



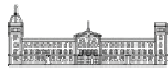
Marcadores de riesgo de Polineuropatía Diabética en la Diabetes tipo 2

Jerónimo Jurado Campos

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Tesis Doctoral

**MARCADORES DE RIESGO DE POLINEUROPATÍA
DIABÉTICA EN LA DIABETES TIPO 2**

Jerónimo Jurado Campos

2015



Health Universitat de
Barcelona
Campus



Jerónimo Jurado Campos

MARCADORES DE RIESGO DE POLINEUROPATÍA DIABÉTICA EN LA DIABETES TIPO 2

Tesis para obtener el título de doctor por la Universitat de Barcelona. Programa de doctorado Medicina

Año 2015



MARCADORES DE RIESGO DE POLINEUROPATÍA DIABÉTICA EN LA DIABETES TIPO 2

Tesis presentada por

JERÓNIMO JURADO CAMPOS

Para obtener el título de doctor por la Universitat de Barcelona

Dirigida por:

Dra. ADELAIDA ZABALEGUI YARNOZ

Dr. JOSEP VIDAL CORTADA

Programa de doctorado Medicina
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Año 2015



La Dra. Adelaida Zabalegui -Directora de Enfermería- y el Dr. Josep Vidal -Jefe del Servicio de Endocrinología-, ambos del Hospital Clínic de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada “**MARCADORES DE RIESGO DE POLINEUROPATÍA DIABÉTICA EN LA DIABETES TIPO 2**”, ha sido realizada, bajo nuestra dirección, por el Sr. Jerónimo Jurado Campos, para optar al grado de Doctor.

Que los artículos que configuran esta tesis cumplen las condiciones exigidas vigentes por la Universidad de Barcelona, para la presentación de tesis doctorales por publicaciones.

Y para que conste, firmamos este documento, a petición de la persona interesada.
Barcelona, febrero de 2015.

Dra. Adelaida Zabalegui

Dr. Josep Vidal

Directora de Enfermería

Jefe del Servicio de Endocrinología

A mi familia
A mis amigos
A mis directores

Agradecimientos

Al Institut Universitari d'Investigació en Atenció Primària (IDIAP) Jordi Gol, por su inestimable soporte científico, ético y administrativo, durante los estudios de la tesis.

Al Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III, por la financiación de los proyectos que permitieron realizar los dos primeros estudios y buena parte del tercero.

A las direcciones/subdirecciones de Atención Primaria de Girona, Institut Català de la Salut.

Al Dr. Juan Ybarra, por su inestimable colaboración en las investigaciones y publicaciones.

A la Dra. Edurne Zabaleta-del-Olmo, por su colaboración en las publicaciones y en la revisión de la tesis.

A todos los investigadores, colaboradores y asociados, de los diferentes proyectos FIS, en especial al Dr. JM Pou i Torelló, quien colaboró durante buena parte de la línea de investigación.

A mi directora de tesis, la Dra. Zabalegui, por su acogida y su orientación en la tesis.

A mi director de tesis, el Dr. Vidal, por su acogida y su orientación en la tesis. Él fue quien despertó mi interés para investigar sobre la diabetes en atención primaria y el primero que me prestó su apoyo y su currículum para conseguir la financiación del primer proyecto.

A todas las personas que aceptaron participar en los estudios.

ABREVIATURAS

- ACE: Enzima conversor de la angiotensina.
- AP: Atención Primaria de Salud.
- DM2: Diabetes mellitus tipo 2.
- DM1: Diabetes mellitus tipo 1.
- ECV: Enfermedad cardiovascular.
- HbA1c: Hemoglobina glicosilada.
- HDL: Lipoproteínas de alta densidad.
- IC: Intervalo de confianza del 95%.
- IMC: Índice de masa corporal.
- LDL colesterol: Lipoproteínas de baja densidad.
- MAU: Microalbuminúria.
- mRNA: Ácido ribonucleico mensajero.
- MNDS: *Michigan Neuropathic Diabetic Scoring*.
- NCDS: Estudio de la Diabetes del Norte de Cataluña.
- NT-pro BNP: *N-terminal pro-brain natriuretic peptide*.
- OR: *Odds Ratio*.
- PCR: Proteína C reactiva.
- PND: Polineuropatía diabética.
- RR: Riesgo Relativo.
- SNPs: *Single nucleotide polymorphisms*.
- TGF β -1: *Transforming Growth Factor β -1*.
- TNF α : *Tumor Necrosis Factor Alpha*.
- UKPDS: *United Kingdom Prospective Diabetes Study*.

ÍNDICE

	Página
Presentación	11
Resumen	13
Resum	15
Abstract	17
Introducción general	19
Objetivos	35
Resultados	37
Resumen artículo 1	39
Artículo 1	41
Resumen artículo 2	53
Artículo 2	55
Resumen artículo 3	67
Artículo 3	69
Resultados globales	81
Discusión	83
Conclusiones	91
Referencias	93
Anexo I	103
Anexo II	105

PRESENTACIÓN

Esta tesis se presenta como un compendio de artículos. Los artículos publican los resultados de las investigaciones correspondientes a cada uno de los objetivos específicos nucleares de la tesis. Ninguno de los artículos presentados en esta tesis se ha utilizado, ni se utilizará, para otra tesis.

Artículo 1

Transforming Growth Factor 1 (TGFB1) as a biomarker of Diabetic Peripheral Neuropathy: Cross-sectional Study. J Diabetes Complicat. 2010; 24(5):306-312.

Artículo 2

Angiotensin converting enzyme gene polymorphisms as a genetic biomarker of diabetic peripheral neuropathy: Longitudinal prospective study. J Diabetes Complicat. 2012; 26(2):77-82.

Artículo 3

Cardiovascular disease predicts diabetic peripheral polyneuropathy in subjects with type 2 diabetes: A 10 year prospective study. Eur J Cardiovasc Nurs. 2014 Dec 19. pii: 1474515114565215. [Epub ahead of print] DOI: 10.1177/1474515114565215.

Los trabajos de esta tesis se enmarcan en el Estudio de la Diabetes del Norte de Cataluña [The North Catalonia Diabetes Study (NCDS)]. El NCDS incluye investigaciones a nivel de atención primaria de salud, sobre la diabetes tipo 2 y sus complicaciones: educación en diabetes y control de factores de riesgo cardiovascular (*Int J Diabetes & Metab* 2006; 14:57-

63); impacto a largo plazo sobre el control metabólico de la supresión de educación especializada en diabetes (*Aten Primaria*. 2009 Dec;41(12):681-7); problemas del pie en la diabetes (*Anales de Patología Vascul* 2007 sept octub 1(3):130-135); recursos y modelos de atención al pie diabético (*Aten Primaria*. 2012;44:394-401); papel de la enfermería de atención primaria en la atención a los problemas del pie (*Tesis Doctorales en Red* <http://www.tdx.cat/TDX-0721109-103806>); prevalencia de enfermedad cardiovascular y factores de riesgo en la diabetes tipo 2 (*J Am Acad Nurse Pract* 2009; 21 (3)140-8); neuropatía diabética y factores de riesgo cardiovascular en edad avanzada (*Endocrinología y Nutrición* 2002; 49(10):316-22); sensibilidad al monofilamento y umbrales de percepción vibratoria (*Nurs Clin North Am* 2007 42(1)59-66); validación de nuevos sistemas de diagnóstico de polineuropatía diabética (*Aten Primaria* 2006; 38(2):116-121); cribado y diagnóstico de la polineuropatía diabética (*Eur J Clin Invest* 2009; 39(3)183-9; *Eur J Clin Invest* 2011; 41(11)1149-63); un marcador biomolecular de enfermedad cardiovascular y la polineuropatía diabética (*Diabetes Care* 2007; Aug; 30(8):e86).

Con éste último tema el NCDS inició la línea de investigación sobre marcadores de riesgo de polineuropatía en la diabetes tipo 2, que prosigue con los trabajos compilados en la tesis.

RESUMEN

La polineuropatía diabética es una complicación muy frecuente en la diabetes tipo 2, el factor de riesgo más importante de úlcera y está involucrada en la mayoría de amputaciones no traumáticas del pie. Su evolución es lenta y silenciosa y, una vez establecida, es sustancialmente irreversible. Disponer de más factor tiempo para una prevención secundaria de la polineuropatía diabética realmente efectiva requiere nuevos enfoques en la investigación de sus marcadores de riesgo.

Objetivos: Investigar posibles marcadores de riesgo, innovadores o poco estudiados, de polineuropatía diabética.

Metodología. Se realizaron tres estudios observacionales en muestras aleatorias de personas con diabetes tipo 2: 1) Descriptivo transversal para evaluar la relación entre los niveles circulantes del Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF β 1) total y la presencia de polineuropatía diabética; 2) Prospectivo de seguimiento a tres años explorando el polimorfismo ("I/D" inserción/ delección) del gen del enzima conversor de la angiotensina (ACE) como factor de riesgo de desarrollar polineuropatía diabética; 3) Prospectivo de seguimiento a diez años, analizando la presencia previa de enfermedad cardiovascular y su relación con la aparición posterior de polineuropatía diabética.

Resultados: El TGF β 1 aparece como una molécula biomarcadora importante para la detección de polineuropatía diabética. El genotipo (D/I) del gen del ACE se erige como un factor protector en el desarrollo de la polineuropatía diabética. A los diez años de

seguimiento, las personas con diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular al inicio del estudio presentaron mayor riesgo de desarrollar polineuropatía diabética.

Conclusiones: Los tres estudios aportan resultados orientados a identificar personas susceptibles de desarrollar polineuropatía diabética. La posibilidad de que dicha identificación se lleve a cabo antes de sus manifestaciones clínicas permitiría anticipar las medidas de prevención secundaria e intensificar las actuaciones sobre sus factores de riesgo.

RESUM

La polineuropatia diabètica és una complicació molt freqüent en la diabetis tipus 2, el factor de risc més important d'úlceres i està involucrada en la majoria d'amputacions no traumàtiques del peu. La seva evolució és lenta i silenciosa i, una vegada establerta, és substancialment irreversible. Disposar de més factor temps per una prevenció secundària de la polineuropatia diabètica realment efectiva exigeix nous enfocaments en la investigació dels seus marcadors de risc.

Objectius: Investigar possibles marcadors de risc, innovadors o poc estudiats, de polineuropatia diabètica.

Metodologia. Es varen fer tres estudis observacionals en mostres aleatòries de persones amb diabetis tipus 2: 1) Descriptiu transversal per avaluar la relació entre els nivells circulants del Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFβ1) total i la presència de polineuropatia diabètica; 2) Prospectiu de seguiment a tres anys explorant el polimorfisme ("I/D" inserció/delecció) del gen de l'enzim conversor de l'angiotensina (ACE) com a factor de risc de desenvolupar polineuropatia diabètica; 3) Prospectiu de seguiment a deu anys, analitzant la presència prèvia de malaltia cardiovascular i la seva relació amb l'aparició posterior de polineuropatia diabètica.

Resultats: El TGFβ1 apareix com una molècula biomarcadora important per la detecció de polineuropatia diabètica. El genotip (D/I) del gen de l'ACE s'erigeix com un factor protector en el desenvolupament de la polineuropatia diabètica. Als deu anys de seguiment,

les persones amb diabetis tipus 2 i malaltia cardiovascular a l'inici de l'estudi presentaren major risc de desenvolupar polineuropatia diabètica.

Conclusions: Els tres estudis aporten resultats orientats a identificar persones susceptibles de desenvolupar polineuropatia diabètica. La possibilitat de que aquesta identificació es dugui a terme abans de les seves manifestacions clíniques, permetria anticipar les mesures de prevenció secundària i intensificar les actuacions envers els seus factors de risc.

ABSTRACT

Diabetic Polyneuropathy (DPN) is the commonest of its microangiopathic complications. It is the main risk factor for ulcers and is involved in the majority of non-traumatic lower extremity amputations.

Its natural history is silent and insidious; nevertheless, once established it substantially irreversible. Hence, new research strategies on DPN risk factors are needed to provide health practitioners with more time for a more efficient secondary prevention.

Objetives: To look after for novel or surrogate DPN risk factors

Methodology: three observational studies were performed on randomly selected samples of patients with Type 2 Diabetes mellitus (T2DM): 1) Descriptive cross-sectional study designed to evaluate the relationship between circulating plasma Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF β 1) and the presence of DPN; 2) Prospective (three years of follow-up) study exploring the Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene single polymorphism ("I/D" insertion/ deletion) as a genetic biomarker of the risk factor for DPN development; 3) Prospective (10 years of follow-up) study assessing the relationship between DPN development and a history of previous cardio-vascular disease (CVD).

Results: TGF β 1 appears as an important biomarker molecule for DPN screening. The (D/I) genotype of the ACE gene polymorphism stands as a protective factor in the development of DPN. After ten year of follow-up, those T2DM patients with prior history of CVD disclose a higher risk of developing DPN.

Conclusions: the three aforementioned studies provide results oriented at identifying potential candidates to develop DPN. This identification is likely to be performed prior to the development of DPN clinical manifestations. The latter would allow implementation of secondary prevention measures and intensify the treatment of its risk factors.

INTRODUCCIÓN GENERAL

LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad crónica caracterizada por un aumento de los niveles de glucosa en la sangre (hiperglucemia), producida por una disminución de la producción de insulina, por una menor acción periférica de ésta, o bien por combinación de ambas. Se trata de una enfermedad compleja con componentes genéticos y ambientales que, por su elevada prevalencia [1] y sus graves complicaciones- especialmente las tardías-, ocasiona una sobrecarga de los servicios asistenciales, padecimiento de los pacientes [2, 3] y considerables costes sociales y económicos [4, 5].

Entre las complicaciones de la DM2 -además de las agudas (hiperglucemia e hipoglucemia)- se incluyen: enfermedades cardiovasculares (insuficiencia cardíaca congestiva, angina de pecho, infarto de miocardio, derrame cerebral, enfermedad arterial periférica), enfermedad ocular (retinopatía diabética), enfermedad renal (nefropatía diabética), apnea obstructiva de sueño, problemas buco dentales y lesiones nerviosas, además del llamado pie diabético. Algunas de esas complicaciones pueden estar ya establecidas en el momento en que se diagnostica la DM2 y cuando se detectan, en general, solo son posibles intervenciones de prevención terciaria o actuaciones paliativas.

