations for standard assessment for clinical research: a scientific statement from the American Heart Association [published correction appears in *Hypertension*. 2010;56(3):e36]. *Hypertension*. 2009;54(5):919–950.
  23. Pavy-Le Traon A, Fontaine S, Tap G, Guidolin B, Senard JM, Hanaire H. Cardiovascular autonomic neuropathy and other complications in type 1 diabetes. *Clin Auton Res*. 2010;20(3):153–160.
  24. Newcombe RG. Improved confidence intervals for the difference between binomial proportions based on paired data. *Stat Med*. 1998;17(22):2635–2650.
  25. Velescu A, Clara A, Martí R, Ramos R, Perez-Fernandez S, Marcos L, Grau M, Degano IR, Marrugat J, Elosua R. Abnormally high ankle-brachial index is associated with all-cause and cardiovascular mortality: the REGICOR study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2017;54(3):370–377.
  26. Gottsäter A, Ahlgren AR, Taimour S, Sundkvist G. Decreased heart rate variability may predict the progression of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Clin Auton Res*. 2006;16(3):228–234.
  27. Khalaf K, Jelinek HF, Robinson C, Cornforth DJ, Tarvainen MP, Al-Aubaidy H. Complex nonlinear autonomic nervous system modulation link cardiac autonomic neuropathy and peripheral vascular disease. *Front Physiol*. 2015;6:101.
  28. Rodrigues TC, Ehrlich J, Hunter CM, Kinney GL, Rewers M, Snell-Bergeon JK. Reduced heart rate variability predicts progression of coronary artery calcification in adults with type 1 diabetes and controls without diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2010;12(12):963–969.
  29. Costacou T, Huskey ND, Edmundowicz D, Stolk R, Orchard TJ. Lower-extremity arterial calcification as a correlate of coronary artery calcification. *Metabolism*. 2006;55(12):1689–1696.
  30. Prince CT, Secrest AM, Mackey RH, Arena VC, Kingsley LA, Orchard TJ. Cardiovascular autonomic neuropathy, HDL cholesterol, and smoking correlate with arterial stiffness markers determined 18 years later in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2010;33(3):652–657.
  31. Theilade S, Lajer M, Persson F, Joergensen C, Rossing P. Arterial stiffness is associated with cardiovascular, renal, retinal, and autonomic disease in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(3):715–721.
  32. Spallone V, Maiello MR, Cicconetti E, Pannone A, Barini A, Gambardella S, Menzinger G. Factors determining the 24-h blood pressure profile in normotensive patients with type 1 and type 2 diabetes. *J Hum Hypertens*. 2001;15(4):239–246.
  33. Liatis S, Alexiadou K, Tsiakou A, Makrilakis K, Katsilambros N, Tentolouris N. Cardiac autonomic function correlates with arterial stiffness in the early stage of type 1 diabetes. *Exp Diabetes Res*. 2011;2011:957901.
  34. Failla M, Grappiolo A, Emanuelli G, Vitale G, Fraschini N, Bigoni M, Grieco N, Denti M, Giannattasio C, Mancia G. Sympathetic tone restrains arterial distensibility of healthy and atherosclerotic subjects. *J Hypertens*. 1999;17(8):1117–1123.
  35. Evrard S, Delanaye P, Kamel S, Cristol JP, Cavalier E; SFBC/SN joint working group on vascular calcifications. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin Chim Acta*. 2015;438:401–414.
  36. Haas AV, McDonnell ME. Pathogenesis of cardiovascular disease in diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2018;47(1):51–63.
  37. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens*. 2003;21(1):3–12.
  38. Retnakaran R, Zinman B. Type 1 diabetes, hyperglycaemia, and the heart. *Lancet*. 2008;371(9626):1790–1799.
  39. Spallone V, Ziegler D, Freeman R, Bernardi L, Frontoni S, Pop-Busui R, Stevens M, Kempler P, Hilsted J, Tesfaye S, Low P, Valensi P; Toronto Consensus Panel on Diabetic Neuropathy. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011;27(7):639–653.
  40. Wackers FJ, Young LH, Inzucchi SE, Chyun DA, Davey JA, Barrett EJ, Taillefer R, Wittlin SD, Heller GV, Filipchuk N, Engel S, Ratner RE, Iskandrian AE; Detection of Ischemia in Asymptomatic Diabetics Investigators. Detection of silent myocardial ischemia in asymptomatic diabetic subjects: the DIAD study [published correction appears in *Diabetes Care*. 2005;28(2):504]. *Diabetes Care*. 2004;27(8):1954–1961.
  41. Young LH, Wackers FJ, Chyun DA, Davey JA, Barrett EJ, Taillefer R, Heller GV, Iskandrian AE, Wittlin SD, Filipchuk N, Ratner RE, Inzucchi SE; DIAD Investigators. Cardiac outcomes after screening for asymptomatic coronary artery disease in patients with type 2 diabetes: the DIAD study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2009;301(15):1547–1555.



# Sexual Dimorphism and Sex Steroids Influence Cardiovascular Autonomic Neuropathy in Patients With Type 1 Diabetes

<https://doi.org/10.2337/dc19-1375>

Lía Nattero-Chávez,<sup>1,3</sup>  
Sara Alonso Díaz,<sup>1</sup>  
Lucía Jiménez-Mendiguchia,<sup>2</sup>  
Ana García-Cano,<sup>2</sup>  
Elena Fernández-Durán,<sup>3</sup>  
Beatriz Dorado Avendaño,<sup>1</sup>  
Héctor F. Escobar-Morreale,<sup>1,3,4</sup> and  
Manuel Luque-Ramírez<sup>1,3,4</sup>

The male predominance of cardiovascular disease is overridden by the presence of diabetes, as the sex-related burden of cardiovascular disease increases in postmenopausal women with diabetes (1). Sexual dimorphism in cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) might contribute to these findings (1).

We conducted a cross-sectional study hypothesizing that 1) the prevalence of CAN is different among women and men with type 1 diabetes, 2) such a difference is dependent on the pre- or postmenopausal status of women, and 3) sex steroids show opposite associations with CAN depending on sex.

In this study, we recruited 279 consecutive patients with type 1 diabetes attending our clinic (ClinicalTrials.gov identifier NCT02910271) (2,3). Inclusion and exclusion criteria are detailed elsewhere (2,3). Assuming a global prevalence of CAN of ~30% in our population of patients with type 1 diabetes (2) and setting  $\alpha$  at 0.05 and  $\beta$  at 0.20 for a two-sided test, the inclusion of at least 160 men and 120 women was enough to identify a difference in prevalence among them above 15% ([www.imim.cat/ofertadeserveis/software-public/granmo/](http://www.imim.cat/ofertadeserveis/software-public/granmo/)).

The study protocol conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee of Hospital Universitario Ramón y Cajal (approval date 22 January 2016, protocol ID 464/15). Informed consent was obtained from all participants included in the study. Patients did not receive any economic compensation for their participation.

For all study subjects, we reviewed medical history and clinical parameters of the patients at recruitment. Then, participants were submitted to a physical examination and biochemical assessments. Serum for sex steroid measurements was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until thawed for analysis. Technical characteristics of the assays used for biochemical and hormone measurements have been described in detail elsewhere (2,4). We performed hormone assays at the same time using kits from the same production lots. Cardiovascular autonomic function was assessed using Ewing tests (Monitor OneDx System device; Qmed, Inc., Eatontown, NJ) and by the changes in blood pressure and heart rate after active standing (3).

Data are shown as means  $\pm$  SD or counts (percentage) with 95% CI (lower

limit; upper limit). Patients were classified by age using a cutoff of 45 years. Analysis of discrete variables used logistic binary regressions, and continuous variables were submitted to two-way ANOVA tests. We assessed the association between sex steroids and Ewing tests by Spearman correlations. Statistical significance was set at a  $P$  value  $<0.05$ .

The features of participants are detailed in Table 1. In women, CAN was early/mild in 39 cases (32%) and definitive in 4 (3%). In men, CAN was early/mild in 40 cases (25%) and definitive in 2 (1%). On the whole, the prevalence of CAN was not significantly different between men and women (Table 1). However, it was much more frequent in women  $>45$  years of age than in younger women or in men regardless of age. The odds ratio of CAN was 4.5 (95% CI 1.4; 14.1) in older women compared with older men, 5.4 (95% CI 2.0; 14.7) compared with younger women, and 6.4 (95% CI 2.4; 17.2) compared with younger men.

Men with CAN showed lower total testosterone (T) and T/estradiol ( $\text{E}_2$ ) ratios than those without CAN. T and T/ $\text{E}_2$  ratios were directly correlated with Ewing scores. Women with CAN had higher T/ $\text{E}_2$  ratios than those without CAN. A

<sup>1</sup>Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Diabetes, Obesity, and Human Reproduction Research Group, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Centro de Investigación Biomédica en Red Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain

<sup>4</sup>University of Alcalá, Madrid, Spain

Corresponding author: Manuel Luque-Ramírez, [manuel.luque@salud.madrid.org](mailto:manuel.luque@salud.madrid.org)

Received 11 July 2019 and accepted 6 August 2019

H.F.E.-M. and M.L.-R. contributed equally to this work.

© 2019 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. More information is available at <http://www.diabetesjournals.org/content/license>.



**Table 1—Demographic characteristics, clinical features, and sex steroid profile of the whole group of study participants and as a function of sex and age**