LA POLINEUROPATÍA DIABÉTICA

La neuropatía es una complicación microvascular de la DM2 presente entre el 10-40 por ciento de personas en el momento del diagnóstico de la DM2 [6 -8]. Se presenta con diferentes formas clínicas; siendo las más frecuentes la neuropatía diabética autónoma y la periférica. La neuropatía periférica diabética es un trastorno incapacitante muy prevalente. Su manifestación más común es la polineuropatía simétrica distal (PND): la complicación diabética a largo plazo más frecuente y que afecta hasta el 50 por ciento de las personas con DM2 [9, 10].

La PND está considerada el factor de riesgo más importante de ulceración en el pie: presente en un 85 por ciento de personas con problemas del pie diabético e implicada entre entre el 50 y el 75 por ciento de amputaciones no traumáticas del pie [11-13]. Se trata de una “polineuropatía sensitiva motora y simétrica” debida a la diabetes que afecta predominantemente al segmento distal de los miembros inferiores, que se caracteriza por la presencia de síntomas sensitivos (positivos dolorosos y no dolorosos) y de déficit (negativos, con ausencia o disminución de la sensibilidad táctil, vibratoria, térmica, del reflejo aquileo o la artrocinesia, etc.), una variable participación anatómica y una participación muscular que pocas veces es importante [14] aunque marca la gravedad.

La PND puede afectar a fibras sensitivas -con pérdida de percepción dolorosa, un sistema defensivo de agresiones extrínsecas-, a fibras motoras -produciendo atrofia muscular y deformidad ósea, alteración de la marcha y redistribución de las presiones plantares- y a fibras autonómicas -con menos sudoración, lo que favorece las lesiones de la piel-. La pérdida de sensibilidad en el pie, junto a otros factores favorecedores o desencadenantes, puede provocar una úlcera que lleve hasta la amputación.

Su elevada prevalencia y su morbilidad comportan padecimiento para los afectados [3] y un elevado costo social y económico [12, 15]. El aumento de la DM2 en un futuro próximo [16] conllevará más casos de PND y una mayor carga de cuidados y de costes de salud [17].

Diagnóstico de la polineuropatía diabética

En relación con una prueba áurea para el diagnóstico de la PND, la literatura no observa uniformidad. El principal inconveniente que presentan los estudios se relaciona con la evaluación clínica neurológica utilizada. Su determinación objetiva es difícil, mayormente debido a una falta de unidad de criterios diagnósticos y a una baja sensibilidad para detectar formas sutiles de PND [18].

La declaración de consenso de San Antonio [19] recomienda dos o más categorías para diagnosticar la PND. La recomendación incluye hasta cinco categorías [19-21] y en general se acordó que se requieren al menos dos pruebas objetivas de diagnóstico con fines de investigación [21, 22] (Tabla 1).

Tabla 1. Categorías aconsejadas por El Consenso de San Antonio para el diagnóstico de la PND

Categoría	Características	Inconvenientes para la AP
Puntuaciones de los síntomas	Presentes entre un 30-40% de pacientes	A menudo aparecen únicamente durante unos meses
Puntuación del examen físico	Abarca diferentes exploraciones: reflejos, flexión del tobillo, fuerza muscular, propiocepción, etc.	Las escalas de valoración neurológica especializada son complejas y requieren tiempo
Pruebas cuantitativas sensoriales	Potencialmente son útiles para medir el daño sensorial y en estudios de investigación. Factores no orgánicos y simulación de los no enfermos pueden influenciar los resultados.	No existe evidencia científica de que, en ausencia de la misma, puedan utilizarse para diagnosticar la PND
Prueba de la función Autónoma Cardiovascular	Tienen un alto poder predictivo de problemas cardiovasculares y en relación con el pie diabético	Pese a los programas informáticos, requieren mucho tiempo y tienen un alto coste económico.
Estudios de Electrodiagnóstico (electromiografía sensitiva y motora)	Se consideran la herramienta más sensible para diagnosticar la PND. Son pruebas sensibles, específicas y reproducibles	Exigen servicios especializados, un elevado control y especificidad en las condiciones de aplicación, y expertos para su interpretación
Estrictamente, el Consenso de San Antonio aconseja el diagnóstico de la PND en base al menos de una prueba de cada categoría		
Usualmente, para el diagnóstico y el cribado de la PND, se aconsejan pruebas en dos o más categorías.		

Fuente: Adaptada de Jurado et al. *Aten Primaria* 2006; 38(2):116-121.

En un contexto de variabilidad metodológica, nuestra línea de investigación [23-25], atendiendo a criterios de efectividad y eficiencia adecuados para la asistencia primaria de salud (AP), ha desarrollado un método para diagnosticar la PND. El diagnóstico se lleva a cabo mediante una evaluación clínica neurológica de la PND con tres categorías (síntomas, examen físico y varias pruebas sensoriales cuantitativas y semi-cuantitativas) y confirmada mediante estudios de velocidad de conducción nerviosa [25] (Tabla 2).

La correlación estadística entre el diagnóstico clínico de la PND y los estudios de velocidad de conducción nerviosa había sido significativa (Pearson's $r = 0,882$; $P < 0,001$; coeficiente de correlación intraclass $= 0,469$; $P < 0,0001$) [25].

Tabla 2. Valoración clínica neurológica objetiva de la presencia de PND en el NCDS

Valoración	Método
Presencia de síntomas neuropáticos	- Escala simplificada del Neuropathy Symptom Score (NSS)
Afectación bilateral de pruebas de exploración física	- Reflejos aquileos - Fuerza muscular - Flexión del tobillo - Propiocepción, etc.
Pruebas cuantitativas sensoriales	- Pruebas de sensibilidad al dolor y al frío - Sensibilidad vibratoria (Diapasón de escala graduada y Neurotensiómetro) - Sensibilidad al Monofilamento Semmes-Weinstein 5,07-10gr. (Criterios de Olmos y del MNDS).
Pruebas de electro miografía sensitiva y motora (EMG).	
Diagnóstico de PND establecido por la presencia de 2 o más signos o 1 signo y ≥ 3 puntos en la escala del NSS, complementado con las pruebas de EMG.	

Fuente: Adaptada de Jurado et al. *Aten Primaria* 2006; 38(2):116-121.

En las pruebas de reproducibilidad de los umbrales de percepción vibratoria y del monofilamento de Semmes-Weinstein, los coeficientes de correlación intraclass (ICC) de los Análisis de fiabilidad Escala (Alpha) habían sido los siguientes: Neurotensiómetro: Inter-observador, 0,9441 ($P < 0,001$); Intra-observador, 0,9747 ($P < 0,001$); Diapasón de escala graduada: Inter-observador, 0,8927 ($P < 0,001$); Intra-observador, 0,9501 ($P < 0,001$); SW-Monofilamento según el MNDS: Inter-observador, 0,9105 ($P < 0,001$); Intra-observador, 0,9720 ($P < 0,001$) [25].

Estos criterios diagnósticos de la PND se ajustan a la declaración de consenso de San Antonio [19] (Tabla 2) y a las directrices 3 y 4, para estudios de investigación del grupo de expertos en neuropatía diabética de Toronto [26] (Tabla 3). Es en base a esas publicaciones que dichos criterios han sido empleados en los trabajos de esta tesis.

Tabla 3. Definitions of minimal criteria for typical DPN *

1. Possible DSPN. **

The presence of symptoms or signs of DSPN may include the following: symptoms—decreased sensation, positive neuropathic sensory symptoms (e.g., “asleep numbness,” prickling or stabbing, burning or aching pain) predominantly in the toes, feet, or legs; or signs—symmetric decrease of distal sensation or unequivocally decreased or absent ankle reflexes.

2. Probable DSPN.

The presence of a combination of symptoms and signs of neuropathy include any two or more of the following: neuropathic symptoms, decreased distal sensation, or unequivocally decreased or absent ankle reflexes.

3. Confirmed DSPN.

The presence of an abnormality of NC and a symptom or symptoms or a sign or signs of neuropathy confirm DSPN. If NC is normal, a validated measure of small fiber neuropathy (SFN) (with class 1 evidence) may be used.

To assess for the severity of DSPN, several approaches can be recommended: the graded approach outlined above, various continuous measures of sum scores of neurologic signs, symptoms or nerve test scores, scores of function of acts of daily living or of predetermined tasks or of disability. Irrespective of which approach is used, it is necessary to ensure good performance of evaluations with monitoring proficiency.

4. Subclinical DSPN.

The presence of no signs or symptoms of neuropathy are confirmed with abnormal NCs or a validated measure of SFN (with class 1 evidence).

We recommend that definitions 1, 2, or 3 be used for clinical practice and definitions 3 or 4 be used for research studies. S. Tesfaye et al. *Diabetes Care*. 2010 Oct; 33(10): 2285–2293.

*DPN: Neuropatía diabética periférica. ** DSPN: Neuropatía diabética periférica simétrica

Fuente: Adaptado de Tesfaye et al. *Diabetes Care* 2010; 33(10):2285-93.

Incidencia de la polineuropatía diabética

La ausencia de métodos sensibles y robustos para la detección precoz de la neuropatía [27], pudiera justificar los escasos estudios de cohortes sobre la incidencia de PND. Debe reconocerse que la falta de unidad de criterios diagnósticos y la baja sensibilidad para detectar formas sutiles de PND, dificultan la determinación de la incidencia de PND

En este contexto, no conocemos estudios sobre la incidencia de la PND en España y a nivel internacional pocos estudios mencionan la incidencia de la PND en la DM2.

Destacan el estudio UKPDS [28] -que solo utilizó la sensibilidad vibratoria (biotensiómetro ≥ 25 vol)- y el de Costacou [29] que siguen criterios diagnósticos que, en nuestra opinión, infravaloran la presencia de la PND en la DM2. Un estudio de Tesfaye [30], utilizando criterios que consideramos más adecuados, muestra una incidencia acumulada del 23,5 por ciento en siete años pero en personas con diabetes tipo 1. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la historia natural de la DM2 presenta características diferenciales [31]; especialmente en relación con la influencia de la glucemia sobre la prevención de la PND [32], por lo que probablemente la incidencia de PND sea más elevada. Conocer la incidencia de la PND en nuestro ámbito permitiría adecuar los objetivos de prevención.

Factores de riesgo de polineuropatía diabética

Aunque se deben tener presentes las limitaciones derivadas de la variabilidad histórica en el diagnóstico de la PND, las pruebas indican que el factor de riesgo de fondo es la hiperglucemia [31]. Se han descrito otros factores asociados o correlacionados con la PND, como la edad, la calidad del control metabólico (evitando hipoglucemias), la duración de la diabetes, la talla, el tabaquismo, el colesterol y sus subfracciones, y la presencia de ECV [7]. Una revisión de Tesfaye [33] recopila evidencia sobre múltiples factores de riesgo de PND, entre los que se incluyen, además, los niveles elevados de triglicéridos, la obesidad, albuminuria, el perímetro abdominal y la enfermedad vascular periférica.

Todos ellos son factores de riesgo de ECV y componentes del Síndrome Metabólico, entidades clínicas que se caracterizan por presentar una situación inflamatoria y una mayoría de factores de riesgo modificables. De hecho, la American Heart Association considera la DM2 una ECV [34].

De otra parte, en diferentes estudios han observado que, en la DM2, la PND se asocia a la presencia de otras complicaciones microvasculares como la nefropatía y la retinopatía [6, 35], lo cual sugiere un substrato o un mecanismo común en su patogénesis. Aunque en sentido estricto, más que factores de riesgo podrían considerarse predictores de presencia clínica o subclínica de PND.

La práctica clínica y la polineuropatía diabética

El nivel asistencia de AP ocupa un lugar privilegiado para el estudio de la historia natural de la diabetes y de la epidemiología de los factores de riesgo y de sus complicaciones. Permite el estudio de las influencias de los factores psicosociales, familiares y educacionales en la evolución de la enfermedad y en la calidad de vida de las personas con diabetes, así como un seguimiento longitudinal de las intervenciones. Es el nivel asistencial adecuado para las intervenciones prontas sobre estilos de vida y los tratamientos precoces en personas con DM2, que podrían derivar en una acción epigenética de efecto legado, útil para la prevención secundaria y terciaria de la PND.

La evolución lenta y silenciosa de PND es un riesgo conocido ya que una vez establecida, es sustancialmente irreversible. Por lo tanto, es preciso desplegar esfuerzos significativos en la investigación clínica centrada en la prevención y detección temprana de PND. También en sus factores de riesgo, sobre todo a nivel de la AP, donde las medidas de prevención han demostrado eficiencia y eficacia en la atención al paciente, así como en el control de los factores de riesgo modificables [36].

En la práctica, el diagnóstico de la PND se considera únicamente para estimar el riesgo de ulceración en los pies, limitando las intervenciones preventivas a evitar posibles lesiones. Sin embargo, la resolución de los problemas de salud derivados del síndrome del pie diabético no debe limitarse a identificar los espacios de mejora asistencial en su prevención

y tratamiento, [37, 38]. Además del diagnóstico precoz de la PND y de sus factores de riesgo, también se debe considerar la disponibilidad de tiempo para poder anticipar las medidas de prevención secundaria.

En realidad, además del control metabólico de la DM2 [28], con un efecto probablemente mucho menor que en la DM tipo 1 [39], desde hace tiempo se han ido identificando otros factores de riesgo de PND modificables o susceptibles de intervenciones preventivas. Por ejemplo: la tensión arterial [30], el perfil de lípidos [40], causas adicionales (como medicación neurotóxica, déficit de vitamina B1-B6-B12 y el abuso del alcohol) [41-44], e intervenciones sobre el estilo de vida (ejercicio físico y dieta) [45, 46]. También se investiga en nuevas terapias para su tratamiento [33, 47-51], aunque aún no han obtenido resultados plenamente satisfactorios [33, 52].

Por lo tanto, el diagnóstico precoz y la identificación de sus factores de riesgo modificables son esenciales [39]. En dicho sentido, la identificación de los potenciales candidatos a desarrollar PND [53], especialmente si dicha identificación se realiza antes de sus manifestaciones clínicas [54], permitiría anticipar aún más las medidas de prevención secundaria e intensificar las actuaciones sobre los factores de riesgo.