Variable	All patients (n = 279)	Women			Men		
		All (n = 121)	≤45 yrs (n = 99)	>45 yrs (n = 22)	All (n = 158)	≤45 yrs (n = 124)	>45 yrs (n = 34)
Age (years) <sup>b</sup>	36 ± 12 [35; 37]	36 ± 13 [34; 38]	32 ± 9 [30; 34]	56 ± 7 [53; 59]	36 ± 11 [34; 38]	32 ± 8 [31; 33]	51 ± 5 [49; 53]
DKA at diagnosis	121 (43) [38; 49]	52 (43) [35; 52]	42 (42) [33; 52]	10 (46) [27; 65]	69 (44) [36; 52]	56 (45) [27; 54]	13 (38) [24; 55]
CSII <sup>a</sup>	55 (20) [16; 25]	31 (26) [19; 34]	25 (25) [18; 35]	6 (27) [13; 48]	24 (15) [10; 22]	17 (14) [9; 21]	7 (21) [10; 37]
Duration of diabetes (years) <sup>bc</sup>	20 ± 11 [19; 21]	20 ± 11 [19; 21]	16 ± 8 [14; 18]	35 ± 8 [31; 39]	20 ± 11 [18; 22]	17 ± 10 [15; 19]	29 ± 6 [27; 31]
Never smokers	167 (60) [54; 65]	72 (41) [51; 68]	64 (65) [55; 73]	8 (36) [20; 57]	95 (60) [52; 67]	75 (61) [52; 69]	20 (59) [42; 74]
Antiaggregant therapy <sup>bc</sup>	21 (8) [5; 11]	10 (8) [5; 15]	2 (2) [1; 7]	8 (36) [20; 57]	11 (7) [4; 12]	2 (2) [0; 6]	9 (27) [15; 43]
Statin therapy <sup>abc</sup>	78 (28) [23; 34]	26 (22) [16; 31]	11 (11) [6; 19]	15 (68) [47; 84]	52 (33) [26; 41]	28 (23) [16; 31]	24 (71) [54; 83]
Antihypertensive therapy <sup>bc</sup>	42 (15) [11; 20]	16 (14) [9; 21]	4 (4) [2; 10]	12 (55) [35; 73]	26 (17) [12; 23]	13 (11) [6; 17]	13 (38) [24; 55]
Oral contraception treatment	11 (4) [2; 7]	11 (10) [6; 17]	11 (11) [6; 19]	— —	— —	— —	— —
Microangiopathy <sup>b</sup>	71 (25) [21; 31]	36 (30) [22; 38]	20 (20) [14; 29]	16 (73) [52; 87]	35 (22) [16; 29]	23 (19) [13; 26]	12 (35) [22; 52]
Coronary heart disease <sup>b</sup>	6 (2) [1; 5]	4 (3) [1; 8]	1 (1) [1; 6]	3 (14) [5; 33]	2 (1) [0; 5]	1 (1) [0; 4]	1 (3) [1; 2]
Peripheral artery disease	35 (15) [9; 17]	13 (11) [6; 18]	6 (6) [3; 13]	7 (32) [16; 53]	22 (14) [9; 20]	17 (14) [9; 21]	6 (18) [8; 34]
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	25 ± 4 [25; 26]	24 ± 4 [23; 25]	24 ± 4 [23; 25]	26 ± 3 [25; 27]	25 ± 4 [24; 26]	25 ± 4 [24; 26]	26 ± 3 [25; 27]
Obesity	30 (11) [8; 15]	11 (9) [5; 16]	7 (7) [4; 14]	4 (18) [7; 39]	19 (12) [8; 18]	15 (12) [8; 19]	4 (12) [5; 27]
Waist circumference (cm) <sup>abc</sup>	84 ± 12 [83; 85]	78 ± 11 [76; 80]	76 ± 10 [74; 78]	85 ± 12 [81; 90]	89 ± 11 [87; 91]	88 ± 11 [86; 90]	93 ± 9 [89; 96]
Office systolic BP (mmHg) <sup>abc</sup>	120 ± 16 [118; 122]	114 ± 16 [111; 117]	110 ± 12 [108; 112]	133 ± 21 [124; 142]	124 ± 14 [122; 126]	122 ± 13 [120; 124]	130 ± 16 [124; 136]
Office diastolic BP (mmHg) <sup>a</sup>	72 ± 10 [71; 73]	69 ± 9 [67; 71]	69 ± 8 [67; 71]	70 ± 13 [64; 76]	73 ± 11 [71; 75]	72 ± 11 [70; 74]	77 ± 8 [74; 79]
Heart rate (bpm) <sup>c</sup>	74 ± 12 [73; 75]	77 ± 12 [75; 79]	78 ± 12 [76; 80]	72 ± 11 [67; 77]	72 ± 12 [70; 74]	71 ± 12 [69; 73]	76 ± 11 [72; 80]
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> ) <sup>ab</sup>	95 ± 18 [93; 97]	89 ± 18 [86; 92]	91 ± 18 [87; 95]	79 ± 13 [73; 85]	97 ± 17 [94; 100]	99 ± 17 [96; 102]	88 ± 17 [82; 94]
HbA <sub>1c</sub> (%)	7.6 ± 1.3 [7.5; 7.8]	7.7 ± 1.4 [7.5; 8.0]	7.6 ± 1.4 [7.3; 7.9]	7.8 ± 1.0 [7.4; 8.2]	7.5 ± 1.3 [7.3; 7.7]	7.5 ± 1.2 [7.3; 7.7]	7.3 ± 1.4 [7.1; 8.1]
HbA <sub>1c</sub> (mmol/mol)	60 ± 14 [58; 62]	61 ± 15 [58; 64]	60 ± 15 [57; 63]	62 ± 11 [57; 67]	58 ± 15 [56; 60]	58 ± 14 [56; 61]	56 ± 16 [50; 62]
Total cholesterol (mmol/L)	4.4 ± 0.7 [4.3; 4.5]	4.6 ± 0.7 [4.5; 4.7]	4.6 ± 0.7 [4.5; 4.7]	4.5 ± 0.8 [4.1; 4.9]	4.3 ± 0.7 [4.2; 4.4]	4.3 ± 0.7 [4.2; 4.4]	4.5 ± 0.6 [4.3; 4.7]
HDL cholesterol (mmol/L) <sup>a</sup>	1.5 ± 0.4 [1.5; 1.6]	1.6 ± 0.3 [1.6; 1.7]	1.6 ± 0.3 [1.5; 1.7]	1.6 ± 0.3 [1.5; 1.7]	1.4 ± 0.3 [1.4; 1.5]	1.3 ± 0.3 [1.3; 1.4]	1.4 ± 0.4 [1.3; 1.5]
LDL cholesterol (mmol/L)	2.6 ± 0.6 [2.5; 2.7]	2.6 ± 0.5 [2.5; 2.7]	2.6 ± 0.5 [2.5; 2.7]	2.5 ± 0.6 [2.4; 2.7]	2.6 ± 0.6 [2.5; 2.7]	2.5 ± 0.7 [2.4; 2.6]	2.7 ± 0.5 [2.5; 2.9]
Triglycerides (mmol/L)	0.9 ± 0.4 [0.9; 1.0]	0.8 ± 0.4 [0.7; 0.9]	0.8 ± 0.4 [0.7; 0.9]	0.8 ± 0.2 [0.7; 0.9]	0.9 ± 0.4 [0.8; 1.0]	0.9 ± 0.4 [0.8; 1.0]	0.9 ± 0.3 [0.8; 1.0]
FSH (IU/L) <sup>abc*</sup>	9 ± 19 [7; 11]	17 ± 27 [12; 22]	6 ± 7 [4.4; 7.4]	59 ± 36 [43; 75]	4 ± 2 [4; 4]	3 ± 2 [3; 3]	4 ± 2 [3; 5]
LH (IU/L) <sup>abc*</sup>	7 ± 8 [6; 8]	11 ± 11 [9; 13]	7 ± 8 [6; 9]	25 ± 10 [21; 29]	4 ± 2 [4; 4]	4 ± 2 [4; 4]	4 ± 2 [3; 5]

Continued on p. e3

Table 1—Continued

Variable	All patients (n = 279)	Women			Men		
		All (n = 121)	≤45 yrs (n = 99)	>45 yrs (n = 22)	All (n = 158)	≤45 yrs (n = 124)	>45 yrs (n = 34)
Total T (nmol/L) <sup>abc*</sup>	14.0 ± 11.7 [12.6; 15.4]	1.6 ± 0.9 [1.4; 1.8]	1.6 ± 0.8 [1.4; 1.8]	1.2 ± 0.7 [0.9; 1.5]	22.6 ± 7.0 [21.5; 23.7]	23.3 ± 7.2 [22.0; 24.6]	20.0 ± 5.4 [18.0; 21.0]
Total E <sub>2</sub> (pmol/L) <sup>abc*</sup>	231 ± 294 [196; 266]	416 ± 392 [345; 487]	461 ± 373 [382; 540]	234 ± 410 [52; 416]	103 ± 40 [97; 109]	28 ± 11 [26; 30]	27 ± 9 [24; 30]
Total T/ E <sub>2</sub> molar ratio <sup>abc*</sup>	146 ± 138 [129; 163]	10 ± 13 [8; 12]	7 ± 8 [5; 8]	22 ± 21 [13; 31]	242 ± 99 [226; 258]	247 ± 104 [229; 266]	224 ± 80 [196; 252]
SHBG (nmol/L) <sup>abc*</sup>	69 ± 41 [64; 74]	94 ± 50 [85; 103]	91 ± 51 [80; 102]	107 ± 42 [88; 126]	51 ± 21 [48; 54]	49 ± 20 [45; 53]	60 ± 22 [52; 68]
Calculated free T (pmol/L) <sup>abc*</sup>	233 ± 205 [208; 258]	16 ± 14 [14; 19]	17 ± 15 [14; 20]	11 ± 7 [8; 14]	384 ± 124 [365; 404]	409 ± 124 [387; 431]	292 ± 71 [267; 317]
Calculated free E <sub>2</sub> (pmol/L) <sup>bc*</sup>	3.7 ± 4.1 [3.2; 4.2]	5.8 ± 5.7 [4.8; 6.8]	6.5 ± 5.3 [5.4; 7.6]	3.1 ± 6.1 [0.4; 5.8]	2.2 ± 1.0 [2.0; 2.4]	0.6 ± 0.3 [0.6; 0.7]	1.9 ± 0.7 [1.7; 2.2]
Calculated free T/E <sub>2</sub> molar ratio <sup>abc*</sup>	116 ± 110 [103; 129]	7 ± 8 [6; 8]	5 ± 5 [4; 6]	14 ± 13 [8; 20]	193 ± 79 [181; 205]	200 ± 83 [185; 215]	169 ± 58 [135; 183]
Prevalence of CAN <sup>bc</sup>	85 (30.5) [25.4; 36.1]	43 (35.5) [27.6; 44.4]	28 (28.3) [20.4; 37.8]	15 (68.2) [47.3; 83.6]	42 (26.6) [20.3; 34.0]	31 (25.0) [18.2; 33.3]	11 (32.4) [19.1; 49.2]

Continuous and discrete variables are shown as mean ± SD and N (%), respectively. Numbers below those statistics denote 95% CI [lower limit; upper limit]. BP, blood pressure; bpm, beats per minute; CSII, continuous subcutaneous insulin infusion; DKA, diabetes ketoacidosis; eGFR, estimated glomerular filtration rate; FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone; SHBG, sex hormone binding globulin. Comparisons among groups were performed by two-way ANOVA or binary logistic regression analyses. <sup>a</sup>Significant differences between men and women. <sup>b</sup>Significant differences among older and younger patients independently of sex. <sup>c</sup>Statistically significant interaction between sex and age-group. \*11 women taking hormonal contraceptives were excluded.

significant correlation was observed between free T and orthostatism test values.

According to our findings, women with type 1 diabetes >45 years of age show a marked increase in the risk of suffering from CAN with respect to other subgroups of patients. In agreement with our previous hypothesis (5), we also observed that circulating T and its relation to E<sub>2</sub> may have opposite associations with CAN in men and women. The higher concentrations of T in our women with CAN suggest that androgen excess might be associated with autonomic dysfunction, although the T/E<sub>2</sub> ratio increase largely relied on the profound decrease of E<sub>2</sub> found in older women. Conversely, T was positively associated with heart rate variability in men, and those men with CAN had lower T levels.

Nonetheless, our older women also had more cardiovascular risk factors than the other study subgroups. Whether this fact was related only to the estrogen decline of menopause is unclear (1). We have to bear in mind that these women also had a longer duration of diabetes, which is one of the most important predictors for cardiovascular outcomes. However, older men also had a longer duration of diabetes but did not show an increased prevalence of CAN.

If confirmed in other populations, the very large prevalence of CAN among postmenopausal women with type 1 diabetes in our study, despite the obvious limitations of its relatively small sample size and observational design, would make CAN screening mandatory for the accurate stratification of their cardiovascular risk. The consequences of the management of male hypogonadism and female hyperandrogenism in patients with type 1 diabetes merit further research.

**Acknowledgments.** The authors thank Belén Arias Zamorano from the Diagnostic and Therapeutic Facilities of the Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitario Ramón y Cajal, for her excellent technical help. **Funding.** This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (PI1400649, PI151686, and PIE1600050). CIBERDEM is also an initiative of Instituto de Salud Carlos III, partially supported by the European Regional Development Fund. The funding organization played no role in the study design; collection, analysis, and interpretation of data; the writing of the report; or the decision to submit the report for publication. **Duality of Interest.** No potential conflicts of interest relevant to this article were reported. **Author Contributions.** L.N.-C. recruited subjects, researched and analyzed data, and wrote the manuscript. H.F.E.-M. and M.L.-R. designed

the study, researched and analyzed data, contributed to the discussion, and reviewed and edited the final version. S.A.D. recruited patients, researched data, and contributed to the discussion. L.J.-M. and A.G.-C. processed and assayed samples and contributed to the discussion. E.F.-D. and B.D.A. recruited patients, processed samples, and contributed to the discussion. All the authors approved the final version of the manuscript. L.N.-C. and M.L.-R. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Prior Presentation.** A preliminary report of this study was presented in abstract form at the 79th Scientific Sessions of the American Diabetes Association, San Francisco, CA, 7–11 June 2019.

## References

1. Regensteiner JG, Golden S, Huebschmann AG, et al.; American Heart Association Diabetes Committee of the Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Functional Genomics and Translational Biology, and Council on Hypertension. Sex differences in the cardiovascular consequences of diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2015;132:2424–2447
2. Nattero-Chávez L, Redondo López S, Alonso Díaz S, et al. The peripheral atherosclerotic profile in patients with type 1 diabetes warrants a thorough vascular assessment of asymptomatic patients. *Diabetes Metab Res Rev* 2019;35:e3088
3. Nattero-Chávez L, Redondo López S, Alonso Díaz S, et al. Association of cardiovascular autonomic dysfunction with peripheral arterial

- stiffness in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104:2675–2684
4. Luque-Ramírez M, Jiménez-Mendiguchia L, García-Cano A, et al. Certified testosterone immunoassays for hyperandrogenaemia. *Eur J Clin Invest* 2018;48:e13029
5. Escobar-Morreale HF, Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JI, Luque-Ramírez M. The striking similarities in the metabolic associations of female androgen excess and male androgen deficiency. *Hum Reprod* 2014;29:2083–2091



Available online at  
**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
www.em-consulte.com



## Research letter

### **Circulating soluble klotho is not associated with an elevated ankle-brachial index as a surrogate marker of early arterial calcification in patients with type 1 diabetes mellitus and no evidence of renal dysfunction**

#### **Introduction**

The conventional view of peripheral artery disease has evolved to now consider it a continuous pathway from arterial calcification to endoluminal atherosclerosis. In agreement with this idea, arterial stiffness secondary to vascular calcification is a strong independent predictor of cardiovascular (CV) events and all-cause mortality.

The *KL* gene encodes klotho, a 130-kDa single-pass transmembrane protein that is also an obligatory co-receptor of the phosphaturic hormone fibroblastic growth factor (FGF)-23 [1], expressed in distal renal tubules and parathyroid glands. Its extracellular domain can be cleaved, resulting in its presence in blood as a soluble protein (s-klotho) and suggested to protect against endothelial dysfunction by increasing nitric oxide availability. Klotho deficiency is associated with vascular disorders, including medial arterial calcification (MAC) [2]. Cross-sectional studies of chronic kidney disease (CKD), considered a state of accelerated ageing, have shown reduced s-klotho levels in all stages of disease [3]. In addition, s-klotho reduction may serve as a biomarker of premature diabetic nephropathy.