BIOMARCADORES Y MARCADORES DE RIESGO DE PND

La polineuropatía diabética (PND), que se manifiesta con pérdida de sensibilidad en el pie, junto a otros factores, puede provocar una úlcera que lleve hasta la amputación, lo cual hace imprescindible la prevención terciaria mediante la detección precoz del riesgo de ulceraciones con el consecuente ahorro-beneficio. Pero en la PND, especialmente por su papel en el síndrome del pie diabético, el objetivo primordial es evitar tener que recurrir a la prevención terciaria. Para ello es imprescindible disponer de información que permita anticipar las pertinentes intervenciones de promoción de la salud y, en segundo término, llevar a cabo una adecuada prevención secundaria.

La DM2 presenta un cuadro inflamatorio, en ocasiones común con sus complicaciones microvasculares. La estrecha relación entre los factores de riesgo cardiovascular y la PND, sugiere que algunos biomarcadores de riesgo cardiovascular también podrían ser útiles en la identificación de la presencia clínica o subclínica de la PND.

La PND probablemente es una complicación multifactorial con un fondo poligénico y un posible efecto epigenético de los factores ambientales, que está relacionada con otras complicaciones microvasculares de la DM2, por lo que los aspectos genéticos presentes en esas complicaciones podrían relacionarse también con el desarrollo de la PND.

En la DM2 -que se considera una ECV [34]- la asociación de la PND con la presencia de ECV y con sus factores de riesgo [55] sugiere que dichos factores podrían contribuir al desarrollo de la PND, que la ECV y la PND podrían compartir vías patogenéticas o bien componentes inflamatorios [35, 56, 57].

En base a esos razonamientos se consideró el investigar sobre un biomarcador relacionado con la inflamación, un marcador genético presente en otras complicaciones de la DM2 y una enfermedad con factores de riesgo comunes con la PND.

BIOMARCADORES MOLECULARES

Los biomarcadores convencionalmente se definen como “moléculas biológicas que representan estados de salud y enfermedad”. La activa búsqueda actual sobre biomarcadores indirectos que faciliten el diagnóstico de determinadas complicaciones [58], podría servir para detectar/confirmar la presencia clínica/subclínica de complicaciones en la DM2, para medir su progresión y para evaluar los beneficios de las intervenciones.

Por ejemplo, los niveles séricos de mRNA enolasa neuronal específica se reducen en la neuropatía diabética. Además, este marcador molecular también puede ser útil, en personas con diabetes diagnosticadas de neuropatía, para la diferenciación temprana de la enfermedad avanzada del ojo [59]. Un estudio japonés en una gran cohorte con DM2, asoció la albúmina sérica a la severidad de la retinopatía y la neuropatía. En relación con la neuropatía, la albúmina sérica se relacionó con la ausencia del reflejo aquileo, velocidad de conducción nerviosa y parámetros funcionales de los nervios somáticos [es decir, un mínimo de latencia de la onda F (MFWL)] [60].

Entre los posibles biomarcadores, también podemos considerar los relacionados con la enfermedad cardiovascular (ECV) y los relacionados con la situación inflamatoria. Entre los relacionados con la ECV, se encuentra el fragmento terminal de la prohormona N precursor del péptido natriurético cerebral (NT-proBNP) y entre los segundos, el grupo de las citoquinas proinflamatorias como la proteína C Reactiva (PCR), el Tumor Necrosis Factor (TNF) y el Transforming Growth Factor TGF β -1.

Durante las últimas décadas, los biomarcadores se han revelado como herramientas clínicas útiles para la discriminación del riesgo cardiovascular [61]. La estrecha relación entre los factores de riesgo cardiovascular y la PDN, sugiere que algunos biomarcadores de riesgo cardiovascular también podrían ser útiles en la identificación de la PND.

Por ejemplo, nuestra línea de investigación observó una relación significativa entre la PND y el NT-proBNP [62]. El aumento de niveles de NT-proBNP en personas con DM2 y PND probablemente indicaba la presencia de agresiones micro hipóxicas repetitivas para la irrigación arterial de fibras nerviosas, independientemente de la ECV

Entre los marcadores relacionados con la situación inflamatoria, algunas citoquinas como la proteína C Reactiva, además de marcador de riesgo, parecen jugar un papel patogénico en procesos inflamatorios y en el Síndrome Metabólico [63] o en la inflamación subclínica en la PND [56]. Otras como el TNF (factor estimulador de necrosis tumoral) [64, 65] y el TGF β -1 (factor de crecimiento transformante) pueden tener un papel en la patogenia de enfermedades del sistema nervioso por posible amortiguamiento de las respuestas normales, debido a una hiperglucemia persistente, lo que promovería la muerte de células neurogliales [61]. En relación con la PND, la citoquina menos estudiada es el TGF β -1.

El Factor de Crecimiento Transformante Beta 1 (TGF- β ₁)

El TGF- β ₁ es una proteína de secreción multifuncional, codificada por el gen, implicada en el control del crecimiento celular, la proliferación celular y procesos de diferenciación y apoptosis. Su participación como una citoquina efectora clave en la nefropatía diabética ha sido ampliamente descrita [67-71]. Entre los pocos datos disponibles acerca de la asociación de la PND con el TGF β ₁, un informe relaciona el TGF β ₁ con la inducción de daño celular en la neuropatía diabética experimental [72]. Dicha relación sugiere que el péptido vasoactivo TGF β ₁ podría servir como nuevo biomarcador indirecto en la PND en humanos o que podría estar implicado en su patogénesis.

Los criterios principales para su elección como tema de investigación fueron: la PND presenta componentes inflamatorios; la PND se ha relacionado con otros biomarcadores de ECV [56, 62]; el TGF β ₁ es de las citoquinas menos estudiadas en relación con la PND.

MARCADORES GENÉTICOS

Además de la probada asociación entre las complicaciones de la diabetes y el control metabólico, existe una clara predisposición familiar, probablemente enlazada con factores genéticos [73]. Así se desprende del hecho de que una misma familia, independientemente del grado de control metabólico, unos hermanos desarrollen PND y otros no.

La asociación entre las complicaciones microvasculares de la DM2 está demostrada. Por dicho motivo parecía oportuno investigar sobre un aspecto genético asociado a una de sus complicaciones, en este caso relacionado con la nefropatía diabética, pero no de manera concluyente con la PND. Mientras que la relación entre la PND y el gen de la aldosa reductasa [74, 75] está bien documentada, habíamos observado una escasa y contradictoria bibliografía sobre su posible relación con los polimorfismos del gen del enzima conversor de la angiotensina (ACE).

El gen del ACE se localiza en la banda 17q23 del cromosoma 17. En el intron 16 se da un polimorfismo, que consiste en la presencia (I: inserción) o ausencia (D: delección) de un fragmento de 287 pb, y su combinación puede configurar tres genotipos: D/D, D/I, I/I. Se ha descrito la asociación entre genotipos del ACE y el desarrollo de nefropatía diabética [76] y retinopatía diabética [77] e incluso con incremento del riesgo de DM2 [78]. Pese a su asociación con la nefropatía y/o la retinopatía diabéticas, no parece clara la relación del gen del ACE con la PND, puesto que diferentes estudios han observado resultados contradictorios o dispares [79-82].

Los criterios principales para su elección como tema de investigación fueron: la relación entre el gen del ACE y la nefropatía y la de ésta con la PND; las discrepancias observadas en la relación del gen del ACE y la PND; un marcador genético de riesgo de PND posibilita anticipar al máximo las actuaciones en prevención de la salud y de prevención secundaria de la PND.

ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y RIESGO DE PND

Pese a que el control del riesgo cardiovascular ha aumentado en todo el mundo, la ECV sigue siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en personas con DM2 [78]. El hecho de que la DM2 se considere una ECV [34], así como las relaciones observadas entre la neuropatía y factores clásicos de riesgo cardiovascular [55] y los componentes del Síndrome Metabólico (hiperglucemia, hipertrigliceridemia, dislipemia, obesidad, hipertensión arterial) [84-86], sugieren una patogenia común con la lesión vascular en la DM2. Esa consideración como ECV, la relación con sus factores de riesgo y una posible patogenia común, fueron los criterios seguidos para profundizar en el estudio sobre la ECV como factor de riesgo de desarrollar PND.

La relación entre las diferentes formas de neuropatía y la ECV se ha estudiado de manera desigual. Mientras que la relación entre la neuropatía autonómica cardíaca y muerte súbita por ECV está ampliamente probada [87], las pruebas de asociación entre la ECV y la PND se han centrado principalmente en relacionar la presencia de PND con factores de riesgo cardiovascular, en especial mediante estudios transversales [88] que muestran una débil asociación epidemiológica entre la presencia de ECV y de PND. Hasta el inicio de nuestra investigación, la revisión bibliográfica no había identificado ningún estudio prospectivo que asociase la presencia previa de ECV con el desarrollo posterior de PND en personas con DM2.

Los criterios principales para su elección como tema de investigación fueron: la ECV y la PND comparten factores de riesgo; ambas presentan componentes inflamatorios, no conocemos estudios prospectivos que relacionen la ECV y el desarrollo de PND.

JUSTIFICACIÓN

Dado que el factor tiempo es clave en la prevención de la PND, la identificación de las personas susceptibles de desarrollar PND antes de sus manifestaciones clínicas, permitiría anticipar las medidas de prevención secundaria e intensificar las actuaciones sobre los factores de riesgo de la PND.

Si bien los datos disponibles sugieren la implicación de $TGF\beta$ -1 en la patogénesis de la PND en humanos, la relación entre esta citoquina relacionada con la situación inflamatoria es de las menos estudiadas en la PND. Una asociación entre los niveles circulantes del $TGF\beta$ 1 y la presencia de PND podrían sugerir su candidatura como biomarcador de la PND.

La relación entre el polimorfismo del gen del ACE y el desarrollo de complicaciones microvasculares de la diabetes como la retinopatía y la nefropatía podría sugerir que variantes genéticas en este gen pudieran servir como marcador de riesgo de desarrollo de PND. Sin embargo la relación entre polimorfismos del gen del ACE y la PND está poco estudiada, fundamentada en estudios transversales y con resultados dispares. Para validar la asociación en nuestra población, sería necesario un estudio prospectivo que valore las posibles combinaciones de alelos del gen ACE (D/I; D/D; I/I) como factor de riesgo de desarrollar PND.

Finalmente, aunque los datos disponibles sugieren un solapamiento entre la fisiopatología de la PND y la ECV, no conocemos estudios prospectivos sobre la relación entre la presencia de ECV y el desarrollo de PND en personas con DM2. Esta laguna de conocimiento podría subsanarse con el seguimiento clínico de una cohorte de personas con DM2 en quienes analizar la presencia previa de ECV como factor de riesgo en el desarrollo de PND.

En definitiva, la unidad temática de esta tesis incluye una compilación de trabajos orientados a la evaluación de una molécula biomarcadora, un marcador genético y una enfermedad, como nuevos predictores de la PND en la DM2. El objetivo último de esta tesis es contribuir al conocimiento de factores que permitan predecir la aparición de PND y por tanto ganar tiempo en la prevención de esta complicación de la DM2.

HIPOTESIS DE TRABAJO

En base a los antecedentes anteriormente descritos, nuestra hipótesis de trabajo es que en nuestra población la polineuropatía asociada a la diabetes tipo 2 (PND) puede ser predecida a partir de biomarcadores de inflamación, marcadores genéticos que han sido relacionados con otras complicaciones microvasculares de la diabetes, o por la presencia previa de enfermedad cardiovascular con la que la PND comparte aspectos fisiopatológicos.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es identificar nuevos marcadores de riesgo de la PND.

Objetivo específico 1

Evaluar la asociación entre los niveles plasmáticos de TGF β 1 (Transforming Growth Factor) total y la presencia de PND en una muestra de personas con DM2 seleccionada al azar.

Objetivo específico 2

Explorar el polimorfismo del gen del enzima conversor de la angiotensina [ACE] ("I/D" inserción/delección), como predictor de PND en una cohorte con un seguimiento clínico de tres años. Como objetivo secundario, determinar la incidencia de la PND.

Objetivo específico 3

Analizar la presencia previa de ECV como predictor del desarrollo de PND en una cohorte de personas con DM2 con diez años de seguimiento clínico.

Objetivo específico 4

Describir la incidencia de PND en nuestra población a tres y diez años de seguimiento.

RESULTADOS

Con el fin de no afectar a los derechos de “copyright” de las editoriales, la tesis incluye, en formato Word, los resultados de las investigaciones en versiones previas a su publicación.

ARTÍCULO 1



Journal of Diabetes and Its Complications 24 (2010) 306–312



Transforming growth factor beta 1 as a biomarker of diabetic peripheral neuropathy: cross-sectional study[☆]

Juan Ybarra, Josep M. Pou, June Hart Romeo, Javier Merce, **Jeróni Jurado**.

Transforming Growth Factor 1 (TGFB1) as a biomarker of Diabetic Peripheral Neuropathy: Cross-sectional Study.

Journal of Diabetes and its Complications 2010; 24(5):306-312.

Impact Factor: 2,147 (Journal Citation Reports 2010), Q3 (Endocrinology & Metabolism).

Disponible en:

<http://www.jdcjournal.com/article/S1056-8727%2809%2900091-9/abstract>

Elsevier Science Inc. 360 Park Ave South, New York, NY 10010-1710 USA

RESUMEN

Antecedentes: Se necesitan métodos simples y eficientes para detectar la neuropatía periférica diabética PND, la complicación de la diabetes más común y difícil de tratar. En personas con nefropatía diabética se han observado niveles elevados de factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1), sugiriendo que desempeñan un papel inmunomodulador en esta complicación de la DM2 la nefropatía diabética y, posiblemente, en la evolución de la aterosclerosis asociada. Dado que se han descrito relaciones previas entre la PND experimental y el TGFB1, tratamos de evaluar si el TGFB1 podría ser una molécula biomarcador de la PND en humanos.

Materiales y métodos: Estudio transversal centrado en evaluar las interrelaciones entre los niveles de TGFβ1, enfermedad cardiovascular (ECV), nefropatía diabética (DNF) y neuropatía PND en un grupo de personas con DM2 (N=180; 117 varones y 63 mujeres) seleccionados al azar del Estudio de la Diabetes en el norte de Cataluña, tomando en consideración la enfermedad (ECV) y la nefropatía diabética (DNF) como factores de confusión. La PND se diagnosticó mediante evaluación clínica y neurofisiología. La DNF Incipiente se evaluó mediante la microalbuminuria (MAU). La presencia de ECV por la historia clínica y, eventualmente, exploraciones complementarias. El TGFβ1 total (sin acidificación) se determinó por inmuno ensayo [ELISA (Promega)].

Resultados: La PND se relacionó con la edad, duración de la diabetes, MAU, ECV y TGFβ1 (P<0,0001). El Logaritmo del TGFβ1 fue más elevado en los pacientes con PND (P<0,0005). El LogTGFβ1 (OR=7,5; P=0,006), la edad (OR=1,1; P<0,0005), y logMAU (OR=2,0; P=0,016) aparecen como estimadores independientes significativos de la presencia de PND en nuestra serie. La evaluación de la curva ROC integrada con los tres parámetros expresa importante sensibilidad (78,1%), especificidad (76,0%), valor predictivo positivo (79,2%) y valor predictivo negativo (70,3%), en relación con la presencia de PND.

Discusión: Los datos de nuestra serie sugieren que el TGFβ1 es un biomarcador que puede contribuir no sólo a la detección de la DFN sino también de la PND. La validación del valor predictivo del TGFβ1 necesitará de estudios prospectivos.

Palabras clave: Neuropatía diabética periférica, TGFβ1.

Juan Ybarra^a, Josep M. Pou^b, June Hart Romeo^c, Javier Merced^d, **Jeróni Jurado^c**. **Transforming growth factor beta 1 as a biomarker of diabetic peripheral neuropathy: cross-sectional study.** *J Diabetes Complications* 2010; 24(5):306-312.

^a Instituto de Cardiología Avanzada (ICAMED), Centro Medico Teknon, Barcelona, Spain

^b Division of Endocrinology, Hospital de la Sta. Creu i Sant Pau, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

^c Baldwin-Wallace College, Division of Health, Berea, OH, USA

^d Department of Biochemistry, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Autonomous University of Barcelona, Spain

^e Primary Care Center, Catalan Health Institute, Olot, Girona, Spain

☆ Funding: Instituto de Salud Carlos III, FIS PI040181-PI070340, Plan Nacional I+D+I 2004-2007 y Fondos FEDER.

Corresponding author. Instituto de Cardiología Avanzada, Centro Medico Teknon, C/ Vilana 12, 08017-Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 2906459; fax: +34 93 2906458. E-mail address: juanybarra@hotmail.com (J. Ybarra).

Keywords: Diabetic peripheral neuropathy; TGFβ1

ABSTRACT

Background: Simple and efficient screening methods are lacking for diabetic peripheral neuropathy (DPN), the most common and most difficult to treat of the long-term diabetic complications. Increased levels of transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) in type 2 diabetic patients (T2DM) plays an immunomodulatory role in diabetic nephropathy and, possibly, in atherosclerotic evolution. Since preliminary interrelationships between experimental DPN and TGFβ1 have been observed, we sought to assess whether TGFβ1 could be a biomarker molecule for human DPN.

Materials and Methods: Cross-sectional cohort study focused on the assessment of the interrelationships between TGFβ1 levels, cardiovascular disease (CVD), diabetic nephropathy (DNF), and neuropathy (DPN) in a group of T2DM patients (N=180; male 117, female 63) randomly selected from the North Catalonia Diabetes Study. DPN was diagnosed using clinical and neurophysiology evaluation. Incipient DNF was assessed by microalbuminuria (MAU). Total TGFβ1 (without acidification) was measured by immunoassay by ELISA (Promega).

Results: DPN correlated with age, time of diabetes duration, MAU, CVD, and TGFβ1 (P<0.0001). Log-transformed TGFβ1 (logTGFβ1) was significantly higher in patients with DPN than in those without (P<0.0005). LogTGFβ1 (OR=7.5; P=.006), age (OR=1.1; P<0.0005), and logMAU (OR=2.0; P=.016) appear as significant estimators of the occurrence of DPN in our series. The integrated ROC curve evaluation with these three parameters expressed an important sensitivity (78.1%), specificity (76.0%), positive predictive value (79.2%), and negative predictive value (70.3%) in relation to DPN presence.

Discussion: TGFβ1 stands as an important biomarker molecule for DFN and DPN screening in our series. Further prospective studies are warranted.

1. BACKGROUND

Diabetic peripheral neuropathy (DPN) is the most commonly reported long-term diabetic complication, affecting up to 50% of type 2 diabetic patients (T2DM) (Boulton, Malik, Arezzo, & Sosenko, 2004; Vinik, Maser, Mitchell, & Freeman, 2003). Additionally, DPN is

a major contributory factor to foot ulceration and also amputation (Boulton, Vileikyte, Ragnarsson-Tennvall, & Apelqvist, 2005). Thus, screening, and appropriate treatment, for DPN is of paramount importance. This is due particularly to its socioeconomic burden, the impact this has on quality of life, and on associated anxiety and depression (Benbow, Wallymahmed, & Macfarlane, 1998). Simple and efficient methods are needed to detect the diabetic population at high risk of DPN, and progression of the disease should be prevented by controlling the modifiable risk factors (Smith et al., 2006; Tesfaye et al., 2005). T2DM patients without any known cardiovascular disease (CVD) have the same cardiovascular risk as individuals without diabetes who have had a prior cardiovascular event (i.e., myocardial infarction or stroke) (Haffner, Lehto, Ronnema, Pyorala, & Laakso, 1998); however, outcomes after cardiovascular events are significantly worse among patients with diabetes, and approximately 70% of T2DM patients will die from a cardiovascular event or its complications (Stamler, Vaccaro, Neaton, & Wentworth, 1993; Turner et al., 1998).

A number of inflammatory cytokines mediate atherosclerosis. Transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) modulates important events like macrophage and fibroblast chemotaxis, suppression of lymphocyte function, collagen synthesis, and stimulation of extracellular matrix synthesis (Delarue et al., 1998; Hong and Yang, 1994; Jiang et al., 1988; Krag et al., 2000; Reeves and Androly, 2000). Nikol et al. (1992) demonstrated increased expression of TGF β 1 in human atherosclerotic plaques. It was subsequently demonstrated that diabetic patients presenting with an acute myocardial infarction revealed decreased smooth muscle cells (SMCs) and increased macrophages and TGF- β 1 into the culprit lesion (Fukumoto, Naito, Asano, & Aramaki, 1998).

Furthermore, TGF β 1 induces renal hypertrophy and fibrosis, and cytokines like tumor necrosis factor-alpha (TNF α), chemoattractant protein-1 (MCP-1), and regulated upon activation and normal T cell expressed and secreted (RANTES) mediate macrophage infiltration into kidney. Overexpression of these chemokines leads to glomerulosclerosis and interstitial fibrosis (Blobe, Schiemann, & Lodish, 2000; Chantry, Turner, Abney, & Feldmann, 1989; Fukumoto et al., 1998; Navarro and Mora, 2006).

Biomarkers have emerged in the last decade as useful tools for the clinician in the discrimination of cardiovascular risk (Shlipak, Ix, Bibbins-Domingo, Lin, & Whooley, 2008). Our group recently reported a novel significant relationship between DPN and NT-proBNP, independently of previous CVD in a cross-sectional study involving T2DM patients. Increased NT-proBNP levels would presumably indicate the presence of repetitive microhypoxic insults to nerve fibers' arterial supply independently of CVD (Jurado, Ybarra, Ferrandiz, Comerma, & Pou, 2007).

Few data are available regarding the association between DPN and TGF β 1 besides a recent report of TGF β 1 inducing cellular injury in experimental diabetic neuropathy (Anjaneyulu et al., 2008). Thus, we hypothesized that TGF β 1 might serve as a novel biomarker for human DPN and/or it could be implicated in its pathogenesis. Hence, we set forth a cross-sectional pilot study, to assess the hypothetical relationships between TGF β 1 levels, CVD, DNF [microalbuminuria (MAU)], and DPN in a group of T2DM patients randomly selected from the North Catalonia Diabetes Study (Jurado, Ybarra, Romeo, & Pou, 2009).

2. MATERIALS AND METHODS

A cross-sectional cohort study was performed in three different regions of North Catalonia (Spain) as part of the labors of the North Catalonian Diabetes Study on long-term complications (Jurado et al., 2009). The sample number of the cohort was related to DPN prevalence, about 30%, with a precision of 5% and a confidence interval of 95%. One

hundred ninety-two (N=192) T2DM patients (aged 30 to 69 years) were randomly recruited from our T2DM population and 180 (N=180) met the inclusion criteria. No difference was observed between the sample and the general population with T2DM concerning sex and age (confidence interval: 95%).

Selection criteria have been described extensively elsewhere (Jurado et al., 2009) Clinical data on CVD were obtained as follows: coronary artery disease (CAD), stroke, and peripheral vascular events were evaluated by medical records revision. CAD was diagnosed by one of the following criteria: (1) previous documented myocardial infarction; (2) past medical history of symptoms of angina, confirmed by a positive treadmill test or significant positive result on coronary angiograms or on thallium scan.

Cerebrovascular disease was defined by (1) previous stroke and/or (2) evidence of stenosis $\geq 50\%$ for carotid vessels at Doppler echography. Peripheral vascular disease was defined by the presence of (1) intermittent claudication, (2) previous vascular surgery, and/or (3) by Doppler echography or abdominal-iliac-femoral angiograms.

Patients were studied by a team of 28 health care providers including 16 nurses and 12 general practitioners between September 2005 and September 2007. All examinations in each patient were performed by two health care providers. All participants gave informed written consent to participate, and the study was approved by the primary care ethics committee and by the J. Gol i Gurina Foundation. The study was carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki as revised in 2000.

Diabetic peripheral neuropathy (DPN) diagnosis was based on clinical neurological examination (CNE) as well as on the Neuropathy Symptoms Score which was described previously (Jurado et al., 2009; Tesfaye et al., 2005). To confirm the validity of CNE for DPN diagnosis, in borderline subjects (i.e., those with dubious diagnosis; n=77), nerve conduction studies (by Synergy T-EPEMG/EP) were performed in sural, median, and ulnar nerves for upper extremities and in peroneal and tibial nerves for lower extremities (sensory and motor nerve conduction velocities), as described previously (Jurado, Caula, & Pou, 2006).

Incipient DNF was defined by MAU [urinary albumin concentration between 20 and 300 mg/l (twice minimum) out of four early morning urine spots collected 12 months apart]. Asymptomatic urinary tract infections as potential confounders for MAU prevalence were taken into account. Thus, urine cultures were performed simultaneously in all received urine spots. Positive urine cultures invalidated the sample. Patients with macroalbuminuria (≥ 300 mg/l) were excluded.

Biochemical analyses were performed according to the protocols of a unique laboratory. Briefly, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol), fast-ing glucose, creatinine, triglycerides, and uric acid were analysed using spectrophotometry methods (Hitachi Modular-Roche Diagnostics). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol) was analysed using Friedwald's formula for triglyceride concentrations below 400 mg/dl. Micro-albuminuria was assessed by immunoturbidimetry (Hitachi Modular-Roche Diagnostics, San Cugat del Valles, Barcelona, Spain). HbA_{1c} was analyzed using HPLC (Hi-AUTO A1C HA-8140 A. Menarini Diagnostics, Barcelona, Spain). TGF β 1 was analyzed as a total peptide without acidification. Variability was higher for free than for total TGF β 1. Total TGF β 1 was measured by ELISA (Promega, Madison, WI, USA). Intra-assay and interassay coefficients of variation were 3–4% and 7–9%, respectively.

2.1. Statistical analysis

Qualitative variables were given in percentages and number of cases. Quantitative variables were expressed as mean and standard deviation. The distribution of variables was evaluated using Kolmogorov–Smirnov's test, while Levene's test was used to assess variance homogeneity. Nonparametric tests were employed for variables not following normal distributions.

Tests of reproducibility [intraclass correlation coefficients, reliability analysis], intra- and interobserver for vibration perception threshold, and Semmes–Weinstein monofilament (SF-MF) were calculated. The relationship between DPN and other variables was evaluated by contingency tables and chi square (χ^2) with Fisher's correction if necessary as well as with Pearson's correlation coefficient. Student's t test was used when mean values were compared.

Logistic regression was performed to predict variables related to DPN presence or absence. In our model, all introduced variables were related to significant values ($P < 0.05$) or when significant values manifested some tendency ($P < 0.10$). We used the forward method. The removal of variable from the model was based on the significance of the change in the likelihood ratio. Since 98% of the patient cohort was under statin treatment and the latter was susceptible to influencing lipid profiles, these were excluded whenever performing multiple regression analysis. We calculated the Hosmer and Lemeshow test for good fit. Area under the curve from ROC was calculated to assess sensitivity and specificity. A value of 5% ($\alpha = 0.05$) was the level of significance. Data were analyzed by the SPSS 11.5 statistical package (SPSS, Chicago, IL, USA).

3. RESULTS

Baseline characteristics of the patients are depicted in Table 1. As shown, our patient cohort was composed of 180 (N=180) T2DM patients in their 60s, with a 1.8-fold male prevalence. Diabetes evolution averaged 9.4 ± 0.7 years and their body mass index (BMI) was in the high-overweight range (BMI = 29.7 kg/m^2), while 25% of the patient cohort was obese (data not shown). Fifty percent of the cohort was on insulin therapy, while the other half was on oral agents. Most patients (98%) were on statins (data not shown).

The prevalence of DPN and nephropathy was 40.6% and 22%, respectively (Table 1). No gender differences were observed regarding DPN's prevalence [men: 21.69% (CI: 15.76–27.62); women: 25.42% (CI: 17.45–33.4)].