Increased arterial stiffness has been documented in young patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) [4]. Low s-klotho concentrations associated with early predictors of atherosclerosis and endothelial dysfunction have been also reported in these patients.

To provide new insights into the pathogenesis of MAC in T1DM, our present study aimed to address whether an association between circulating s-klotho and asymptomatic peripheral MAC is present in patients with T1DM and normal renal function.

#### **Material and methods**

##### *Study population*

This cross-sectional study involved 164 adult patients with T1DM, all of whom were aged < 30 years at the time of diagnosis, recruited consecutively at our outpatient clinic. Exclusion criteria included:

- ankle-brachial index (ABI) < 0.9;
- symptomatic claudication (by Edinburgh Claudication Questionnaire);

- previous diagnosis of peripheral artery disease, diabetic foot or leg amputation and;
- previous diagnosis of CKD, defined by the four-variable Modification of Diet in Renal Disease (MDRD-4) equation as an estimated glomerular filtration rate (eGFR) < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, renal transplantation or renal replacement therapy. The presence of albuminuria < 300 mg/g was allowed.

Of our 164 study patients, 54 had MAC, defined as an ABI > 1.2, and were compared with 110 patients of similar gender distribution, age and eGFR, but presenting with normal ABI values (range: 0.9–1.2).

The study was approved by the local ethics committee, and all patients gave their written informed consent.

##### *Clinical and anthropometric variables*

The patients' medical records were reviewed for current medications and parameters related to their T1DM, CV risk factors, and coronary heart and cerebrovascular disease. Smoking status was also recorded. Anthropometric evaluation, which included weight, height, waist and hip circumferences, and body fat percentage in relation to total body weight, was performed by bioelectrical impedance (TBF-300A Body Composition Analyzer, Tanita Corporation, Tokyo, Japan).

##### *Sampling*

Venous blood samples were obtained after an overnight fast and a 24-h period of abstinence from alcohol and vigorous physical exercise. Analytical assessment of renal function (plasma creatinine, eGFR, urinary albumin-to-creatinine ratio in a random spot urine collection) was performed. Blood parameters also included fasting glucose, lipid profile, and urea, total protein, albumin, parathormone, alkaline phosphatase, HbA<sub>1c</sub> and vitamin D concentrations.

For s-klotho measurements, blood samples were left to clot for 1 h, then centrifuged at 1500 × g for 10 min and stored at –80 °C until assayed in duplicate, using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits of the same manufacturer and assay lot (catalogue code: CSB-E13235 h, Cusabio Biotech Co., Ltd., Hubei, China). The lower limit of detection was 0.039 ng/mL, and the intra- and interassay coefficients of variation were < 8% and < 10%, respectively. The median s-klotho concentration for the entire study population was determined, and patients were then classified according to this value into high s-klotho (HsK) and low s-klotho (LsK) subgroups.

##### *Assessment of peripheral vascular disease and MAC*

Pedal pulses were examined in both lower limbs, and those from the dorsalis pedis and tibialis posterior arteries were

<https://doi.org/10.1016/j.diabet.2018.01.009>  
1262-3636/© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

categorized as present, weak or absent. The lower extremities were also examined for signs of chronic circulatory insufficiency.

Peripheral MAC was assessed by bilateral ABI, using a Minidop ES 8-MHz sonography device (Hadeco, Inc., Kanagawa, Japan). The principal investigator (L.N.-C.) was trained by a consultant vascular surgeon at our centre before starting the present study. ABI was calculated by dividing the systolic blood pressure (SBP) obtained from the tibialis posterior and dorsalis pedis arteries of the left and right ankles by the highest SBP measurements obtained from both brachial arteries, and categorized as normal (0.90–1.20), mild-to-severe obstruction (< 0.90) or not able to compress artery, which is strongly suggestive of MAC (> 1.20). The highest ABI result was used for calculating correlations. All vascular function tests were conducted after overnight fasting to avoid the possible interference of a postprandial surge in glucose levels.

#### Sample size calculation

To the best of our knowledge, no published study has used a design like ours. Keles et al. [5] reported that, in patients with T1DM, a mean s-klotho difference of 100 pg/mL (pooled deviation of 92 pg/mL) was associated with significant differences in carotid intima-media thickness. Given the estimated 33% prevalence of MAC in our study population [6], the inclusion of 110 patients without MAC and 54 with MAC provided a 90% power to detect differences in fasting s-klotho concentrations in  $\geq 50\%$  of those reported [5].

#### Statistical analysis

Data were expressed as means  $\pm$  SD (range) or raw numbers (percentages). Normality of continuous variables was assured as necessary for logarithmic transformation or Templeton's two-step transformation method, and checked by Kolmogorov–Smirnov tests.

Nominal (categorical) variables were compared using  $\chi^2$  or Fisher's exact tests, and continuous variables by *t* or Mann–Whitney *U* tests, as appropriate. Pearson's correlation analysis was used to evaluate the relationship between ABI and s-klotho. A multiple linear stepwise regression model was used to investigate the main determinants of s-klotho levels among those variables with a *P* value < 0.10 in the correlation analyses and in comparisons of the HsK and LsK subgroups. Statistical significance was set at a *P* value < 0.05.

#### Results

Patients' characteristics are summarized in Table 1. Those with MAC had higher office SBP and diastolic blood pressure (DBP), larger waist circumferences and longer duration of disease than those showing normal ABIs. The percentage of subjects with microangiopathy was also higher among patients with MAC. Also, despite having similar total calcium and vitamin D concentrations, patients with MAC had lower phosphorus and higher parathormone concentrations than those with normal ABIs.

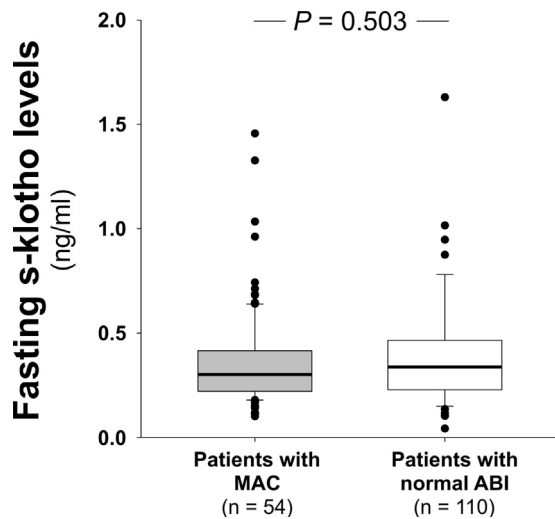
However, s-klotho levels did not differ among T1DM patients with or without MAC (Fig. 1), and the median s-klotho level for the whole of the study population was 0.309 ng/mL. Patients in the HsK subgroup were more frequently women and older, had longer durations of disease, and higher parathormone and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol concentrations. However, HsK and LsK subgroups showed no significant differences in ABI (Table 1). In addition, s-klotho correlated with age (*r*: 0.183, *P* = 0.019), T1DM duration (*r*: 0.224, *P* = 0.004), office DBP (*r*: 0.168, *P* = 0.032) and parathormone levels (*r*: 0.250, *P* = 0.004), but not with ABI (*r*: 0.086, *P* = 0.271).

Gender, age, duration of T1DM, DBP, parathormone, HDL cholesterol and C-reactive protein concentrations were introduced as independent variables into the regression analysis. The stepwise model (*R*<sup>2</sup>: 0.104; *P* = 0.002) retained only age ( $\beta$ : 0.005, 95%

**Table 1**  
Demographic and clinical characteristics of study patients by presence or absence of medial arterial calcification, and by high (HsK) and low (LsK) soluble klotho (s-klotho) subgroups according to the median s-klotho concentration of the whole study population.

Variable	Medial arterial calcification				Subgroups		
	Whole group ( <i>n</i> = 164)	Yes ( <i>n</i> = 54)	No ( <i>n</i> = 110)	<i>P</i>	HsK ( <i>n</i> = 83)	LsK ( <i>n</i> = 81)	<i>P</i>
Women/men (%)	41/59	32/68	45/55	0.087	49/51	31/69	0.018
Age (years)	37 $\pm$ 10	39 $\pm$ 10	37 $\pm$ 10	0.249	40 $\pm$ 9	35 $\pm$ 11	0.005
Duration of diabetes (years)	21 $\pm$ 9	23 $\pm$ 8	20 $\pm$ 9	0.036	23 $\pm$ 9	19 $\pm$ 8	0.006
Microangiopathy (%)	22	32	17	0.039	27	16	0.166
Albuminuria < 300 mg/g (%)	6	2	13	0.006	6	5	0.523
Macroangiopathy (%)	1	0	1	0.369	2	0	0.162
Smoking habit (%)	46	13	32	0.319	40	53	0.103
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25 $\pm$ 4	26 $\pm$ 4	25 $\pm$ 4	0.126	26 $\pm$ 4	25 $\pm$ 3	0.150
Waist circumference (cm)	85 $\pm$ 12	89 $\pm$ 13	83 $\pm$ 12	0.002	85 $\pm$ 12	85 $\pm$ 12	0.900
Body mass fat (%)	24 $\pm$ 9	24 $\pm$ 8	24 $\pm$ 9	0.655	26 $\pm$ 4	25 $\pm$ 3	0.150
Systolic BP (mmHg)	118 $\pm$ 15	124 $\pm$ 14	115 $\pm$ 14	< 0.001	118 $\pm$ 14	118 $\pm$ 15	0.971
Diastolic BP (mmHg)	71 $\pm$ 10	75 $\pm$ 13	70 $\pm$ 9	0.003	73 $\pm$ 11	70 $\pm$ 9	0.056
Heart rate (bpm)	74 $\pm$ 12	74 $\pm$ 12	75 $\pm$ 11	0.903	75 $\pm$ 12	73 $\pm$ 11	0.182
Ankle-brachial index	1.19 $\pm$ 0.21	1.09 $\pm$ 0.64	1.41 $\pm$ 0.23	< 0.001	1.22 $\pm$ 0.23	1.17 $\pm$ 0.17	0.212
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	93 $\pm$ 16	92 $\pm$ 17	93 $\pm$ 16	0.643	92 $\pm$ 17	94 $\pm$ 16	0.319
Creatinine ( $\mu$ mol/L)	76 $\pm$ 22	80 $\pm$	73 $\pm$ 11	0.994	66 $\pm$ 25	65 $\pm$ 11	0.424
Corrected calcium (mmol/L)	2.3 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.3	0.996	2.3 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.2	0.360
Phosphorus (mmol/L)	1.1 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	0.047	1.1 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	0.342
Parathormone (ng/L)	49 $\pm$ 24	58 $\pm$ 36	45 $\pm$ 15	0.005	53 $\pm$ 29	45 $\pm$ 15	0.030
25(OH)D (nmol/L)	57 $\pm$ 25	57 $\pm$ 28	55 $\pm$ 25	0.650	55 $\pm$ 27	57 $\pm$ 20	0.796
1,25(OH)2D (pmol/L)	148 $\pm$ 101	161 $\pm$ 104	143 $\pm$ 101	0.356	146 $\pm$ 94	153 $\pm$ 109	0.701
hsCRP (nmol/L)	28 $\pm$ 23	23 $\pm$ 24	29 $\pm$ 23	0.245	24 $\pm$ 18	32 $\pm$ 27	0.052
HbA <sub>1c</sub> levels (%)	7.5 $\pm$ 1.2	7.3 $\pm$ 1.3	7.6 $\pm$ 1.1	0.166	7.5 $\pm$ 1.2	7.4 $\pm$ 1.1	0.403
Total cholesterol (mmol/L)	4.6 $\pm$ 2.2	4.5 $\pm$ 0.7	4.7 $\pm$ 2.7	0.464	4.9 $\pm$ 3.0	4.3 $\pm$ 0.7	0.078
LDL cholesterol (mmol/L)	2.6 $\pm$ 0.6	3.1 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.6	0.735	2.7 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.6	0.087
HDL cholesterol (mmol/L)	1.5 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.4	0.643	1.6 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.4	0.005
Triglycerides (mmol/L)	0.8 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.3	0.351	0.8 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.3	0.801

BP: blood pressure; eGFR: estimated glomerular filtration rate; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D; 1,25(OH)2D: 1,25-dihydroxyvitamin D; hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein; HDL/LDL: high-density/low-density lipoprotein.



**Fig. 1.** Serum soluble klotho (s-klotho) levels in patients with medial arterial calcification (MAC: grey box) compared with their counterparts presenting with a normal ankle-brachial index (ABI: white box). Data are means  $\pm$  SEM.

confidence interval [CI]: 0.000–0.009;  $P = 0.048$ ) and, in particular, circulating parathormone ( $\beta$ : 0.335, 95% CI: 0.097–0.572;  $P = 0.006$ ) as significant predictors of variability of s-klotho concentrations.

## Discussion

Our study indicates that circulating s-klotho is not associated with MAC in patients with T1DM and conserved renal function. However, its levels do correlate with age, duration of disease, and office DBP and parathormone concentrations, with the latter being the main determinant of its variability.

Although circulating s-klotho is an independent biomarker of arterial stiffness in non-diabetes patients, Inci et al. [7] failed to confirm such an association in patients with DM. The evidence for a putative CV-protective role of s-klotho in patients with T1DM is even more limited, as two previous studies addressing the issue in patients with no renal impairment yielded conflicting results [5,8].

The kidney is the main contributor to circulating s-klotho, and renal *KL* gene expression is drastically reduced in CKD. However, while the association between renal function and s-klotho has clearly been established, further studies are nonetheless needed to determine whether s-klotho is related to CV disease in DM. As microangiopathic complications increase CV mortality in these patients, an abnormal klotho axis might be participating in the association of renal injury with CV disease.

An unbalanced calcium–phosphate metabolism also contributes to the burden of CV morbidity in CKD, and circulating s-klotho may be inversely related to age in patients with CKD. In our young patients, s-klotho positively correlated with age, duration of disease and parathormone concentrations. The correlation with duration of disease might be explained by the hypothesis that *KL* overexpression is an early defensive mechanism against premature vascular ageing as a result of chronic hyperglycaemic insults, a mechanism that would be lost in later progression to albuminuric stages of diabetes-related kidney disease [9]. Of note, in our present study population, the main determinant of s-klotho was circulating parathormone concentrations. Reduced FGF-23 levels most likely underlie this finding, as FGF-23 inhibits parathormone secretion, and FGF-23 binding to klotho protein leads to its cleavage and presence in the circulation [1].

In animal models of spontaneous hypertension, the overexpression of klotho reduces BP [10], and renal *KL* expression is

decreased in many experimental models of circulatory stress, including hypertensive/diabetic rats. Nevertheless, our present study found a positive correlation between s-klotho and DBP. To address this apparent discrepancy, it may be speculated that the increase in s-klotho concentrations with increasing DBP may represent both a compensatory mechanism and an s-klotho-resistant state.

Among the strengths of our study, our findings highlight the paucity of previous data on s-klotho and vascular dysfunction in patients at risk, such as those with T1DM. Also, our study cohort was well-characterized and homogeneous, with conserved renal function, and had attended a single diabetes unit. Finally, our sample size was rigorously calculated, thereby ruling out any type II errors (false negatives) that might underlie our results. On the other hand, the acknowledged weaknesses include the fact that causal relationships cannot be inferred from our data because of the cross-sectional study design, that increased ABIs, especially modest elevations, may not always translate to MAC, and that patients with renal dysfunction were specifically excluded and, thus, our findings cannot be extrapolated to patients with renal disease.

## Conclusion

Serum s-klotho does not appear to play a significant role in the development of MAC in patients with T1DM and without renal dysfunction. Further prospective studies are now needed to elucidate the putative contribution of the FGF-23–klotho system to atherosclerosis in such patients.

## Role of the funding source

This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (PI1400649, PI151686 and PIE1600050) of the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. M.L.-R. also had a local grant for clinical research from the Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). CIBERDEM is an initiative of Instituto de Salud Carlos III partially supported by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). The reagents used to measure s-klotho levels were partly supported by a grant from Laboratorios del Dr. Esteve, S.A.U. There were no other sources of funding. The funding organizations, including Laboratorios del Dr. Esteve S.A.U, played no role in the study design, the collection, analysis and interpretation of data, writing of the report or decision to submit the report for publication.

## Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

## Acknowledgments

We thank Ms Beatriz Dorado Avendaño from the Diagnostic and Therapeutic Facilities of the Department of Endocrinology of Hospital Universitario Ramón y Cajal for her excellent technical help.

## References

- [1] Erben RG. Update on FGF23 and Klotho signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2016;432:56–65.
- [2] Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Griffith C, Kuro-o M, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:124–36.

- [3] Kim HR, Nam BY, Kim DW, Kang MW, Han JH, Lee MJ, et al. Circulating alpha-klotho levels in CKD and relationship to progression. *Am J Kidney Dis* 2013;61:899–909.
- [4] Urbina EM, Wadwa RP, Davis C, Snively BM, Dolan LM, Daniels SR, et al. Prevalence of increased arterial stiffness in children with type 1 diabetes mellitus differs by measurement site and sex: the SEARCH for diabetes in youth study. *J Pediatr* 2010;156:731–77.
- [5] Keles N, Dogan B, Kalcik M, Caliskan M, Keles NN, Aksu F, et al. Is serum Klotho protective against atherosclerosis in patients with type 1 diabetes mellitus? *J Diabetes Complications* 2016;30:126–32.
- [6] Alonso Díaz S, Redondo López S, García Ureña M, Cortés Peiró M, Fernández-Durán E, Benito Martínez E, et al. [Rigidez arterial en pacientes con diabetes mellitus tipo 1. Factores determinantes y su relación con la presencia de neuropatía autonómica cardiovascular subclínica]. *Endocr Nutr* 2016;63:97–8.
- [7] Inci A, Sari F, Olmaz R, Coban M, Dolu S, Sarikaya M, et al. Soluble Klotho levels in diabetic nephropathy: relationship with arterial stiffness. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016;20:3230–7.
- [8] Dogan B, Arikan IH, Guler D, Keles N, Isbilen B, Isman F, et al. Fibroblast growth factor-23 but not sKlotho levels are related to diastolic dysfunction in type 1 diabetic patients with early diabetic nephropathy. *Int Urol Nephrol* 2016;48:399–407.
- [9] Lee EY, Kim SS, Lee JS, Kim IJ, Song SH, Cha SK, et al. Soluble alpha-klotho as a novel biomarker in the early stage of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 2014;9:e102984.
- [10] Wang M, Wise SC, Leff T, Su TZ. Troglitazone, an antidiabetic agent, inhibits cholesterol biosynthesis through a mechanism independent of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Diabetes* 1999;48:254–60.

L. Nattero-Chávez<sup>a,c,\*</sup>, M. Luque-Ramírez<sup>a,c,\*</sup>, S. Moncayo<sup>c</sup>  
S. Alonso-Díaz<sup>a</sup>, E. Fernández-Durán<sup>c</sup>, S. Redondo-López<sup>b</sup>  
M. García-Ureña<sup>b</sup>, H.F. Escobar-Morreale<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Endocrinology and Nutrition, 28034 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Department of Vascular Surgery, 28034 Madrid, Spain

<sup>c</sup>Diabetes, Obesity and Human Reproduction Research Group, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Universidad de Alcalá, Madrid & Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), 28034 Madrid, Spain

\*Corresponding authors. Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar, Km 9.1, 28034 Madrid, Spain

E-mail addresses: [marialia.nattero@salud.madrid.org](mailto:marialia.nattero@salud.madrid.org)  
(L. Nattero-Chávez), [manuel.luque@salud.madrid.org](mailto:manuel.luque@salud.madrid.org)  
(M. Luque-Ramírez).

Received 13 December 2017

Received in revised form 21 December 2017

Accepted 6 January 2018

Available online xxx





## 16. CONCLUSIONES.

### **PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA EN PACIENTES ASINTOMÁTICOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 1**

- La prevalencia de enfermedad arterial periférica en nuestra cohorte de pacientes asintomáticos con diabetes mellitus tipo 1 y aceptable control metabólico es del 12,8% y la de arteriosclerosis subclínica del 16%, y su diagnóstico modifica el tratamiento farmacológico de los pacientes en un porcentaje substancial de los casos.
- En caso de seguir las recomendaciones actuales de despistaje propuestas por las principales sociedades científicas, se dejaría de diagnosticar la enfermedad arterial periférica en hasta un tercio de los pacientes afectos asintomáticos de nuestra cohorte de pacientes con diabetes mellitus tipo 1.
- La probabilidad de presentar enfermedad arterial periférica asintomática es similar entre los pacientes que presentan un índice tobillo-brazo superior o inferior al rango de referencia, siendo necesario el diagnóstico estratificado en dos pasos para descartar la enfermedad arterial en pacientes asintomáticos.
- La elevación del límite superior de la normalidad de índice tobillo-brazo como técnica de despistaje para la enfermedad arterial periférica en pacientes asintomáticos aumenta la tasa de falsos negativos en nuestra población con diabetes mellitus tipo 1.

**DETERMINANTES DE ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA EN  
PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1**

- Los niveles circulantes de Klotho soluble no están asociados con la presencia de calcificación arterial de la media en nuestros pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y función renal conservada. Sin embargo, sus concentraciones circulantes se correlacionan con la edad, el tiempo de evolución de la diabetes mellitus tipo 1, los valores de tensión arterial diastólica en consulta y las concentraciones de parathormona, siendo esta última el principal determinante de su variabilidad, aun en pacientes con función renal conservada.
- La prevalencia de neuropatía cardíaca autonómica en pacientes con rigidez arterial es tres veces mayor que en pacientes con un índice tobillo-brazo normal, aumentando de manera considerable en coexistencia de enfermedad arterial periférica.
- La asociación de neuropatía cardíaca autonómica en pacientes con rigidez arterial es independiente de la presencia de otros factores de riesgo cardiovasculares clásicos en nuestra cohorte de pacientes con diabetes mellitus tipo 1.
- Existe dimorfismo sexual en la prevalencia de la neuropatía cardíaca autonómica, con la edad y la menopausia desempeñando un papel

**primordial. La prevalencia de neuropatía cardíaca autonómica es similar en hombres con diabetes tipo 1 en todos los rangos de edad, mientras que la menopausia en las mujeres con diabetes tipo 1 se acompaña de un aumento drástico en la prevalencia de disfunción autonómica en comparación con las mujeres en edad fértil.**

- **La disfunción cardíaca autonómica se asocia con un aumento de la relación testosterona/estradiol en las mujeres con diabetes mellitus tipo 1, así como con un descenso de las concentraciones séricas de la testosterona en el hombre.**

### **CONCLUSION FINAL**

**Las indicaciones de despistaje vigentes conducirían al infradiagnóstico de enfermedad arterial periférica en pacientes con diabetes mellitus tipo 1. Teniendo en cuenta la alta prevalencia de presentación subclínica y sus consecuencias a largo plazo, la evaluación vascular completa está justificada en el seguimiento rutinario de pacientes con diabetes mellitus tipo 1. Por otro lado, un índice tobillo-brazo elevado en un paciente con diabetes mellitus tipo 1, justifica un estudio dirigido con la intención de descartar la presencia de disfunción cardíaca autonómica, ya que su asociación es frecuente y permite identificar a pacientes de alto riesgo de enfermedad arterial periférica y morbilidad cardiovascular, con un potencial beneficio de la intensificación del manejo de los factores de riesgo cardiovascular.**

**Las indicaciones de despistaje de las complicaciones crónicas asociadas a la diabetes mellitus tipo 1 deben tener en consideración aspectos específicos de su fisiopatogenia, evitando la generalización y adaptación de las recomendaciones elaboradas para los pacientes con diabetes mellitus tipo 2.**

**Finalmente, el dimorfismo sexual en la presentación de complicaciones crónicas en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, y las posibles consecuencias terapéuticas del tratamiento de la deficiencia de andrógenos masculinos y el hiperandrogenismo femenino en la disfunción cardíaca autonómica en pacientes con diabetes tipo 1 merecen investigación adicional. Así, dada la asociación de neuropatía cardíaca autonómica con la enfermedad cardiovascular, la elevada prevalencia de disfunción autonómica en mujeres con diabetes tipo 1 a partir de los 45 años hace que su detección sea obligatoria para la estratificación precisa de su riesgo cardiovascular.**

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Ahmed AM: History of diabetes mellitus. *Saudi Med J* 2002;23(4):373-378
2. Dobson M: Nature of the urine in diabetes. *Medical Observations and Enquiries* 1776;5:218-230
3. Polonsky KS: The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med* 2012;367:1332-1340
4. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA: Encore: pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. *CMAJ* 1991;145:1281-1286
5. Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, Rand L, Siebert C, Diabetes CCTR, Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-986
6. American Diabetes Association: 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 2018;41:S13-S27
7. Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Saydah S, Imperatore G, Linder B, Divers J, Bell R, Badaru A, Talton JW, Crume T, Liese AD, Merchant AT, Lawrence JM, Reynolds K, Dolan L, Liu LL, Hamman RF, Study SfdiY: Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. *JAMA* 2014;311:1778-1786
8. Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM, Burrows NR, Geiss LS, Valdez R, Beckles GL, Saaddine J, Gregg EW, Williamson DF, Narayan KM: Type 2 diabetes among North American children and adolescents: an epidemiologic review and a public health perspective. *J Pediatr* 2000;136(5):664-672
9. Liese AD, D'Agostino RB, Jr., Hamman RF, Kilgo PD, Lawrence JM, Liu LL, Loots B, Linder B, Marcovina S, Rodriguez B, Standiford D, Williams DE: The burden of

diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics* 2006;118(4):1510-1518