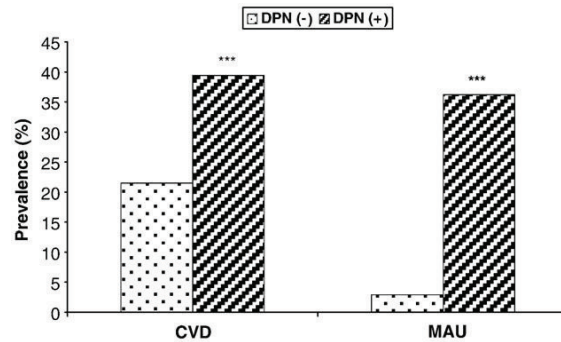
Table 1. Clinical and biochemical characteristics of the study population

N (gender)	180 (male 117, female 63)	Microalbuminuria (mg/l)	76 ± 33.6 (0.0–286)
Age (years) (range)	61.7 ± 7.8 (36–74)	TGF β 1 ($\mu\text{g/ml}$)	28.6 ± 2.6 (2.23–322.2)
Diabetes duration (years)	9.4 ± 0.7	Triglycerides (mg/dl)	152 ± 128 (14–1057)
Caucasians	100%	Cholesterol (mg/dl)	194 ± 39 (115–318)
BMI (kg/cm^2)	29.7 ± 5.1 (20.7–47.6)	HDL (mg/dl)	55.4 ± 13.4 (12–98)
Systolic BP (mmHg)	140.50 ± 19.90 (100–203)	LDL (mg/dl)	111.8 ± 40.9 (22–377)
Diastolic BP (mmHg)	79.20 ± 10.10 (50–120)	Creatinine (mg/dl)	1.0 ± 0.8 (0.4–2.2)
Fasting glucose (mg/dl)	152 ± 38.8 (34–360)	DPN prevalence (CI)	40.6 ± 3.7 (33–47)
HbA _{1c} (%)	7.1 ± 0.1 (3.7–13.1)	CVD prevalence (CI)	25.4 ± 3.2 (0–100)

T2DM patients with DPN showed significantly higher prevalence of CVD (39.4% vs. 21.5%; $P < 0.0005$), diabetic retinopathy (35.4% vs. 9.4%; $P < 0.0005$), and MAU (36.2% vs. 2.9%; $P < 0.0005$) than those without (Fig. 1).

Log-transformed TGF β 1 (logTGF β 1) was significantly higher in patients with DPN than in those without (1.42 ± 0.28 vs. $1.18 \pm 0.31 \mu\text{g/ml}$, respectively; $P < 0.0005$) (data not shown). The reproducibility of several diagnostic tests employed in DPN's diagnosis is demonstrated in that all five tests (graded tuning fork, neurothesiometer, SW-MF, Neuropathy Symptoms Score, and the Aquilean reflex) showed a high value of intraclass

correlation coefficients.



DPN: Diabetic polyneuropathy, CVD: Cardiovascular disease, MAU: microalbuminuria/diabetic nephropathy.

Fig. 1. Prevalence of diabetic micro- and macroangiopathy in our type 2 diabetic population with (+) and without (-) DPN (DPN). $P < 0.0005$.

Borderline subjects (those with dubious DPN diagnosis by CNE; $n=77$) underwent nerve conduction studies (NCS). Confronting DPN diagnosis by NCS and CNE showed an intraclass correlation coefficient of 0.469 ($P < 0.0001$) (data not shown).

Univariate regression analysis disclosed DPN being significant and positively related to age, duration of diabetes, CVD, incipient DNF (logMAU), diabetic retinopathy, and TGF β 1, while significantly negative correlations were disclosed with total and LDL cholesterol (Table 3). Finally, no significant relationship appeared between DPN and gender, BMI, waist circumference, hypertension, fasting blood glucose, HbA_{1c}, creatinine, HDL-cholesterol, and triglycerides.

Three parameters, selected by logistic regression analysis (Table 3), were used to predict the diagnosis of DPN (log TGF β 1, logMAU, and age). The integrated ROC curve evaluation with these three parameters expressed an important sensitivity (78.1%), specificity (76.0%), positive predictive value (79.2%), and negative predictive value (70.3%) in relation to DPN presence.

4. DISCUSSION

Surrogate markers of diabetic neuropathy are being actively sought to facilitate the diagnosis, measure the progression, and assess the benefits of therapeutic intervention in patients with diabetic neuropathy.

Serum levels of neuron-specific enolase mRNA are decreased in diabetic neuropathy. Additionally, this molecular marker may also be useful in differentiating early from advanced eye disease in those diabetics diagnosed with neuropathy (Sandhu, Butt, Powrie, & Swaminathan, 2008).

On the other hand, an independent association between heat shock protein 27 (HSP27) and distal symmetric polyneuropathy has been reported in a large cohort of type 1 diabetic subjects, suggesting that sHSP27 levels may be a novel marker for diabetic neuropathy (Gruden et al., 2008).

Serum albumin has been reported to be significantly associated with the severity of retinopathy and neuropathy in a large cohort of Japanese T2DM. Noteworthy, in relation to neuropathy, serum albumin was found to be significantly related to the absence of Achilles tendon reflex, motor nerve conduction velocity, and somatic nerve function parameters [i.e., minimum F-wave latency (MFWL)]. The results of multiple regression analysis with adjustment for three variables (age, gender, serum C-reactive protein) revealed

that serum albumin was independently related to MNCV and MFWL (Iwasaki, Togashi, & Terauchi, 2008).

In vivo corneal confocal microscopy (CCM) allows assessment of small nerve fiber pathological changes. This novel technique quantifies small fiber damage rapidly and noninvasively and detects earlier stages of nerve damage compared with intraepidermal nerve fiber pathology in T2DM. Thus, CCM shows promise as an ideal technique to accurately diagnose and assess progression of human diabetic neuropathy (Quattrini et al., 2007).

The most novel finding in our study is the significant prediction of categorical diagnosis of DPN by three independent factors: logTGF β 1 levels, incipient DNF (logMAU), and age with notable sensitivity and specificity. Noteworthy, TGF β 1 appears as a new biomarker molecule for DPN's diagnosis.

As detailed previously, the main purpose of this study was to assess the hypothetical relationships between TGF β 1 levels, CVD, and microangio-pathic complications (i.e., incipient DNF, DPN) in a group of T2DM patients randomly selected from the North Catalonia Diabetes Study.

Our data show that the prevalence of microangiopathic complications (Table 1) as well as the lack of gender bias falls in agreement with previous reports (Rubino et al., 2007; Tesfaye et al., 2005). Furthermore, the reproducibility of several diagnostic tests employed in DPN's diagnosis in our patient cohort disclosed highly significant intraclass correlation coefficients, yielding proof of good internal consistency and in agreement with previous reports (Dyck et al., 1991).

The significant positive correlations between DPN vs. age and diabetes duration (illustrated in Table 2) are in agreement with the literature (Partanen et al., 1995), whereas those with MAU have also been the subject of several reports (Hadi and Suwaidi, 2007; Partanen et al., 1995; Pedersen and Gaede, 2003), some of them suggesting a common soil for the diabetic microvascular complications.

Table 2. Univariate regression analysis DPN (r)

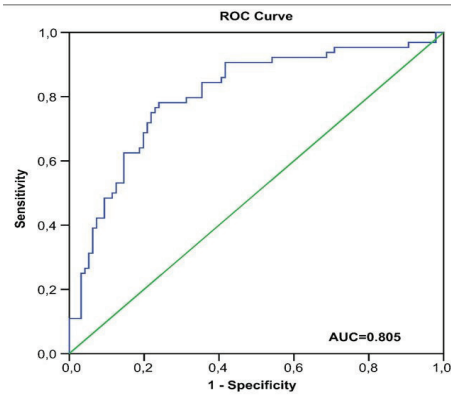
Age	0.401		
Duration of DM	0.320	HbA _{1c}	0.042
Sex	0.023	Creatinine	0.141
CVD	0.194	LogMAU	0.271
BMI	0.086	Cholesterol (mg/dl)	-0.259
WC	0.072	HDL (mg/dl)	-0.051
SBP	-0.054	LDL (mg/dl)	-0.207
DBP	-0.114	Triglycerides (mg/dl)	-0.117
Fasting blood glucose	-0.030	logTGF β 1 (μ g/dl)	0.361

Pearson's correlation coefficient was used for continuous variables and Spearman's correlation coefficient for categorical variables (gender, CVD). WC: Waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; RNP: diabetic retinopathy. P<0.001. P< 0.0005.

Noteworthy, the second more robust correlation between DPN and the variables depicted in Table 3 concerns TGF β 1 (r =0.361; P<0.0005). This particular correlation (DPN vs. TGF β 1) has not, to the best of our knowledge, been described previously in human clinical settings; nevertheless, recent experimental data seem to suggest a role for TGF β 1 in experimental diabetic neuropathy (Anjaneyulu et al., 2008). One likely explanation for this correlation might be found in DPN's etiology which is complex and multifactorial: hyperglycemia and dyslipidemia give rise to oxidative stress and formation of advanced glycation and lipoxidation end products. The inflammatory mediators (i.e., TGF β 1) lead to nuclear factor kappa B (NFkappaB) activation (Cameron and Cotter, 2008). Moreover, genes found down-regulated in response to TGF β 1 are mainly those associated with

oxidative stress (i.e., NFkappaB) and several other genes implicated in glutathione production and maintenance (Roberts et al., 2004).

Table 3. Logistic regression analysis was performed to predict variables related to DPN presence or absence



	Coefficient	Significance	OR	95 % CI for OR	
				Lower	Upper
Age	0.102	0.000	1.107	1.046	1.172
logMAU	0.707	0.016	2.029	1.139	3.610
Log TGFβ1	2.016	0.006	7.506	1.808	31.155
Constant	-10.163	0.000	0.000		

Hosmer and Lemeshow Test (p = 0.274)

Sensitivity=78.1%
 Specificity=76.0%
 PPV=79.2%
 NPV=70.3%

ROC: Receiver operating characteristics curve; PPV: positive predictive value; NPD: negative predictive value.

An *in vitro* model qualitatively reproducing diabetic foot ulcer conditions [i.e., changes in relevant cell populations (macrophages, neutrophils, fibroblasts) and their key effector cytokines (TNF, interleukin-1beta, interleukin-10, and TGFβ1)] has shown that the genesis of diabetic foot ulcers can be simulated in two ways, either by increasing the rate of TNF production fourfold or by decreasing the rate of TGFβ1 production by 67%. Both manipulations resulted in increased inflammation (elevated neutrophils, TNF, and tissue damage) and delayed healing (reduced TGFβ1 and collagen) (Mi, Rivière, Clermont, Steed, & Vodovotz, 2007).

The negative significant correlation between DPN vs. total and LDL-cholesterol levels in our series (illustrated in Table 2) is a novel and provocative one. It falls in disagreement with previous reports (Agrawal, Sharma, Pal, Kochar, & Kochar, 2006; Benjafield, Glenn, Wang, Colagiuri, & Morris, 2001; Tsuzura et al., 2004). Noteworthy, Agrawal et al. (2006) have reported significant correlations between diabetic retinopathy and nephropathy with low HDL-cholesterol and raised LDL-cholesterol, respectively; nevertheless, no correlations were reported between DPN and lipid profiles. Conversely, Tsuzura et al. (2004) have reported significantly higher ratios of oxidized LDL-cholesterol corrected by ApoB in T2DM patients with peripheral neuropathy compared to those without. Furthermore, genetic variation in or near the TNF receptor 2 gene may predispose clinical neuropathy, reduced glycosylated hemoglobin, and increased HDL cholesterol in T2DM (Benjafield et al., 2001). In this particular study, lipid profiles were indistinguishable between T2DM with or without peripheral neuropathy.

The fact that almost the entire patient cohort was on statin treatment is likely to alter the relationship between lipid profiles and DPN's diagnosis and become a serious potential confounder. Additionally, those patients with more severe forms of DPN received more aggressive statin treatment. The latter is likely to bias these negative correlations for which we do not have any other physiopathological explanation. Yet we believe it would be a breach of scientific integrity not to report it.

DPN itself is reported to be a risk factor for cardiovascular mortality in T2DM in addition to coexisting macroangio-pathy, increased albumin excretion rate, and poor glycaemic control (Gerstein, Mann, & Yi, 2001; Schneider, 2006). Noteworthy, in our series, T2DM with DPN have significantly higher prevalence of CVD, diabetic retinopathy, and DFN than those without (Fig. 1), in agreement with these previous reports.

The involvement of TGF β 1 as a key cytokine effector in DFN has been widely reported in the literature (Delarue et al., 1998; Hong and Yang, 1994; Jiang et al., 1988; Krag et al., 2000; Reeves and Androly, 2000); while the involvement of TGF β 1 is a novel one in clinical research, only an experimental neuropathy study reports the involvement of this vasoactive peptide (Anjaneyulu et al., 2008).

LogTGF β 1, age, and logMAU are all significant estimators of the occurrence of DPN in our series. Furthermore, with control for the effects of age and MAU, logTGF β 1 above 31.6 has 4.5 times the odds of predicting DPN in our series (Table 3). These results have not, to the best of our knowledge, been previously reported in the literature.

Finally, the statistical accuracy (sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value) of these three independent variables (logTGF β 1, age, and logMAU) in predicting DPN falls within acceptable levels in the literature (Dyck et al., 1991; Partanen et al., 1995; Tesfaye et al., 2005).

In conclusion, simple efficient methods are needed to detect the diabetic population at high risk of DPN and progression of the disease should be prevented by controlling the modifiable risk factors. In our series, DPN's categorical diagnosis can be significantly and independently predicted by TGF β 1, DFN, and age. Accordingly, TGF β 1 not only appears as a key effector cytokine in DFN but also seems to display significant independent correlations with diabetic neuropathy and, hence, could be used as a novel biomarker molecule for DPN diagnosis. Further prospective studies are warranted.