10. Dabelea D, Rewers A, Stafford JM, Standiford DA, Lawrence JM, Saydah S, Imperatore G, D'Agostino RB, Jr., Mayer-Davis EJ, Pihoker C, Group SfdiYS: Trends in the prevalence of ketoacidosis at diabetes diagnosis: the SEARCH for diabetes in youth study. *Pediatrics* 2014;133:e938-945

11. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM: Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA* 2014;311:806-814

12. Pozzilli P, Guglielmi C, Pronina E, Petraikina E: Double or hybrid diabetes associated with an increase in type 1 and type 2 diabetes in children and youths. *Diabetes* 2007;8:88-95

13. Concannon P, Rich SS, Nepom GT: Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 2009;360:1646-1654

14. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY: Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2007;356:1517-1526

15. Tisch R, McDevitt H: Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996;85:291-297

16. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszkó JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Genetics of Type 1 Diabetes in F, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC, Wellcome Trust Case Control C, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG: Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2007;39:857-864

17. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SC, Jenkins SC, Palmer SM, et al.: A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994;371:130-136
18. Khalil I, d'Auriol L, Gobet M, Morin L, Lepage V, Deschamps I, Park MS, Degos L, Galibert F, Hors J: A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1990;85:1315-1319
19. Rowe RE, Leech NJ, Nepom GT, McCulloch DK: High genetic risk for IDDM in the Pacific Northwest. First report from the Washington State Diabetes Prediction Study. *Diabetes* 1994;43:87-94
20. Khalil I, d'Auriol L, Gobet M, Morin L, Lepage V, Deschamps I, Park MS, Degos L, Galibert F, Hors J: A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1990;85(4):1315-1319
21. Kavvoura FK, Ioannidis JP: CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2005;162:3-16
22. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M, Eisenbarth GS, Comings D, Mustelin T: A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004;36:337-338
23. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, Vella A, Nutland S, Rance HE, Maier L, Barratt BJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Dunger DB, Widmer B, Strachan DP, Ring SM, Walker N, Clayton DG, Twells RC, Gough SC, Todd JA: Replication of an association between the lymphoid tyrosine

phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 2004;53:3020-3023

24. Achenbach P, Ziegler AG: Diabetes-related antibodies in euglycemic subjects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005;19:101-117

25. Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, Scherbaum WA, Kolb H, Noordzij JG, Roep BO: Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-cell deficiency. *N Engl J Med* 2001;345(14):1036-1040

26. Atkinson MA, Maclaren NK: The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994;331:1428-1436

27. Sabbah E, Savola K, Kulmala P, Veijola R, Vahasalo P, Karjalainen J, Akerblom HK, Knip M: Diabetes-associated autoantibodies in relation to clinical characteristics and natural course in children with newly diagnosed type 1 diabetes. The Childhood Diabetes In Finland Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1534-1539

28. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS: Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 2005;435:220-223

29. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P: Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990;347:151-156

30. Hawa M, Rowe R, Lan MS, Notkins AL, Pozzilli P, Christie MR, Leslie RD: Value of antibodies to islet protein tyrosine phosphatase-like molecule in predicting type 1 diabetes. *Diabetes* 1997;46:1270-1275

31. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC: The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is



- a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17040-17045
32. Verge CF, Gianani, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS: Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996;45(7):926-933
33. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC: The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;2007:17040-17045
34. Wenzlau JM, Walter M, Gardner TJ, Frisch LM, Yu L, Eisenbarth GS, Ziegler AG, Davidson HW, Hutton JC: Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(10):4712-4719
35. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet* 2000;355:873-876
36. Vehik K, Hamman RF, Lezotte D, Norris JM, Klingensmith G, Bloch C, Rewers M, Dabelea D: Increasing incidence of type 1 diabetes in 0- to 17-year-old Colorado youth. *Diabetes Care* 2007;30(3):503-509
37. Gale EA: The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 2002;51(12):3353-3361
38. Lopez-Siguero JP, Del Pino-De la Fuente A, Martinez-Aedo MJ, Moreno-Molina JA: Increased incidence of type 1 diabetes in the south of Spain. *Diabetes Care* 2002;25:1099
39. Bach JF: The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347(12):911-920

40. Dahlquist GG, Patterson C, Soltesz G: Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetes Care* 1999;22(10):1698-1702
41. Stene LC, Joner G: Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. *Am J Clin Nutr* 2003;78(6):1128-1134
42. King ML, Shaikh A, Bidwell D, Voller A, Banatvala JE: Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type I) diabetes mellitus. *Lancet* 1983;1(8339):1397-1399
43. Hyoty H, Hiltunen M, Knip M, Laakkonen M, Vahasalo P, Karjalainen J, Koskela P, Roivainen M, Leinikki P, Hovi T: A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes* 1995;44(6):652-657
44. Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK: Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1994;94(5):2125-2129
45. Hummel M, Fuchtenbusch M, Schenker M, Ziegler AG: No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB Study. *Diabetes Care* 2000;23(7):969-974
46. Like AA, Guberski DI, Butler L: Influence of environmental viral agents on frequency and tempo of diabetes mellitus in BB/Wor rats. *Diabetes* 1991;40(2):259-262
47. Yoon JW: The role of viruses and environmental factors in the induction of diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;164:95-123
48. Virtanen SM, Saukkonen T, Savilahti E, Ylonen K, Rasanen L, Aro A, Knip M, Tuomilehto J, Akerblom HK: Diet, cow's milk protein antibodies and the risk of IDDM

- in Finnish children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia* 1994;37(4):381-387
49. Cavallo MG, Fava D, Monetini L, Barone F, Pozzilli P: Cell-mediated immune response to beta casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *Lancet* 1996;348(9032):926-928
50. Elliott RB, Harris DP, Hill JP, Bibby NJ, Wasmuth HE: Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia* 1999;42(3):292-296
51. Ziegler AG, Schmid S Fau - Huber D, Huber D Fau - Hummel M, Hummel M Fau - Bonifacio E, Bonifacio E: Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies.
52. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, Rewers M: Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* 2003;290(3):1713-1720
53. Frederiksen B, Kroehl M, Lamb MM, Seifert J, Barriga K, Eisenbarth GS, Rewers M, Norris JM: Infant exposures and development of type 1 diabetes mellitus: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *JAMA Pediatr* 2013;167(9):808-815
54. Association AD: Economic costs of diabetes in the U.S. in 2012. *Diabetes Care* 2013;36:1033-1046
55. Wolters RJ, Braspenning JCC, Wensing M: Impact of primary care on hospital admission rates for diabetes patients: A systematic review. *Diabetes Res Clin Pract* 2017;129:182-196
56. American Diabetes Association: 9. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 2018;41:S86-S104

57. Munoz-Rivas N, Mendez-Bailon M, Hernandez-Barrera V, de Miguel-Yanes JM, Jimenez-Garcia R, Esteban-Hernandez J, Jimenez-Trujillo I, Alvaro-Meca A, Carrasco-Garrido P, de Miguel-Diez J, Lopez-de-Andres A: Time Trends in Ischemic Stroke among Type 2 Diabetic and Non-Diabetic Patients: Analysis of the Spanish National Hospital Discharge Data (2003-2012). *PLoS One* 2015;10:e0145535
58. de Miguel-Yanes JM, Jimenez-Garcia R, Hernandez-Barrera V, Mendez-Bailon M, de Miguel-Diez J, Lopez-de-Andres A: Impact of type 2 diabetes mellitus on in-hospital-mortality after major cardiovascular events in Spain (2002-2014). *Cardiovasc Diabetol* 2017;16:126
59. Burrows NR, Li Y, Gregg EW, Geiss LS: Declining Rates of Hospitalization for Selected Cardiovascular Disease Conditions Among Adults Aged  $\geq 35$  Years With Diagnosed Diabetes, U.S., 1998-2014. *Diabetes Care* 2018;41:293-302
60. Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Wilkins E, Townsend N: Trends in the epidemiology of cardiovascular disease in the UK. *Heart* 2016;102:1945-1952
61. Soedamah-Muthu SS, Fuller JH, Mulnier HE, Raleigh VS, Lawrenson RA, Colhoun HM: High risk of cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes in the U.K.: a cohort study using the general practice research database. *Diabetes Care* 2006;29:798-804
62. Shankar A, Klein R, Klein BE, Moss SE: Association between glycosylated hemoglobin level and cardiovascular and all-cause mortality in type 1 diabetes. *Am J Epidemiol* 2007;166:393-402
63. Roy M, Rendas-Baum R, Skurnick J: Mortality in African-Americans with Type 1 diabetes: The New Jersey 725. *Diabet Med* 2006;23:698-706
64. Secrest AM, Becker DJ, Kelsey SF, LaPorte RE, Orchard TJ: All-cause mortality trends in a large population-based cohort with long-standing childhood-onset type 1

diabetes: the Allegheny County type 1 diabetes registry. *Diabetes Care* 2010;33:2573-2579

65. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB: Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125:e2-e220

66. de Ferranti SD, de Boer IH, Fonseca V, Fox CS, Golden SH, Lavie CJ, Magge SN, Marx N, McGuire DK, Orchard TJ, Zinman B, Eckel RH: Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation* 2014;130:1110-1130

67. Sousa GR, Pober D, Galderisi A, Lv H, Yu L, Pereira AC, Doria A, Kosiborod M, Lipas MA: Glycemic Control, Cardiac Autoimmunity, and Long-Term Risk of Cardiovascular Disease in Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation* 2019;139(6):730-743

68. Corbin KD, Driscoll KA, Pratley RE, Smith SR, Maahs DM, Mayer-Davis EJ: Obesity in Type 1 Diabetes: Pathophysiology, Clinical Impact, and Mechanisms. *Endocr Rev* 2018;39:629-663

69. DCCT Research Group: Effect of intensive diabetes management on macrovascular events and risk factors in the Diabetes Control and Complications Trial. *The American Journal of Cardiology* 1995;75(14):894-903

70. Nathan DM, DCCT-EDIC Research Group: The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care* 2014;37:9-16

71. Orchard TJ, Nathan DM, Zinman B, Cleary P, Brillon D, Backlund JY, Lachin JM: Association between 7 years of intensive treatment of type 1 diabetes and long-term mortality. *JAMA* 2015;313(1):45-53
72. Nathan DM, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillon DJ, Backlund J-Y, O'Leary DH, Genuth S: Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2003;348:2294-2303
73. Shankar A, Klein R, K. BE, Moss SE: Association between glycosylated hemoglobin level and cardiovascular and all-cause mortality in type 1 diabetes. *Am J Epidemiol* 2007;166(4):393-402
74. Lind M, Svensson AM, Kosiborod M, Gudbjornsdottir S, Pivodic A, Wedel H, Dahlqvist S, Clements M, Rosengren A: Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2014;371:1972-1982
75. Diabetes Control Complications Trial / Epidemiology of Diabetes Intervention Complications Study Research Group: Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Outcomes in Type 1 Diabetes: The DCCT/EDIC Study 30-Year Follow-up. *Diabetes Care* 2016;39:686-693
76. Jude EB, Eleftheriadou I, Tentolouris N: Peripheral arterial disease in diabetes--a review. *Diabet Med* 2010;27:4-14
77. Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, Boulton AJ: Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care* 2001;24:1433-1437
78. Jonasson JM, Ye W, Sparen P, Apelqvist J, Nyren O, Brismar K: Risks of nontraumatic lower-extremity amputations in patients with type 1 diabetes: a population-based cohort study in Sweden. *Diabetes Care* 2008;31:1536-1540
79. Hinchliffe RJ: Amputations in patients with diabetes. *Br J Surg* 2011;98:1679-1681

80. Schaper NC, Apelqvist J, Bakker K: Reducing lower leg amputations in diabetes: a challenge for patients, healthcare providers and the healthcare system. *Diabetologia* 2012;55:1869-1872
81. Faglia E: Characteristics of peripheral arterial disease and its relevance to the diabetic population. *Int J Low Extrem Wounds* 2011;10:152-166
82. American Diabetes Association: Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:3333-3341
83. Murabito JM, D'Agostino RB, Silbershatz H, Wilson WF: Intermittent claudication. A risk profile from The Framingham Heart Study. *Circulation* 1997;96:44-49
84. Hiatt WR: Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med* 2001;344:1608-1621
85. Yang SL, Zhu LY, Han R, Sun LL, Li JX, Dou JT: Pathophysiology of peripheral arterial disease in diabetes mellitus. *J Diabetes* 2017;9:133-140
86. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, Bjorck M, Brodmann M, Cohnert T, Collet JP, Czerny M, De Carlo M, Debus S, Espinola-Klein C, Kahan T, Kownator S, Mazzolai L, Naylor AR, Roffi M, Rother J, Sprynger M, Tendera M, Tepe G, Venermo M, Vlachopoulos C, Desormais I: 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J* 2018;39:763-816
87. Ohkuma T, Ninomiya T, Tomiyama H, Kario K, Hoshida S, Kita Y, Inoguchi T, Maeda Y, Kohara K, Tabara Y, Nakamura M, Ohkubo T, Watada H, Munakata M, Ohishi