REFERENCES

- Agrawal, R. P., Sharma, P., Pal, M., Kochar, A., & Kochar, D. K. (2006). Magnitude of dyslipidemia and its association with micro and macro vascular complications in type 2 diabetes: A hospital based study from Bikaner (Northwest India). *Diabetes Research and Clinical Practice*, 73, 211–214.
- Anjaneyulu, M., Berent-Spillson, A., Inoue, T., Choi, J., Cherian, K., & Russell, J. W. (2008). Transforming growth factor-beta induces cellular injury in experimental diabetic neuropathy. *Experimental Neurology*, 211, 469–479.
- Benbow, S. J., Wallymahmed, M. E., & Macfarlane, I. A. (1998). Diabetic peripheral neuropathy and quality of life. *Quarterly Journal of Medicine*, 91, 733–737.
- Benjafield, A. V., Glenn, C. L., Wang, X. L., Colagiuri, S., & Morris, B. J. (2001). TNFRSF1B in genetic predisposition to clinical neuropathy and effect on HDL cholesterol and glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 24, 753–757.
- Blobe, G. C., Schiemann, W. P., & Lodish, H. F. (2000). Role of transforming growth factor β in human disease. *New England Journal of Medicine*, 342, 1350–1358.
- Boulton, A. J., Malik, R. A., Arezzo, J. C., & Sosenko, J. M. (2004). Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care*, 27, 1458–1486.
- Boulton, A. J. M., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G., & Apelqvist, J. (2005). The global burden of diabetic foot disease. Review. *Lancet*, 366, 1719–1724.

- Chantry, D., Turner, M., Abney, E., & Feldmann, M. (1989). Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta. *Journal of Immunology*, 142, 429–435.
- Cameron, N. E., & Cotter, M. A. (2008). Pro-inflammatory mechanisms in diabetic neuropathy: Focus on the nuclear factor kappa B pathway. *Current Drug Targets*, 9, 60–67.
- Delarue, J., Maingourd, C., Couet, C., Vidal, S., Bagros, P., & Lammise, F. (1998). Effects of oral glucose on intermediary metabolism in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients versus healthy subjects. *Peritoneal Dialysis International*, 18, 505–511.
- Dyck, P. J., Kratz, K. M., Lehman, K. A., Karnes, J. L., Melton, L. J., III, O'Brien, P. C., Litchy, W. J., Windebank, A. J., Smith, B. E., & Low, P. A. (1991). The Rochester Diabetic Neuropathy Study: Design, criteria for types of neuropathy, selection bias, and reproducibility of neuropathic tests. *Neurology*, 41, 799–807.
- Fukumoto, H., Naito, Z., Asano, G., & Aramaki, T. (1998). Immunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques associated with myocardial infarction and diabetes mellitus. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 5, 29–35.
- Gerstein, H. C., Mann, J. F., & Yi, Q. (2001). Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and non diabetic individuals. *Journal of the American Medical Association*, 286, 421–426.
- Gruden, G., Bruno, G., Chaturvedi, N., Burt, D., Schalkwijk, C., Pinach, S., Stehouwer, C. D., Witte, D. R., Fuller, J. H., & Perin, P. C. (2008). Serum heat shock protein 27 and diabetes complications in the EURODIAB prospective complications study: A novel circulating marker for diabetic neuropathy. *Diabetes*, 57(7), 1966–1970.
- Hadi, H. A., & Suwaidi, J. A. (2007). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vascular Health Risk Management*, 3, 853–876.
- Haffner, S. M., Lehto, S., Ronnema, T., Pyorala, K., & Laakso, M. (1998). Mortality for coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, 339, 229–234.
- Hong, S. Y., & Yang, D. H. (1994). Insulin levels and fibrinolytic activity in patients with end-stage renal disease. *Nephron*, 68, 329–333.
- Iwasaki, T., Togashi, Y., & Terauchi, Y. (2008). Significant association of serum albumin with severity of retinopathy and neuropathy, in addition to that of nephropathy, in Japanese type 2 diabetic patients. *Endocrine Journal*, 55(2), 311–316.
- Jiang, X., Kanai, H., Shigehara, T., Maezawa, A., Yano, S., & Naruse, T. (1988). Metabolism of transforming growth factor-beta in patients receiving haemodialysis specially those with renal osteodystrophy. *Renal Failure*, 20, 135–145.
- Jurado, J., Caula, J., & Pou, J. M. (2006). Selection of risk and diagnosis in DPN. Validation of method of new systems. *Atencion Primaria*, 38, 116–121.
- Jurado, J., Ybarra, J., Ferrandiz, M., Comerma, L., & Pou, J. M. (2007). Is the aminoterminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) a marker for DPN? *Diabetes Care*, e86, 30.
- Jurado, J., Ybarra, J., Romeo, J. H., & Pou, J. (2009). Clinical screening and diagnosis of diabetic polyneuropathy: The North Catalonia Diabetes Study. *European Journal of*

- Clinical Investigation, 39(3), 183–189.
- Krag, S., Osterby, R., Chai, Q., Nielsen, C. B., Hermans, C., & Wogensen, L. (2000). TGF β_1 -induced glomerular disorders is associated with impaired concentrating ability mimicking primary glomerular disease with renal failure in men. *Laboratory Investigation*, 80, 1855–1958.
- Mi, Q., Rivière, B., Clermont, G., Steed, D. L., & Vodovotz, Y. (2007). Agent-based model of inflammation and wound healing: Insights into diabetic foot ulcer pathology and the role of transforming growth factor-beta1. *Wound Repair and Regeneration*, 15, 671–682.
- Navarro, J. F., & Mora, C. (2006). Diabetes, inflammation, proinflammatory cytokines, and diabetic nephropathy. *Scientific World Journal*, 6, 908–917.
- Nikol, S., Isner, J. M., Pickering, J. G., Kearney, M., Leclerc, G., & Weir, L. (1992). Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions. *Journal of Clinical Investigation*, 90, 1582–1592.
- Partanen, J., Niskanen, L., Lehtinen, J., Mervaala, E., Siitonen, O., & Uusitupa, M. (1995). Natural history of peripheral neuropathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 333, 89–94.
- Pedersen, O., & Gaede, P. (2003). Intensified multifactorial intervention and cardiovascular outcome in type 2 diabetes: The Steno-2 study. *Metabolism*, 52, 19–23.
- Quattrini, C., Tavakoli, M., Jeziorska, M., Kallinikos, P., Tesfaye, S., Finnigan, J., Marshall, A., Boulton, A. J., Efron, N., & Malik, R. A. (2007). Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy. *Diabetes*, 56(8), 2148–2154.
- Reeves, W. P., & Androly, T. E. (2000). Transforming growth factor α contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 7667–7669.
- Roberts, R. A., Michel, C., Coyle, B., Freathy, C., Cain, K., & Boitier, E. (2004). Regulation of apoptosis by peroxisome proliferators. *Toxicology Letters*, 149, 37–41.
- Rubino, A., Rousculp, M. D., Davis, K., Wang, J., Bastyr, E. J., & Tesfaye, S. (2007). Diagnosis of diabetic peripheral neuropathy among patients with type 1 and type 2 diabetes in France, Italy, Spain, and the United Kingdom. *Primary Care Diabetes*, 1(3), 129–134.
- Sandhu, H. S., Butt, A. N., Powrie, J., & Swaminathan, R. (2008). Measurement of circulating neuron-specific enolase mRNA in diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137, 258–263.
- Schneider, C. A. (2006). Improving macrovascular outcomes in type 2 diabetes: Outcome studies in cardiovascular risk and metabolic control. *Current Medical Research and Opinion*, 22(Suppl 2), S15–S26.
- Shlipak, M. G., Ix, J. H., Bibbins-Domingo, K., Lin, F., & Whooley, M. A. (2008). Biomarkers to predict recurrent cardiovascular disease: The Heart and Soul Study. *American Journal of Medicine*, 121, 50–57.
- Smith, A. G., Russell, J., Feldman, E. L., Goldstein, J., Peltier, A., Smith, S., Hamwi, J., Pollari, D., Bixby, B., Howard, J., & Singleton, J. R. (2006). Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy. *Diabetes Care*, 29, 1294–1299.
- Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J. D., & Wentworth, D. (1993). Diabetes, other risk

factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*, 16, 434–444.

Tesfaye, S., Chaturvedi, N., Eaton, S. E., Ward, J. D., Manes, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Witte, D. R., & Fuller, J. H., for the EURODIAB Prospective Complications Study Group. (2005). Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *New England Journal of Medicine*, 352, 341–350.

Tsuzura, S., Ikeda, Y., Suehiro, T., Ota, K., Osaki, F., Aii, K., Kumon, Y., & Hashimoto, K. (2004). Correlation of plasma oxidized low-density lipoprotein levels to vascular complications and human serum paraoxonase in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*, 53, 297–302.

Turner, R. C., Millns, H., Neil, H. A., Stratton, I. M., Manley, S. E., Matthews, D. R., & Holman, R. R. (1998). Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *British Medical Journal*, 316, 823–828.

Vinik, A. I., Maser, R. E., Mitchell, B. D., & Freeman, R. (2003). Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*, 26, 1553–1579.

ARTÍCULO 2

Journal of Diabetes and Its Complications 26 (2012) 77–82



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Diabetes and Its Complications

journal homepage: WWW.JDCJOURNAL.COM



Angiotensin-converting enzyme gene single polymorphism as a genetic biomarker of diabetic peripheral neuropathy: longitudinal prospective study

J. Jurado, J. Ybarra, J.H. Romeo, M. Garcia, E. Zabaleta-del-Olmo.

Angiotensin converting enzyme gene polymorphisms as a genetic biomarker of diabetic peripheral neuropathy: Longitudinal prospective study.

Journal of Diabetes and its Complications 2012; 26(2):77-82.

Impact Factor: 2,056 (Journal Citation Reports 2012), Q3 (Endocrinology & Metabolism).

Disponible en:

<http://www.jdcjournal.com/article/S1056-8727%2812%2900013-X/abstract>

Elsevier Science Inc. 360 Park Ave South, New York, NY 10010-1710 USA

RESUMEN

Antecedentes: La identificación de pacientes en riesgo de desarrollar neuropatía periférica diabética (PND) es de suma importancia en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) para proveer y prever las medidas de prevención secundaria, así como intensificar la acción sobre los factores de riesgo, particularmente en la atención primaria. Diversos estudios han asociado el polimorfismo del gen del enzima conversor de la angiotensina (ACE) con la incidencia de otras complicaciones de la DM2 como la retinopatía y la nefropatía. Por otro lado la incidencia de la PND sigue siendo desconocida en nuestro medio.

Objetivos: (i) Analizar el polimorfismo aislado (D/I) del gen del enzima conversor de la angiotensina (ACE) como marcador genético de riesgo de desarrollar PND y (ii) determinar la incidencia de PND en nuestro entorno.

Material y métodos: Estudio longitudinal de seguimiento a 3 años que incluyó un grupo con DM2 (N =283) seleccionado al azar. Se determinó la distribución del polimorfismo del gen del ACE (D/I =delección/inserción). La PND se diagnosticó mediante la evaluación clínica y neurofisiología.

Resultados: En la línea de base la prevalencia de PND fue del 28,97% (IC del 95%, 23,65-34,20). La presencia del genotipo D/I heterocigótico fue del 60,77% (IC del 95%, 55,05-66,5) y se asoció de forma independiente con un menor riesgo de PND (RR, 0,51; IC del 95%, 0,30-0,86). La PND se correlacionó con la edad ($P < 0,001$), pero no con el género ($P = 0,466$) o duración de la DM2 ($P = 0,555$). Tras 3 años de seguimiento, la prevalencia de PND aumentó hasta el 36,4% (IC del 95%, 30.76-42.04) y la incidencia acumulada fue de 10,4%, 3 años a partir de entonces. En el análisis de regresión de Poisson final, la presencia del genotipo heterocigoto se mantuvo asociado independientemente a un menor riesgo de incidencia de PND (RR, 0,71; IC 95%, 0,53-0,96). La presencia de PND siguió correlacionada con la edad ($p = 0,002$), pero no con el sexo ($p = 0,490$) o duración de la DM2 ($p = 0,630$).

Conclusiones: En nuestra serie, el genotipo heterocigótico (D/I) se demuestra como un factor protector para el desarrollo de PND. Nuestro estudio aporta por primera vez la incidencia acumulada de PND en una población de nuestro medio, pudiéndose considerar ésta como clínicamente relevante.

Palabras clave: diabetes mellitus tipo 2 (DM2), polimorfismo del gen del enzima conversor de la Angiotensina (ACE), neuropatía diabética periférica (DPN).

J. Jurado^a, J. Ybarra^b, J.H. Romeo^c, M. Garcia^d, E. Zabaleta-del-Olmo^e **Angiotensin-converting enzyme gene single polymorphism as a genetic biomarker of diabetic peripheral neuropathy: longitudinal prospective study.** *J Diabetes Complications* 2012; 26(2):77-82.

^a Institut Universitari d'Investigació en Atenció Primària Jordi Gol (IDIAP Jordi Gol), Olot, Girona, Spain

^b Centro Médico Teknon, Barcelona, Spain

^c Baldwin Wallace College, Berea, Ohio, USA

^d IDIAP Jordi Gol, Girona, Spain

^e IDIAP Jordi Gol, Barcelona, Spain

Corresponding author. Centro Médico Teknon, C/ Vilana 12, 08022 Barcelona, Spain. Tel.: +34 933 933 174; fax: +34 933 933 074.

E-mail addresses: juanybarra@hotmail.com, jromeo@bw.edu (J. Ybarra).

Keywords: Type 2 diabetes mellitus (T2DM); Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism; Diabetic peripheral neuropathy (DPN)

ABSTRACT

Background: Identifying patients at risk of developing diabetic peripheral neuropathy (DPN) is of paramount importance in those with type 2 diabetes mellitus (T2DM) to provide and anticipate secondary prevention measures as well as intensify action on risk factors, particularly so in primary care. Noteworthy, the incidence of DPN remains unknown in our environment.

Aims: (i) To analyze a single angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism (D/I) as a genetic marker of risk of developing DPN, and (ii) to determine the incidence of DPN in our environment.

Research design and methods: Longitudinal study with annual follow-up for 3 years involving a group of T2DM (N=283) randomly selected. ACE gene polymorphism distribution (I=insertion; D=deletion) was determined. DPN was diagnosed using clinical and neurophysiology evaluation.