M, Ito N, Nakamura M, Shoji T, Vlachopoulos C, Aboyans V, Yamashina A, collaborative group for the Japan Brachial-Ankle pulse wave Vipdm-aopstetsotA-BI: Ankle-brachial index measured by oscillometry is predictive for cardiovascular disease and premature death in the Japanese population: An individual participant data meta-analysis. *Atherosclerosis* 2018;275:141-148

88. Cardoso CRL, Melo JV, Salles GC, Leite NC, Salles GF: Prognostic impact of the ankle-brachial index on the development of micro- and macrovascular complications in individuals with type 2 diabetes: the Rio de Janeiro Type 2 Diabetes Cohort Study. *Diabetologia* 2018;

89. Qu B, Liu Q, Li J: Systematic Review of Association Between Low Ankle-Brachial Index and All-Cause Cardiovascular, or Non-cardiovascular Mortality. *Cell Biochem Biophys* 2015;73:571-575

90. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, Foster E, Hlatky MA, Hodgson JM, Kushner FG, Lauer MS, Shaw LJ, Smith SC, Jr., Taylor AJ, Weintraub WS, Wenger NK, Jacobs AK, Smith SC, Jr., Anderson JL, Albert N, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Guyton RA, Halperin JL, Hochman JS, Kushner FG, Nishimura R, Ohman EM, Page RL, Stevenson WG, Tarkington LG, Yancy CW, American College of Cardiology F, American Heart A: 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:e50-103

91. Ozdemir BA, Brownrigg JR, Jones KG, Thompson MM, Hinchliffe RJ: Systematic review of screening investigations for peripheral arterial disease in patients with diabetes mellitus. *Surg Technol Int* 2013;23:51-58



92. Ibrahim A: IDF Clinical Practice Recommendation on the Diabetic Foot: A guide for healthcare professionals. *Diabetes Res Clin Pract* 2017;127:285-287
93. Schaper NC, Van Netten JJ, Apelqvist J, Lipsky BA, Bakker K: Prevention and management of foot problems in diabetes: A Summary Guidance for Daily Practice 2015, based on the IWGDF guidance documents. *Diabetes Res Clin Pract* 2017;124:84-92
94. American Diabetes Association: 10. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 2018;41:S105-S118
95. Hingorani A, LaMuraglia GM, Henke P, Meissner MH, Loretz L, Zinszer KM, Driver VR, Frykberg R, Carman TL, Marston W, Mills JL, Sr., Murad MH: The management of diabetic foot: A clinical practice guideline by the Society for Vascular Surgery in collaboration with the American Podiatric Medical Association and the Society for Vascular Medicine. *J Vasc Surg* 2016;63:3S-21S
96. Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK, Golzarian J, Gornik HL, Halperin JL, Jaff MR, Moneta GL, Olin JW, Stanley JC, White CJ, White JV, Zierler RE, Society for Cardiovascular Angiography Interventions, Society of Interventional Radiology, Society for Vascular Medicine, Society for Vascular Surgery: 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Peripheral Artery Disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:2020-2045
97. Hinchliffe RJ, Brownrigg JR, Apelqvist J, Boyko EJ, Fitridge R, Mills JL, Reekers J, Shearman CP, Zierler RE, Schaper NC: International Working Group on the Diabetic Foot. IWGDF guidance on the diagnosis, prognosis and management of peripheral artery disease in patients with foot ulcers in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2016;32 Suppl 1:37-44

98. Bernstein EF, Fronck A: Current status of noninvasive tests in the diagnosis of peripheral arterial disease. *Surg Clin North Am* 1982;62:473-487
99. American College of Cardiology F, American Heart Association Task F, Society for Cardiovascular A, Interventions, Society of Interventional R, Society for Vascular M, Society for Vascular S, Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK, Golzarian J, Gornik HL, Halperin JL, Jaff MR, Moneta GL, Olin JW, Stanley JC, White CJ, White JV, Zierler RE: 2011 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with peripheral artery disease (updating the 2005 guideline). *Vasc Med* 2011;16:452-476
100. Fowkes FG: The measurement of atherosclerotic peripheral arterial disease in epidemiological surveys. *Int J Epidemiol* 1988;17:248-254
101. Criqui MH, Langer RD, Fronck A, Feigelson HS, Klauber MR, McCann TJ, Browner D: Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med* 1992;326:381-386
102. Hyun S, Forbang NI, Allison MA, Denenberg JO, Criqui MH, Ix JH: Ankle-brachial index, toe-brachial index, and cardiovascular mortality in persons with and without diabetes mellitus. *J Vasc Surg* 2014;60:390-395
103. TA Elhadd RR, RT Jung, PA Stonebridge, JJF Belch: Pilot study of prevalence of asymptomatic peripheral arterial occlusive disease in patients with diabetes attending a hospital clinic. *Practical Diabetes International* 1999:163-166
104. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, Regensteiner JG, Creager MA, Olin JW, Krook SH, Hunninghake DB, Comerota AJ, Walsh ME, McDermott MM, Hiatt WR: Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001;286:1317-1324

105. Moss SE, Klein R, Klein BE: The 14-year incidence of lower-extremity amputations in a diabetic population. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* 1999;22:951-959
106. Maser RE, Wolfson SK, Jr., Ellis D, Stein EA, Drash AL, Becker DJ, Dorman JS, Orchard TJ: Cardiovascular disease and arterial calcification in insulin-dependent diabetes mellitus: interrelations and risk factor profiles. Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study-V. *Arterioscler Thromb* 1991;11:958-965
107. Olson JC, Erbey JR, Forrest KY, Williams K, Becker DJ, Orchard TJ: Glycemia (or, in women, estimated glucose disposal rate) predict lower extremity arterial disease events in type 1 diabetes. *Metabolism* 2002;51:248-254
108. Carter RE, Lackland DT, Cleary PA, Yim E, Lopes-Virella MF, Gilbert GE, Orchard TJ, Diabetes C, Complications Trial/Epidemiology of Diabetes I, Complications Study Research G: Intensive treatment of diabetes is associated with a reduced rate of peripheral arterial calcification in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 2007;30:2646-2648
109. Adler AI, Erqou S, Lima TA, Robinson AH: Association between glycosylated haemoglobin and the risk of lower extremity amputation in patients with diabetes mellitus-review and meta-analysis. *Diabetologia* 2010;53:840-849
110. Ho CY, Shanahan CM: Medial Arterial Calcification: An Overlooked Player in Peripheral Arterial Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36:1475-1482
111. Laina A, Stellos K, Stamatelopoulos K: Vascular ageing: Underlying mechanisms and clinical implications. *Exp Gerontol* 2018;109:16-30
112. Urbina EM, Isom S, Bell RA, Bowlby DA, D'Agostino R, Jr., Daniels SR, Dolan LM, Imperatore G, Marcovina SM, Merchant AT, Reynolds K, Shah AS, Wadwa RP, Dabelea D: Burden of Cardiovascular Risk Factors Over Time and Arterial Stiffness in

Youth With Type 1 Diabetes Mellitus: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. *J Am Heart Assoc* 2019;8(13)

113. Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL: Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther* 2008;120(1):1

114. Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, Sosenko JM, Ziegler D: Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2017;40:136-154

115. Chahal S, Vohra K, Syngle A: Association of sudomotor function with peripheral artery disease in type 2 diabetes. *Neurol Sci* 2017;38(1):151-156

116. Spallone V: Update on the Impact, Diagnosis and Management of Cardiovascular Autonomic Neuropathy in Diabetes: What Is Defined, What Is New, and What Is Unmet. *Diabetes Metab J* 2019;43:3-30

117. Jaiswal M, Urbina EM, Wadwa RP, Talton JW, D'Agostino RB, Jr., Hamman RF, Fingerlin TE, Daniels S, Marcovina SM, Dolan LM, Dabelea D: Reduced heart rate variability among youth with type 1 diabetes: the SEARCH CVD study. *Diabetes Care* 2013;36:157-162

118. Prince CT, Secrest AM, Mackey RH, Arena VC, Kingsley LA, Orchard TJ: Cardiovascular autonomic neuropathy, HDL cholesterol, and smoking correlate with arterial stiffness markers determined 18 years later in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2010;33(3):652-657

119. Lim K, Lu TS, Molostvov G, Lee C, Lam FT, Zehnder D, Hsiao LL: Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation* 2012;125(18):2243-2255

120. Erben RG: Update on FGF23 and Klotho signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2016;432:56-65

121. Keles N, Dogan B, Kalcik M, Caliskan M, Keles NN, Aksu F, Bulut M, Kostek O, Isbilen B, Yilmaz Y, Oguz A: Is serum Klotho protective against atherosclerosis in patients with type 1 diabetes mellitus? *J Diabetes Complications* 2016;30(1):126-132
122. Wenger NK: You've come a long way, baby: cardiovascular health and disease in women: problems and prospects. *Circulation* 2004;109(5):558-560
123. Regensteiner J, Golden S, Huebschmann AG, Barrett-Connor E, Chang AY, Chyun D, Fox CS, Kim C, Mehta N, Reckelhoff JF, Reusch JEB, Rexrode KM, Sumner AE, Welty FK, Wenger NK, Anton B: Sex Differences in the Cardiovascular Consequences of Diabetes Mellitus: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2015;132:2424-2447
124. Huxley RR, Peters SA, Mishra GD, Woodward M: Risk of all-cause mortality and vascular events in women versus men with type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3:198-206
125. Juutilainen A, S. K, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M: Gender difference in the impact of type 2 diabetes on coronary heart disease risk. *Diabetes Care* 2004;27(12):2898-2904
126. Barrett-Connor E, Wingard DL: Sex differential in ischemic heart disease mortality in diabetics: a prospective population-based study. *Am J Epidemiol* 1983;118:489-496
127. Kannel W, Hjortland M, Castelli WP: Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol* 1974;34(1):29-34
128. Ohkuma T, Komorita Y, Peters SAE: Diabetes as a risk factor for heart failure in women and men: a systematic review and meta-analysis of 47 cohorts including 12 million individuals. *Diabetologia* 2019:1-11

129. Peters SA, Huxley RR, Woodward M: Diabetes as a risk factor for stroke in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of 64 cohorts, including 775,385 individuals and 12,539 strokes. *Lancet* 2014;383:1973-1980
130. Janghorbani M, Hu FB, Willett WC, Li TY, Manson JE, Logroscino G, Rexrode KM: Prospective study of type 1 and type 2 diabetes and risk of stroke subtypes: the Nurses' Health Study. *Diabetes Care* 2007;30:1730-1735
131. Bushnell C, McCullough LD, Awad IA, Chireau MV, Fedder WN, Furie KL, Howard VJ, Lichtman JH, Lisabeth LD, Pina IL, Reeves MJ, Rexrode KM, Saposnik G, Singh V, Towfighi A, Vaccarino V, Walters MR: Guidelines for the prevention of stroke in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2014;45:1545-1588
132. Kannel WB, McGee DL: Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study. *J Am Geriatr Soc* 1985;33:13-18
133. Kumakura H, Kanai H, Araki Y, Kasama S, Sumino H, Ito T, Iwasaki T, Takayama Y, Ichikawa S, Fujita K, Nakashima K, Minami K: Sex-related differences in Japanese patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 2011;219(2):846-850
134. Magnant JG, Cronenwett JL, Walsh DB, Schneider JR, Besso SR, Zwolak RM: Surgical treatment of infrainguinal arterial occlusive disease in women. *J Vasc Surg* 1993;17:67-73
135. Huxley R, Barzi F, Woodward M: Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ* 2006;332:73-78
136. Ruppert K, Roberts M, Orchard TJ, Zgibor JC: Cardiovascular disease risk prediction in type 1 diabetes: accounting for the differences. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;78(2):234-237