Results: Baseline DPN prevalence was 28.97% (95% CI, 23.65–34.20). ACE polymorphism heterozygous genotype D/I presence was 60.77% (95% CI, 55.05–66.5) and was independently associated with a decreased risk of DPN (RR, 0.51; 95% CI, 0.30–0.86). DPN correlated with age ($P < 0.001$) but not with gender ($P = 0.466$) or time of evolution of T2DM ($P = 0.555$). Regarding end point, DPN prevalence was 36.4% (95% CI, 30.76–42.04), and accumulated incidence was 10.4% 3 years thereafter. In the final Poisson regression analysis, the presence of heterozygous genotype remained independently associated with a decreased risk of DPN (RR, 0.71; 95% CI, 0.53–0.96). DPN presence remained correlated with age ($P = 0.002$), but not with gender ($P = 0.490$) or time of evolution ($P = 0.630$).

Conclusions: In our series, heterozygous ACE polymorphism (D/I) stands as a protective factor for DPN development. Accumulated incidence of DPN was relevant. Further prospective studies are warranted.

1. INTRODUCTION

Diabetic peripheral neuropathy (DPN) is the most commonly reported long-term diabetic complication, affecting up to 20%–40% of type 2 diabetic (T2DM) patients. Additionally, DPN is a major contributory factor in patients affected by diabetic foot ulceration and is

being held responsible for up to 50%–75 % of non-traumatic foot amputations (Holzer et al., 1998).

Thus, taken into account its prevalence, its socioeconomic burden, the impact this has on quality of life and on associated anxiety and depression, screening and appropriate treatment for DPN are of paramount importance (Mayfield, Reiber, Sanders, Janisse & Pogach, 1998).

The expected rise in T2DM prevalence will likely impose an increase of health care related costs. Simple and efficient methods are needed to detect the diabetic population at high risk of DPN. Thus, it is necessary to deploy significant efforts in clinical research focused on early detection of DPN, particularly so in primary care settings where preventive measures have proven its efficiency and efficacy in patient care as well as in the control of modifiable risk factors (Boulton & Vileikyte, 2000).

In practice, the diagnosis of DPN is usually employed to estimate the risk of foot ulceration. Thus preventive interventions are mainly aimed at avoidance of possible foot injuries. However, in addition to the metabolic control of diabetes (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998), other risk factors of DPN susceptible of modification under preventive interventions have been identified, such as blood pressure control (Tefsaye et al., 2005), lipid profile control (Vinik et al., 2001), additional causes (neuro-toxic medications; vitamins B₁, B₆, and B₁₂ deficiencies; and alcohol abuse) (Gorson & Ropper, 2006), interventions on lifestyle (exercise and diet) (Smith et al., 2006), and research into new therapies for treatment (Price et al., 2006; Schemmel, Padiyara & D'Souza, 2010; Volarevic, Arsenijevic, Lukic & Stojkovic, 2010).

In addition to the proven association between metabolic control and complications of diabetes, there is a clear familial predisposition and likely link with genetic factors (Burdon et al., 2006) expressed by the absence of complications in some patients with poor metabolic control.

Identification of potential candidates to develop DPN, particularly if performed prior to its clinical manifestations, would anticipate further secondary prevention measures and intensify action on risk factors. Furthermore, these measures would likely contribute to the reduction of morbidity and mortality and avoid the saturation of specialized services.

In this regard, in a previous study on the polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene (Jurado, Pastoret, Ybarra, Gich, & Pou, 2006), we observed that patients with DPN expressed the heterozygous genotype frequency of “D/I” less likely than patients without DPN. This findings suggested that the heterozygous genotype “D/I” could stand as putative protective factor against DPN development.

Moreover, we have not been able to find studies on the incidence of DPN in Spain while international studies are scarce. Some of them utilize diagnostic criteria that might underestimate (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998; Costacou, Chang, Ferrell, & Orchard, 2006) or overestimate (Sands, Shetterly, Franklin, & Hamman, 1997) the presence of DPN; while others employing appropriate criteria show a cumulative incidence of 23.5% in 7 years (Tefsaye et al., 2005) in subjects with type 1 diabetes, with a different natural history of T2DM.

The aims of this study were to analyze the polymorphisms of ACE gene as a genetic marker of risk for DPN and to determine the incidence of DPN in North Catalonia, Spain.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Research design and subjects

A cross-sectional prospective study at 3years (2007–2010) was performed in a primary care setting in three different regions of North Catalonia, Spain.

The sample number of the cohort correlated with DPN prevalence, at about 30%, with a precision of 5% and a confidence interval (CI) of 95%.

Four hundred T2DM patients (aged 30–69years) were randomly recruited from the T2DM population proceeding from our cohorts of the North Catalonia Diabetes Study (NCDS) (Jurado, Caula, & Pou, 2006; Jurado, Ybarra, Romeo, & Pou, 2009), and 307 patients (76.75%) met the inclusion criteria. No difference was observed between the sample and the general population with T2DM concerning sex and age (95% confidence interval). In addition, a sample of subjects (n =290) without diabetes and/or DPN was selected as a control group (95% CI for sex and age) to establish the normal range for vibration perception thresholds (VPT) assessed by tuning fork and neurothesiometer values.

Inclusion criteria were as follows: T2DM patients diagnosed according to the World Health Organization guidelines aged between 35 and 75 years.

Exclusion criteria were as follows: neuropathies of other etiology, alcohol ingestion N60g/day in women and \geq 80g/day in men and refused consent.

All participants gave written informed consent to participate, and the study was approved by the Primary Care Ethics Committee and the IDIAP Jordi Gol. The study was carried out in accordance with the principles of the declaration of Helsinki as revised in 2000 and 2008.

The dependent variables considered were the presence of DPN at baseline and its appearance upon follow-up. The independent variables were the ACE gene polymorphisms, gender, age, presence of cardiovascular disease, and duration of T2DM (in years).

2.2. Diabetic peripheral neuropathy (DPN)

The patients were studied by a team of 28 health care providers including 16 nurse practitioners and 12 general practitioners. Study personnel underwent intensive training sessions totaling 24h. All examinations in each patient were performed by the same health care provider to control for inter-rater reliability. The entire group of health care providers who evaluated the cohort was blinded to the results of the D/I polymorphisms.

Baseline results were obtained during 2007 and included age, time of T2DM evolution, and cardiovascular disease (stroke, myocardial infarction, heart failure, and peripheral vascular disease). The same team performed regular screenings to identify new cases of DPN as well as changes in the other baseline variables during the ensuing 3years of follow-up (2008–2010). Diagnostic data were retrieved from case records and nerve conduction studies (NCS).

DPN diagnosis was based on clinical neurological examination (CNE) as well as the Neuropathy Symptoms Score being described previously (Jurado et al., 2006; Jurado et al., 2009), and NCS (by Synergy T-EPEMG/EP) in borderline subjects (i.e., those with dubious diagnosis). NCS was performed in the median and ulnar nerves for upper extremities and in the sural, peroneal, and tibial nerves for lower extremities (sensory and motor nerve conduction velocities), as described previously (Jurado et al., 2006; Jurado et al., 2009).

2.3. Study of the ACE gene polymorphism

Samples were collected according to the instructions in the manual of procedures routinely used in the extraction modules of Basic Health Areas. Blood samples were drawn from each subject after an overnight fast (10–12h).

DNA was extracted using the Puregene DNA purification Kit (Gentra Systems) following the manufacturer's specifications.

The angiotensin-converting enzyme (ACE) gene located on the long arm of chromosome 17 has a diallelic polymorphism: presence (I) or absence (D) of 287bp in intron 16. DNA was subjected to amplification by PCR using an optimized primer pair (5'GCCCTGAGGTGTCTGCAG-CATGT3' and 5'GGATGGCTCTCCCCGCTTGTCTC3') that allowed the amplification of both alleles "D" and "I," resulting in 319-bp and 597-bp amplicons, respectively.

PCR reactions containing 0.8 μ M of each primer, 200 μ M dNTPs, and 1 U Taq DNA Polymerase (5 Prime GmbH, Deutschland) were subjected to 35 cycles consisting in denaturalization at 94°C for 30 s, annealing at 56°C for 45s, and extension at 72°C for 2min, in a Verities PCR (Applied Biosystems). Five microliters of each PCR was resolved in 2% agarose gels, and amplicons were visualized by ultraviolet transillumination.

Because the D allele in heterozygous samples is preferentially amplified, DD genotypes were subjected to a second PCR amplification with two insertion-specific primers for allele I, in order to confirm its absence: 5'TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC3' and 5'TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA3'. PCR conditions were identical except for an annealing temperature of 72 °C.

Genetic analysis was performed at Research Institute Hospital de la Santa Creu i Sant Pau of Barcelona.

2.4. Sample size

The Poisson approximation was used to calculate sample size. Accepting an alpha risk of 0.05 and a beta risk of less than 0.2 in a bilateral contrast, 238 subjects were needed to detect a minimum relative risk of 2.14 (Costacou et al., 2006) if the rate of DPN in the unexposed group is 0.15. A loss rate up to 10% has been estimated, taking into account a previous study (Jurado et al., 2006) and the prevalence of DPN observed our cohorts (Jurado et al., 2006; Jurado et al., 2009)

2.5. Statistical analysis

Proportions between groups were compared with the chi-square test. Continuous variables were expressed as mean and standard deviation (SD) and were compared by Student's t-test.

Covariates that were of known clinical interest or that were identified as significant ($P < 0.05$) in the bivariate analyses were selected for multivariate analyses, which was performed employing Poisson regression models for analyzing the association between the genotype and DPN. We fitted all models in a customized way by means of the ENTER method. Results were expressed as relative risks with the corresponding robust 95% confidence intervals (CI).

The level of statistical significance was established as $P < 0.05$. All analyses were performed with the STATA v.9 statistical package.

3. RESULTS

Of the three hundred seven (N =307) patients initially selected, 24 (n =24; 7.81%) did not sign the informed consent form or were lost before the first year of follow-up.

Finally, two hundred eighty-three (n =283) T2DM patients were included in the study. There were no significant differences in age and gender between the initially selected group and the remaining cohort included in the study (data not shown). Table 1 provides the baseline characteristics of the participants.

As shown, 201 patients had no diabetic polyneuropathy (DPN) at the time of inclusion, whereas 82 patients had DPN (28.97%). No patients were lost after the first year of follow-up. As shown, participants were in their 60s and men outnumbered women, as in our population with T2DM.

DPN presence was positively related with age (P <0.001), age \geq 65 years old (P <0.001), and negatively related with heterozygous (D/I) polymorphism (P =0.011) but not with gender (P =0.466) or time of T2DM evolution (in years; P =0.555) at the beginning of the study. Age, cardiovascular disease, and the presence of the heterozygous (D/I) polymorphism were associated with DPN, in the bivariate analysis, during follow-up (Table 2).

In the final Poisson regression analysis, age and the presence of CVD remained independently associated with an increased risk of DPN, whereas the presence of heterozygous genotype (D/I) remained independently associated with a decreased risk of DPN (Table 3). Gender and time of T2DM evolution did not disclose significant relative risks of DPN from baseline till the end of the study.

Table 1. Baseline characteristics of the participants.

N (gender)	283 (175 males/108 females)	
Women	38.16	(32.50–43.81)
Caucasian	100%	
Age ^a	63.58	(7.72)
Age \geq 65years	44.52	(38.70–50.35)
History of CVD	19.78	(15.11–24.45)
History of DPN	28.97	(23.65–34.29)
Heterozygous	60.77	(55.05–66.50)
T2DM evolution (years) ^a	6.19	(3.47)

Values are percentages (95% CI) unless stated otherwise.

CVD, cardiovascular disease; DPN, diabetic peripheral neuropathy. ^a Mean (SD).

Table 2. Factors associated with total diabetic polyneuropathy (DPN) events at 3-year follow-up.

Factors	Diabetic Polyneuropathy		P-value
	Yes	No	
Women	40.78	36.67	0.493
Age ^a	69.85 (6.39)	65.98 (8.25)	<0.001
Age \geq 65years	76.70	55.00	<0.001
CVD	56.31	37.22	0.002
Heterozygous (D/I)	52.42	65.55	0.032

Values are percentages (95% CI) unless stated otherwise.

DPN, diabetic peripheral neuropathy; CVD, cardiovascular disease. ^a Mean (SD).

Contrarily, age disclosed a significant and consistent relative risk of developing DPN from baseline and year after year, till the end of the study (Table 4).

Heterozygous (D/I) ACE gene polymorphism disclosed a statistically significantly reduced relative risk of developing DPN from the beginning of the study and year after year till the end of follow-up (Table 4).

Homozygous (D/D) ACE gene polymorphism disclosed an increased relative risk of

developing DPN at baseline whose initial significance was lost thereafter. Noteworthy, the initial increase relative risk was reversed to a decreased relative risk from year 1 of follow-up and so on; nevertheless, this decreased relative risk did not attain statistical significance (Table 4).

DPN's observed annual incidence was 3.88% (95% CI, 1.25–6.70) during the first year of follow-up (8/201 patients), 3.11% (95% CI, 0.64–5.57) during the second year of follow-up (6/193 patients), and 3.74% (95% CI, 0.99–6.48) during the third year of follow-up (7/187 patients). At the end of the study (third year), DPN's incidence was 10.44% (95% CI, 6.18–14.71) (data not shown).

4. DISCUSSION

The current longitudinal prospective cohort pilot study was set forth to analyze ACE gene polymorphism as a genetic risk marker of developing DPN and to determine the incidence of DPN in our environment (North Catalonia, Spain). The most novel finding of our study is the protective effect of a heterozygous (D/I) ACE gene polymorphism on the development of DPN. Hence, our results show that, at the beginning, throughout, and at the end of the study, the presence of DPN was negatively related to the heterozygous (D/I) genotype. Despite ACE gene polymorphism association with diabetic renal disease and/or diabetic retinopathy (Gorson & Ropper, 2006; Jurado et al., 2009; Klemm & Paschke, 2000; Tapp et al., 2003), its relationship with DPN was not clear so the present study establishes a precedent since, to the best of our knowledge, this finding had not been reported previously.

The results confirm those obtained in a previous study of our group (Jurado et al., 2006) on ACE gene polymorphism in T2DM patients with cardiovascular disease when we firstly observed that those patients disclosing DPN presented the heterozygous (D/I) genotype less frequently than those without DPN, while homozygous genotypes (D/D and I/I) appeared with similar frequencies in patients with or without DPN. These results suggested, rather surprisingly, that the heterozygous genotype (D/I) could stand as a protective factor against the presence of DPN.