137. Conway B, Miller RG, Costacou T, Fried L, Kelsey S, Evans RW, Orchard TJ: Temporal patterns in overweight and obesity in Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2010;27:398-404
138. Lima R, Woffor M, Reckelhoff JF: Hypertension in postmenopausal women. *Curr Hypertens Rep* 2012;14:254-260
139. Maranon RO, Lima R, Mathbout M, Carmo JM, Hall JE, Roman RJ, Reckelhoff JF: Postmenopausal hypertension: role of the sympathetic nervous system in an animal model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014;15:248-256
140. de Burgos-Lunar C, Jimenez-Garcia R, Salinero-Fort MA, Gomez-Campelo P, Gil A, Abanades-Herranz JC, Cardenas-Valladolid J, del Cura-Gonzalez I: Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment and control in an adult type 2 diabetes Spanish population between 2003 and 2009. *PLoS One* 2014;9
141. Awa WL, Fach E, Krakow D, Welp R, Kunder J, Voll A, Zeyfang A, Wagner C, Schutt M, Boehm B, de Souza M, Holl RW: Type 2 diabetes from pediatric to geriatric age: analysis of gender and obesity among 120,183 patients from the German/Austrian DPV database. *Eur J Endocrinol* 2012;167:245-254
142. Novak M, Bjorck LF, Welin L, Welin C, Manhem K, Rosengren A: Gender differences in the prevalence of metabolic syndrome in 50-year-old Swedish men and women with hypertension born in 1953. *J Hum Hypertens* 2013;27:56-61
143. Silbiger SR, Neugarten J: The role of gender in the progression of renal disease. *Adv Ren Relace Ther* 2003;10:3-14
144. Doublier S, Lupia E, Catanuto P, Elliot SJ: Estrogens and progression of diabetic kidney damage. *Curr Diabetes Rev* 2011;7(1):28-34
145. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, Smith SC, Jr., Svetkey LP,

Taler SJ, Townsend RR, Wright JT, Jr., Narva AS, Ortiz E: 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 2014;311(5):507-520

146. Lopez-Ruiz A, Sartori-Valinotti J, Yanes LL, Iliescu R, Reckelhoff JF: Sex differences in control of blood pressure: role of oxidative stress in hypertension in females. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:466-474

147. Ojeda NB, Hennington B, Williamson DT, Hill ML, Betson NEE, Sartori-Valinotti JC, Reckelhoff JF, - RJF, Royals TP, - RTF, Alexander BT, Alexander BT: Oxidative stress contributes to sex differences in blood pressure in adult growth-restricted offspring. *Hypertension* 2012;60:114-122

148. Remaley AT, Amar M, Sviridov D: HDL-replacement therapy: mechanism of action, types of agents and potential clinical indications. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;6:1203-1215

149. Sumner AE, Harman JI, Buxbaum SG, Miller BV, 3rd, Tambay AV, Wyatt SB, Taylor HA, Rotimi CN, Sarpong DF: The triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio fails to predict insulin resistance in African-American women: an analysis of Jackson Heart Study. *Metab Syndr Relat Disord* 2010;8

150. Gaillard T, Parthasarathy S, Osei K: HDL dysfunctionality (Paraoxonase) is worse in nondiabetic, postmenopausal African American than in white women. *Diabetes Care* 2011;34

151. Alzahrani SH, Hess K, Price JF: Gender-specific alterations in fibrin structure function in type 2 diabetes: associations with cardiometabolic and vascular markers. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E2282–E2287.



152. Golden SH, Brown A Fau - Cauley JA, Cauley Ja Fau - Chin MH, Chin Mh Fau - Gary-Webb TL, Gary-Webb Tl Fau - Kim C, Kim C Fau - Sosa JA, Sosa Ja Fau - Sumner AE, Sumner Ae Fau - Anton B, Anton B: Health disparities in endocrine disorders: biological, clinical, and nonclinical factors--an Endocrine Society scientific statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:1979-1639
153. Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G: Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Rev* 2016;37(3):278-316
154. Tang M, Chen Y, Krewski D: Gender-related differences in the association between socioeconomic status and self-reported diabetes. . *Int J Epidemiol* 2003;32:381-385
155. Rathmann W, Haastert B, Icks A: Sex differences in the associations of socioeconomic status with undiagnosed diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the elderly population: the KORA Survey 2000. . *Eur J Public Health* 2005;15:627-633
156. Agardh E, Allebeck P, Hallqvist J, Moradi T, Sidorchuk A: Type 2 diabetes incidence and socio-economic position: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*. . *Int J Epidemiol* 2011;40:804-818
157. Petitti DB, Klingensmith GJ, Bell RA: Glycemic control in youth with diabetes: the SEARCH for diabetes in youth study. *J Pediatr* 2009;155:668-672
158. Paris CA, Imperatore G, Klingensmith G, Petitti D, Rodriguez B, Anderson AM: Predictors of insulin regimens and impact on outcomes in youth with type 1 diabetes: the SEARCH for diabetes in youth study. *J Pediatr* 2009;155:183-189.
159. Kim H, Elmi A, Henderson CL, Cogen FR, Kaplowitz PB: Characteristics of children with type 1 diabetes and persistent suboptimal glycemic control. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2012;4:82-88

160. Escobar-Morreale HF, Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JJ, Luque-Ramirez M: The striking similarities in the metabolic associations of female androgen excess and male androgen deficiency. *Hum Reprod* 2014;29:2083-2091
161. Escobar-Morreale HF, Roldan-Martin MB: Type 1 Diabetes and Polycystic Ovary Syndrome: Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care* 2016;39:639-648
162. Wexler DJ, Grant R, Meigs JB, Nathan DM, Cagliero E: Sex disparities in treatment of cardiac risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28(3):514-520
163. Chou AF, Weisman CS, Bierman AS, Correa-de-Araujo R, Mosca L: Gender disparities in the quality of cardiovascular disease care in private managed care plans. *Womens Health Issues* 2007;17(3):120-130
164. Vaccarino V, Rathore S, Wenger NK, Frederick PD, Abramson JL, Barron HV, Manhapra A, Mallik S, Krumholz HM: Sex and racial differences in the management of acute myocardial infarction, 1994 through 2002. *N Engl J Med* 2005;353(7):671-682
165. Spallone V, Ziegler D, Freeman R, Bernardi L, Frontoni S, Pop-Busui R, Stevens M, Kempler P, Hilsted J, Tesfaye S, Low P, Valensi P: Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27:639-653
166. Jaiswal M, Divers J, Urbina EM, Dabelea D, Bell RA, Pettitt DJ, Imperatore G, Pihoker C, Dolan LM, Liese AD, Marcovina S, Linder B, Feldman EL, Pop-Busui R: Cardiovascular autonomic neuropathy in adolescents and young adults with type 1 and type 2 diabetes: The SEARCH for Diabetes in Youth Cohort Study. *Pediatr Diabetes* 2018;19:680-689
167. Maser RE, Pfeifer MA, Dorman JS, Kuller LH, Becker DJ, Orchard TJ: Diabetic autonomic neuropathy and cardiovascular risk. Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study III. *Arch Intern Med* 1990;150:1218-1222

168. Abhishekh HA, Nisarga P, Kisan R, Meghana A, Chandran S, Trichur R, Sathyaprabha TN: Influence of age and gender on autonomic regulation of heart. *J Clin Monit Comput* 2013;27:259-264
169. Kuo TB, Lin T, Yang CC, Li CL, Chen CF, Chou P: Effect of aging on gender differences in neural control of heart rate. *Am J Physiol* 1999;277:2233-2239
170. Du XJ, Dart AM, Riemersma RA: Sex differences in the parasympathetic nerve control of rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994;21:485-493
171. Kloner RA, Carson C, 3rd, Dobs A, Kopecky S, Mohler ER, 3rd: Testosterone and Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:545-557
172. Randeve HS, Tan BK, Weickert MO, Lois K, Nestler JE, Sattar N, Lehnert H: Cardiometabolic aspects of the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 2012;33:812-841
173. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F, Redon J, Dominiczak A, Narkiewicz K, Nilsson PM, Burnier M, Viigimaa M, Ambrosioni E, Caulfield M, Coca A, Olsen MH, Schmieder RE, Tsioufis C, van de Borne P, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendra M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Clement DL, Coca A, Gillebert TC, Tendra M, Rosei EA, Ambrosioni E, Anker SD, Bauersachs J, Hitij JB, Caulfield M, De Buyzere M, De Geest S, Derumeaux GA, Erdine S, Farsang C, Funck-Brentano C, Gerc V, Germano G, Gielen S, Haller H, Hoes AW, Jordan J, Kahan T, Komajda M, Lovic D, Mahrholdt H, Olsen MH, Ostergren J, Parati G, Perk J, Polonia J, Popescu BA, Reiner Z, Ryden L, Sirenko Y, Stanton A, Struijker-

- Boudier H, Tsioufis C, van de Borne P, Vlachopoulos C, Volpe M, Wood DA: 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2013;34:2159-2219
174. Leng GC, Fowkes FG: The Edinburgh Claudication Questionnaire: an improved version of the WHO/Rose Questionnaire for use in epidemiological surveys. *J Clin Epidemiol* 1992;45:1101-1109
175. Ankarberg-Lindgren C, Norjavaara E: Sensitive RIA measures testosterone concentrations in prepubertal and pubertal children comparable to tandem mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest* 2015;75:341-344
176. Mazer NA: A novel spreadsheet method for calculating the free serum concentrations of testosterone, dihydrotestosterone, estradiol, estrone and cortisol: with illustrative examples from male and female populations. *Steroids* 2009;74:512-519
177. Luque-Ramirez M, Jimenez-Mendiguchia L, Garcia-Cano A, Fernandez-Duran E, de Dios Rosa V, Nattero-Chavez L, Ortiz-Flores A, Escobar-Morreale H: Certified testosterone immunoassays for hyperandrogenaemia. *Eur J Clin Invest* 2018;48:e13029
178. Calderon B, Gomez-Martin J, Vega-Pinero B, Martin-Hidalgo A, Galindo J, Luque-Ramirez M, Escobar-Morreale H, Botella-Carretero J: Prevalence of male secondary hypogonadism in moderate to severe obesity and its relationship with insulin resistance and excess body weight. *Andrology* 2016;4:62-67
179. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C, Fowkes FG, Hiatt WR, Jonsson B, Lacroix P, Marin B, McDermott MM, Norgren L, Pande RL, Preux PM, Stoffers HE, Treat-Jacobson D, American Heart Association Council on Peripheral Vascular D, Council on E, Prevention, Council on Clinical C, Council on Cardiovascular N, Council on Cardiovascular R, Intervention, Council on Cardiovascular

S, Anesthesia: Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2012;126:2890-2909

180. Taylor-Piliae RE FJ, Varady AN, Hlatky MA, Norton LC, Iribarren C, Go AS, Fortmann SP: Ankle brachial index screening in asymptomatic older adults. *Am Heart J* 2011;161

181. Gerhard-Herman M, Gardin JM, Jaff M, Mohler E, Roman M, Naqvi TZ: Guidelines for noninvasive vascular laboratory testing: a report from the American Society of Echocardiography and the Society for Vascular Medicine and Biology. *Vasc Med* 2006;11:183-200

182. Hoyer C, Sandermann J, Petersen LJ: The toe-brachial index in the diagnosis of peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2013;58:231-238

183. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, Hiratzka LF, Murphy WR, Olin JW, Puschett JB, Rosenfield KA, Sacks D, Stanley JC, Taylor LM, Jr., White CJ, White J, White RA, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Hunt SA, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B: ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation* 2006;113:e463-654

184. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, Najjar SS, Rembold CM, Post WS, American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task F: Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr* 2008;21:93-111; quiz 189-190
185. Ewing DJ, Martyn CN, Young RJ, Clarke BF: The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care* 1985;8(5):491–498.
186. Pop-Busui R, Braffett BH, Zinman B, Martin C, White NH, Herman WH, Genuth S, Gubitosi-Klug R, Group DER: Cardiovascular Autonomic Neuropathy and Cardiovascular Outcomes in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study. *Diabetes Care* 2017;40:94-100
187. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Jr., Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbiagele B, Smith SC, Jr., Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA, Sr., Williamson JD, Wright JT, Jr.: 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* 2018;138:e426-e483
188. Urbina EM, Williams RV, Alpert BS, Collins RT, Daniels SR, Hayman L J, M., Mahoney L, Mietus-Snyder M, Rocchini A, Steinberger J, McCrindle B: American Heart

Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Youth Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young. Noninvasive assessment of subclinical atherosclerosis in children and adolescents: recommendations for standard assessment for clinical research: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension* 2010;54(5):919-950

189. Secrest AM, Costacou T, Gutelius B, Miller RG, Songer TJ, Orchard TJ: Associations between socioeconomic status and major complications in type 1 diabetes: the Pittsburgh epidemiology of diabetes complication (EDC) Study. *Ann Epidemiol* 2011;21:374-381


190. Templeton GF: Approach for transforming continuous variables to normal: implications and recommendations for IS research. *Comm Assoc Inform Syst* 2011;28(4)





**ANEXO I**

**APROBACIÓN DEL PROYECTO POR EL COMITÉ ÉTICO LOCAL**

	<b>COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA</b>
---	--

Dra. ITZIAR DE PABLO LÓPEZ DE ABECHUCO, Secretaria del Comité Etico de Investigación Clínica del Hospital Ramón y Cajal

**CERTIFICA**

Que el Comité Etico de Investigación Clínica, ha evaluado el Estudio de Investigación:

Título:

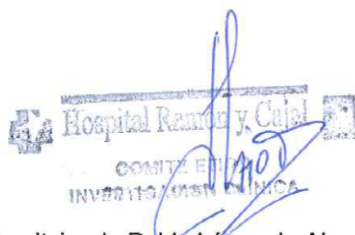
**ESTUDIO DE LA PREVALENCIA Y CARACTERISTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA ASINTOMÁTICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO I.**

Investigadora Principal: **Dra. María Lía Nattero Chávez.**

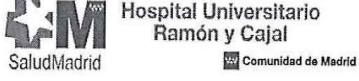
Servicio: **Endocrinología**

Y ha decidido su **APROBACIÓN.**

Lo que firmo en Madrid a 22 de Enero de 2016



Fdo.: Dra. Itziar de Pablo López de Abechuco  
Secretaria del CEIC

	<b>COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA</b>
---	--

**Conformidad de la Dirección del Centro**

Dra. **Belén de la Hoz Caballer** Adjunta a la Gerencia de Gestión del Conocimiento del Hospital "Ramón y Cajal" y vista la autorización del Comité Etico de Investigación Clínica de este Centro.

**CERTIFICA**

Que conoce la propuesta para que sea realizado en el Hospital Ramón y Cajal el Estudio de Investigación titulado:

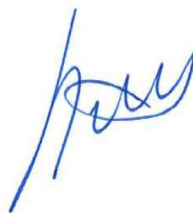
**ESTUDIO DE LA PREVALENCIA Y CARACTERISTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA ASINTOMÁTICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO I.**

Y que será realizado por la **Dra. María Lía Nattero Chávez** como Investigadora Principal.

Servicio: **Endocrinología**

Que acepta la realización de dicho Estudio de Investigación en este Hospital siempre y cuándo no implique ningún gasto adicional para el centro.

Lo que firma en Madrid a 22 de Enero de 2016



Fdo. Dra. Belén de La Hoz Caballer

## ANEXO II

### CONSENTIMIENTO INFORMADO



#### CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO.

Título del Estudio: ESTUDIO DE LA PREVALENCIA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA ASINTOMÁTICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1.

Yo (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....

(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Consiento el almacenamiento y uso de las muestras biológicas en este proyecto específico SI / NO

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

FECHA :

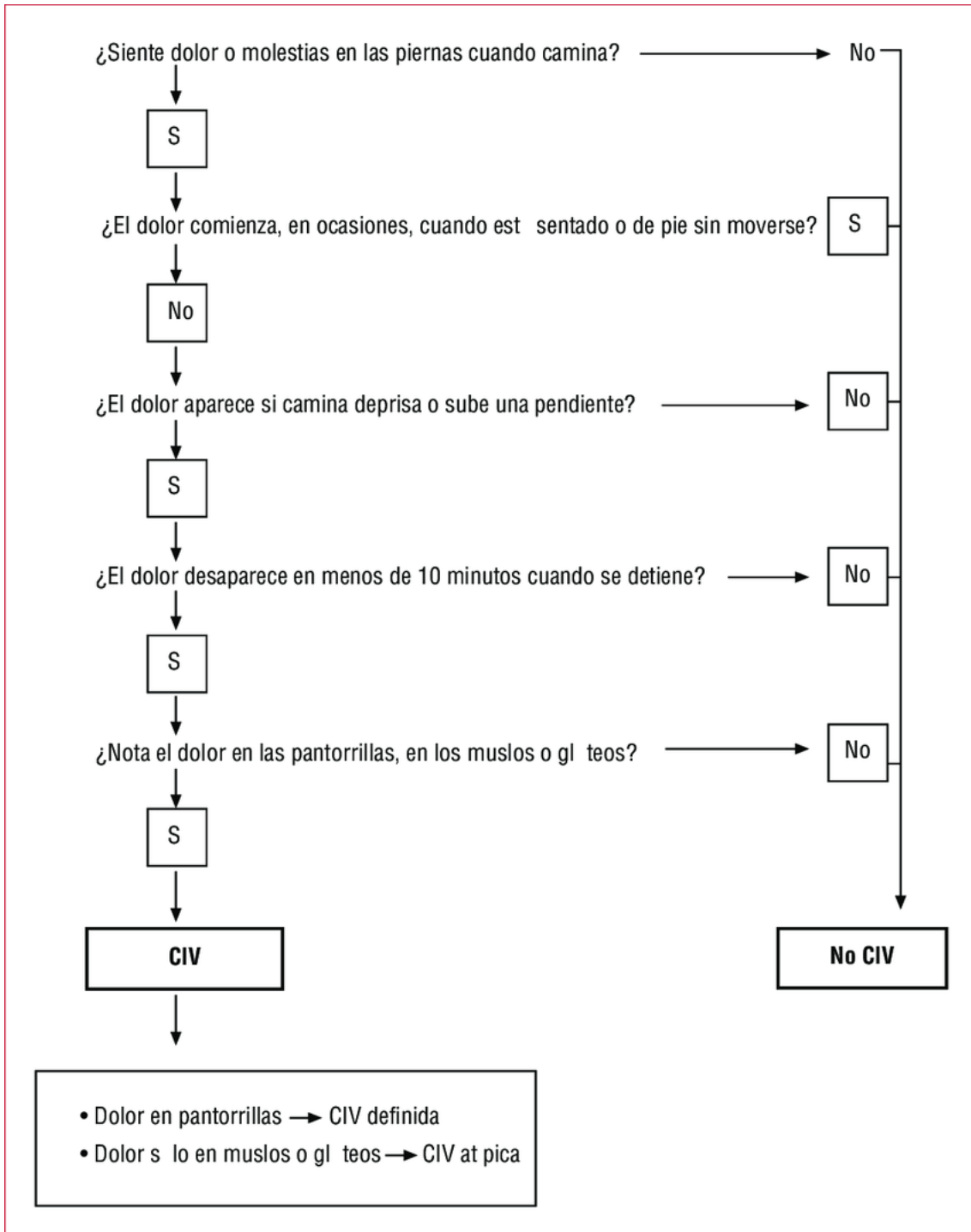
FIRMA DEL PARTICIPANTE

FECHA :

FIRMA DEL INVESTIGADOR  
RESPONSABLE DE FACILITAR LA INFORMACIÓN

**ANEXO III**

**CUESTIONARIO DE EDIMBURGO PARA SÍNTOMAS COMPATIBLES CON CLAUDICACIÓN INTERMITENTE**



## ANEXO IV

### HOJA DE VALORACIÓN DEL PIE DIABÉTICO SEGÚN EL PROTOCOLO DE LA UNIDAD DE PIE DIABÉTICO DEL HOSPITAL RAMÓN Y CAJAL.



FECHA: ...../...../.....  
 EDAD:  
 TIPO DE DIABETES:

AÑO DE DEBUT: INICIO DE LA INSULINIZACIÓN: HbA1c: (Fecha...../...../.....)  
 TRATAMIENTO:

#### FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS.

Retinopatía	SI NO
Pérdida de la agudeza visual	SI NO
HTA	SI NO
Dislipemia	SI NO
Tabaquismo	SI NO
AP de C. Isquémica	SI NO
AP de ACV	SI NO
AP de claudicación intermitente	SI NO
Historia de úlcera/amputación	SI NO
NEFROPATIA:	SI NO
Microalbuminuria (30-300 mg/24h)	SI NO
Macroalbuminuria (> 300 mg/24h)	SI NO

#### ALTERACIONES MORFOLOGICAS

Uñas anchas y gruesas  
 Infección  
 Deformidades  
 Callos  
 Cirugía/amputación

#### VALORACION NEUROLOGICA

**NEUROPATHY SYMPTOMS SCORE (NSS)**  
 Cansancio, calambres o dolor: 1 punto    Quemazón, adormecimiento u hormigueos: 2 puntos  
 Si los anteriores síntomas en los pies: (+ 2 puntos). Si sólo en pantorrillas (+1 punto).  
 Si se agravan sólo por la noche: (+ 2 puntos). Si durante día y noche (+ 1 punto).  
 Si mejoran con caminar (+ 2 puntos) con bipedestación (+ 1 punto)  
**PUNTUACION TOTAL:** Leve: 3-4    Moderada: 5-6    Grave: 7-9

EXPLORACION CON MONOFILAMENTO 10g:    DERECHO    IZQUIERDO:




SENSIBILIDAD VIBRATORIA	DERECHO	IZQUIERDO
SENSIBILIDAD DOLOROSA (PINCHAZO)	DERECHO	IZQUIERDO
REFLEJO AQUILEO	DERECHO	IZQUIERDO

#### VALORACIÓN VASCULAR

CLAUDICACION INTERMITENTE:	SI	NO
PULSO PEDIO	DERECHO	IZQUIERDO
PULSO TIBIAL POSTERIOR	DERECHO	IZQUIERDO
INDICE TOBILLO BRAZO (FECHA ...../...../.....)	DERECHO	IZQUIERDO

#### CLASIFICACIÓN CLINICA DEL RIESGO

RIESGO BAJO	RIESGO AUMENTADO	RIESGO ALTO
<b>REVISION</b>		
ANUAL	SEMESTRAL	TRIMESTRAL
		MENSUAL

## **ANEXO V**

### **NORMAS PARA EL PACIENTE QUE VA A REALIZAR UNA MONITORIZACIÓN AMBULATORIA DE LA PRESIÓN ARTERIAL**

Va usted a realizar una Monitorización Ambulatoria de la Presión Arterial (MAPA), y debe conocer esta información:

- 1-** Se le va a colocar en el brazo un aparato portátil de medición de TA a lo largo de todo un día (24h). Con los resultados obtenidos se tendrá toda la información necesaria para evaluar su presión arterial.
- 2-** El aparato consta de un manguito que estará en el brazo y una pequeña petaca donde se recogerán los datos durante todo el día. Cuando se inicie la lectura de la TA, el manguito se hinchará y usted debe relajar el brazo y ponerlo junto al cuerpo en su posición normal. Normalmente le tomara las TA por el día cada 15 minutos y por la noche cada 30 minutos.
- 3-** Para que el resultado de la prueba sea fiable debe hacer su vida normal y todas las actividades de su vida cotidiana, pero sin realizar ejercicios físicos intensos y evitar situaciones de mucho estrés, en la medida de lo posible.
- 4-** Por último, debe registrar en un papel algunos datos para dárselos a su enfermero al día siguiente cuando le quiten el aparato como son:
  - La hora a la que se va a la cama para descansar.
  - La hora en la que se levanta.
  - Si se ha despertado por la noche, la hora exacta y el número de veces.
  - Si ha descansado igual que siempre o peor.
  - Si le ha ocurrido algún acontecimiento importante que deba ser registrado.

## **ANEXO VI**

### **PROTOCOLO DE MONITORIZACIÓN DE FUNCION CARDIOVASCULAR. ORDEN DE REALIZACIÓN DE LAS EXPLORACIONES Y VALORES DE NORMALIDAD**

#### **1. FRECUENCIA CARDIACA (FC) EN REPOSO**

El paciente no debe haber tomado cafeína ni estimulantes desde al menos 8 horas antes ni haber presentado episodios hipoglucémicos. Tomar la FC en sedestación durante al menos 10 minutos.

**VALORES DE NORMALIDAD: FC < 100 lpm.**

#### **2. RESPUESTA DE PRESIÓN ARTERIAL (PA) SISTÓLICA-DIASTÓLICA y FC AL ORTOSTATISMO**

El paciente no debe haber tomado cafeína ni estimulantes desde al menos 8 horas antes ni haber presentado episodios hipoglucémicos.

Medir la PA y FC tras haber estado el paciente 10 minutos en posición supina y a los 3 minutos de incorporarse.

**VALORES DE NORMALIDAD** (resultado expresado como diferencia ortostatismo – supino)

PA sistólica = -15 a 0 mmHg.

PA diastólica = -5 a +5 mmHg.

FC = 0 a +20 lpm.

Se define como hipotensión ortostática una reducción sostenida de la PA sistólica de al menos 20 mmHg o de la PA diastólica de 10 mmHg durante 3 o más minutos tras adoptar la posición erecta o elevar la cabeza por encima de los 60°.

**3. VARIABILIDAD DE LA FC LATIDO-A-LATIDO PRUEBA  
ESPIRACIÓN / INSPIRACIÓN (E/I) (MONITOR ONE NDX)**

El paciente no debe haber tomado caféina desde la noche anterior ni haber presentado episodios hipoglucémicos.

**VALORES DE NORMALIDAD**

Rango de edad Límite inferior de la normalidad del cociente E/I

20-24 años 1,17

25-29 años 1,15

30-34 años 1,13

35-39 años 1,12

40-44 años 1,10

45-49 años 1,08

50-54 años 1,07

55-59 años 1,06

60-64 años 1,04

65-69 años 1,03

70-75 años 1,02

**4. RESPUESTA DE FC A LA MANIOBRA DE VALSALVA (MONITOR  
ONE NDX)**

VALORES DE NORMALIDAD: Ratio > 1,02

**5. RESPUESTA DE FC AL ORTOSTATISMO (PRUEBA POSTURAL)  
(MONITOR ONE NDX)**

VALORES DE NORMALIDAD: Ratio > 1,03