Table 3. Poisson regression model of total DPN events at 3-year follow-up.

Factors	RR (95% CI)	P-value
Women	1.12 (0.83–1.52)	0.44
Age \geq 65years	1.46 (1.05–2.03)	0.02
Heterozygous	0.71 (0.53–0.96)	0.02
CVD	1.48 (1.06–2.05)	0.01

Goodness of fit (Hosmer–Lemeshow χ^2), P = 0.82. CVD, cardiovascular disease.

Table 4. Variables related with DPN presence during follow-up.

Variable	Follow-up		1-year follow-up		2-year follow-up		3-year follow-up	
	RR	P	RR	P	RR	P	RR	P
Gender	0.823 (0.487–1.390)	0.466	1.200 (0.719–2.001)	0.486	1.250 (0.756–2.068)	0.385	1.189 (0.724–1.954)	0.494
Age (years)	1.086 (1.043–1.131)	<0.001	1.073 (1.034–1.114)	0.001	1.073 (1.035–1.113)	<0.001	1.073 (1.036–1.112)	<0.001
T2DM evolution (yrs)	0.978 (0.908–1.053)	0.555	0.990 (0.921–1.060)	0.772	1.017 (0.950–1.088)	0.630	1.016 (0.951–1.086)	0.637
Heterozygous (D/I)	0.509 (0.302–0.857)	0.011	0.569 (0.342–0.945)	0.029	0.555 (0.337–0.916)	0.021	0.557 (0.340–0.913)	0.020
Homozygous (D/D)	1.742 (1.004–3.025)	0.048	0.648 (0.377–1.114)	0.116	0.595 (0.349–1.015)	0.057	0.602 (0.355–1.022)	0.060
Homozygous (I/I)	1.402 (0.639–3.075)	0.399	1.409 (0.652–3.044)	0.383	1.263 (0.568–2.725)	0.551	1.300 (0.609–2.776)	0.498

Values in bold indicate statistical significance. RR, relative risk; CI, confidence interval.

This significant presence of heterozygous combinations, but related to other genes, has also been observed associated with a reduced prevalence of neuropathy in T2DM (Rudofsky et al., 2004).

While the relationship between the DPN and the aldose reductase gene (Sivenius et al., 2004) is well documented, we found scant literature on its possible relation to the ACE gene polymorphism. Ito et al. (2002) reported that the “T” allele frequency was significantly higher in patients with DPN without macroalbuminuria. Stephens, Dhamrait, Acharya, Humphries, and Hurel (2006) reported the presence of the “D” allele being associated with an increase risk of DPN in women. Costacou et al. (2006) described the “D/D” genotype as a risk factor for DPN. Interestingly, in our series, homozygous (D/D) ACE gene polymorphism disclosed an increased relative risk of developing DPN at baseline whose initial significance was lost thereafter. Noteworthy, the initial increased relative risk was reversed to a decreased relative risk from year 1 of follow-up and so on; nevertheless, this decreased relative risk did not attain statistical significance, although a trend appeared from the first year till the end of the study (Table 4).

Suzuki et al. (2004) reported inactivity and/or dominance of the ALDH2/ADH2 polymorphism in relation to DPN's presence.

Regarding the polymorphism study, the main drawback of our study is that we only studied the ACE gene, taken into account that DPN is likely a multifactorial micro-angiopathic complication with a polygenic background. Thus, our methodology does not allow an analysis of association and high-density single nucleotide poly-morphisms (SNP) maps. Hence, how independently would ACE polymorphism heterozygous genotype D/I predict the non-develop-ment of DPN cannot be properly assessed in our study.

Measuring ACE activity in blood samples would likely have provide further hypothesis as to why certain genotypes are or are not associated with the development of certain diabetic complica-tions. Unfortunately, those determinations were not performed.

Furthermore, DPN presence correlated positively with age as reported previously (Tesfaye et al., 2005; Jurado et al., 2009; Tapp et al., 2003). Contrarily, DPN presence was not related with either gender or time of evolution of T2DM (Table 4). The lack of correlation between DPN presence and time of diabetes evolution falls in contradiction with previous reports (Tesfaye et al., 2005; Jurado et al., 2009; Tapp et al., 2003) but, noteworthy, in agreement with Sands et al. (1997) in T2DM. One likely explanation might be that the onset of DPN in T2DM is often insidious and more subtle than in type 1 diabetics and, more often than not, T2DM patients's diagnosis is delayed by several years. Moreover, the natural history of both types of diabetes is different.

In Spain, during the period 2001–2008, the rate of non-traumatic amputations in T2DM patients, instead of diminishing, has increased (OECD, 2009; López-de-Andrés et al., 2011), indicating the urgency of caring for and prevent foot injuries. The evidence shows that it is possible to reduce the number of amputations (Vamos et al., 2010; Yesil et al., 2009; Ikonen, Sund, Venermo, & Winell, 2010), by means of a correct diabetes service organization and the control of different risk factors (Gorson & Ropper, 2006; Smith et al., 2006; Tesfaye et al., 2005; UK Prospective Diabetes Study Group, 1998; Vinik et al., 2001).

DPN stands in a prominent position among the risk factors for amputation and also in itself as a cause of suffering and expense (Holzer et al., 1998; Mayfield et al., 1998).

Despite the fact of being investigated by several new therapeutic modalities (Kamiya, Zhang, & Sima, 2009; Obrosova et al., 2010; Price et al., 2006; Ropper et al., 2009; Schemmel et al., 2010; Volarevic et al., 2010), the recognition of the difficulty in reversing established DPN has focused efforts at slowing DPN's progression (Tahrani, Askwith, & Stevens, 2010).

DPN's early diagnosis (Tesfaye et al., 2010) and the detection of innovative risk markers

(Cermenati et al., 2010; Cho, 2010; Kolla et al., 2009; Wu, Mata, & Fink, 2011; Ybarra, Pou, Romeo, Mercé, & Jurado, 2010) allow for anticipating preventive care. Among these risk and/or protective factors, related genetic (Burdon et al., 2006; Costacou et al., 2006; Jurado et al., 2006; Klemm & Paschke, 2000; Lee, Xiang, Brannagan, Chin, & Latov, 2010; Papanas et al., 2007; Sivenius et al., 2004; Ito et al., 2002; Stephens et al., 2006; Suzuki et al., 2004; Tian, Fang, Du, & Jia, 2011; Yamasaki et al., 2006) and epigenetic factors (Gaikwad, Gupta, & Tikoo, 2010) are probably the ones that will enable the maximum advance.

The determination of the ACE gene polymorphisms poses economic and availability problems to make its determinations similar to those raised in his day by the HbA1c and the islet-cell antibodies determination as well as other procedures that are common today in practice.

In the short term, biotechnology will provide microarrays and biochips for the detection of SNPs with low-cost services. Then genetic testing will likely become an integral part of health care.

The future of genetics in public health will likely include the development of genetic testing, prevention services and health promotion, evaluation and monitoring of individuals and families at risk, genetic counseling, and professional training in genetics, all within the context of primary care settings.

The second aim of our study was to determine the incidence of DPN in our environment. As shown, the cumulative incidence of DPN at 3 years was slightly higher than that observed in subjects with type 1 diabetes (Tesfaye et al., 2005). To study the incidence of DPN, monitoring was limited to 3years, but by design and size, the study has adequate power and statistical significance. Moreover, taking into account diabetic neuropathy's natural history, it is our intention to prolong the follow-up to 10years.

The design of the study is not flawed by information, monitoring, or selection bias, since drop-outs were less than 7.5% and the resulting sample showed no significant age or gender differences with the randomly selected cohort. Noteworthy, it is representative of our general population with T2DM.

The assessment of DPN's incidence is difficult, among other reasons due to the lack of unified diagnostic criteria, the low sensitivity to detect subtle forms of DPN, and few cohort studies. In Spain, we have not seen studies on the incidence of DPN in type 2 diabetic patients, so this study also sets a precedent in this regard.

Internationally, few studies cite the incidence of DPN in T2DM. Both the UK Prospective Diabetes Study Group (1998) (using a biotensimeter $\geq 25V$) as well as the paper by Costacou et al. (2006) used diagnostic criteria which we believe underestimate the presence of DPN in T2DM. Otherwise, Sands et al. (1997) used diagnostic criteria which we believe overestimate the presence of DPN in T2DM. The study by Tesfaye et al. (2005), which we believe utilized the most appropriate criteria for DPN's diagnosis, found a cumulative incidence of 23.5% in 7years for patients with type 1 diabetes. In our study, we observed a slightly higher incidence, probably due to the special characteristics of the natural history of TDM2.

In our series, DPN's categorical non-development can be significantly and independently predicted by D/I allele of ACE gene polymorphisms and age. Accordingly, D/I allele ACE gene polymorphisms appear as a key effector protector, displaying significant independent correlations with diabetic neuropathy absence. Therefore, it could be used as a novel gene marker for diabetic peripheral neuropathy risk development. Further prospective studies are warranted.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from Fondo de Investigación Sanitaria: FIS PI070340, Instituto de Salud Carlos III of Spain, Plan Nacional I+D+i 2008–2010, and FEDER.

REFERENCES

- Boulton, A. J., & Vileikyte, L. (2000). The diabetic foot: the scope of the problem. *Journal of Family Practice*, 49, S3–S8.
- Burdon, K. P., Langefeld, C. D., Wagenknecht, L. E., Carr, J. J., Freedman, B. I., Herrington, D., et al. (2006). Association analysis of genes in the renin–angiotensin system with subclinical cardiovascular disease in families with type 2 diabetes mellitus: the Diabetes Heart Study. *Diabetic Medicine*, 23, 228–234.
- Cermenati, G., Giatti, S., Cavaletti, G., Bianchi, R., Maschi, O., Pesaresi, M., et al. (2010). Activation of the liver X receptor increases neuroactive steroid levels and protects from diabetes-induced peripheral neuropathy. *Journal of Neuroscience*, 30, 11896–11901.
- Cho, H. C. (2010). The association between serum GGT concentration and diabetic peripheral polyneuropathy in type 2 diabetic patients. *Korean Diabetes Journal*, 34, 111–118.
- Costacou, T., Chang, Y., Ferrell, R. E., & Orchard, T. J. (2006). Identifying genetic susceptibilities to diabetes-related complications among individuals at low risk of complications: an application of tree-structured survival analysis. *American Journal of Epidemiology*, 164, 862–872.
- Gaikwad, A. B., Gupta, J., & Tikoo, K. (2010). Epigenetic changes and alteration of Fbn1 and Col3A1 gene expression under hyperglycaemic and hyperinsulinaemic conditions. *Biochemical Journal*, 432, 333–341.
- Gorson, K. C., & Ropper, A. H. (2006). Additional causes for distal sensory polyneuropathy in diabetic patients. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 77, 354–358.
- Holzer, S. E., Camerota, A., Martens, L., Cuerdon, T., Crystal-Peters, J., & Zagari, M. (1998). Costs and duration of care for lower extremity ulcers in patients with diabetes. *Clinical Therapeutics*, 20, 169–181.
- Ikonen, T. S., Sund, R., Venermo, M., & Winell, K. (2010). Fewer major amputations among individuals with diabetes in Finland in 1997–2007: a population-based study. *Diabetes Care*, 33, 2598–2603.
- Ito, H., Tsukui, S., Kanda, T., Utsugi, T., Ohno, T., & Kurabayashi, M. (2002). Angiotensin-converting enzyme insertion/detection polymorphism and polyneuropathy in type 2 diabetes without macroalbuminuria. *Journal of International Medical Research*, 30, 476–482.
- Jurado, J., Caula, J., & Pou, J. M. (2006). Selection of risk and diagnosis in diabetic polyneuropathy. validation of method of new systems. *Atencion Primaria*, 30, 116–121.
- Jurado, J., Pastoret, M., Ybarra, J., Gich, I., & Pou, J. M. (2006). Cardiovascular disease, diabetic polyneuropathy and ACE GENE POLYMORPHISMS IN the North Catalonia Diabetes Study (NCDS). *Diabetologia*, 49, 1–755 664.
- Jurado, J., Ybarra, J., Romeo, J. H., & Pou, J. M. (2009). Clinical screening and diagnosis of diabetic polyneuropathy: the North Catalonia Diabetes Study. *European Journal of*

Clinical Investigation, 39, 183–189.

- Kamiya, H., Zhang, W., & Sima, A. A. (2009). The beneficial effects of C-peptide on diabetic polyneuropathy. *Reviews on Diabetes Study*, 6, 187–202.
- Klemm, T., & Paschke, R. (2000). Possible genetic causes for late complications of diabetes mellitus. *Medizinische Klinik (Munich)*, 95, 31–39.
- Kolla, V. K., Madhavi, G., Pulla Reddy, B., Srikanth Babu, B. M., Yashovanthi, J., Valluri, V. L., et al. (2009). Association of tumor necrosis factor alpha, interferon gamma and interleukin 10 gene polymorphisms with peripheral neuropathy in South Indian patients with type 2 diabetes. *Cytokine*, 47, 173–177.
- Lee, G., Xiang, Z., Brannagan, T. H., III, Chin, R. L., & Latov, N. (2010). Differential gene expression in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) skin biopsies. *Journal of the Neurological Sciences*, 290, 115–122.
- López-de-Andrés, A., Martínez-Huedo, M. A., Carrasco-Garrido, P., Hernández-Barrera, V., Gil-de-Miguel, A., & Jiménez-García, R. (2011). Trends in lower-extremity amputations in people with and without diabetes in Spain, 2001–2008. *Diabetes Care*, 34, 1570–1576.
- Mayfield, J. A., Reiber, G. E., Sanders, L. J., Janisse, D., & Pogach, L. M. (1998). Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care*, 21, 2161–2177.
- Obrosova, I. G., Stavniichuk, R., Drel, V. R., Shevalye, H., Vareniuk, I., Nadler, J. L., et al. (2010). Different roles of 12/15-lipoxygenase in diabetic large and small fiber peripheral and autonomic neuropathies. *American Journal of Pathology*, 177, 1436–1447.
- OECD. (2009). Avoidable admissions: diabetes complications. In OECD (Ed.), *Health at a glance 2009: OECD indicators* (pp. 118–119). OECD Publishing [cited July 29, 2011]. Available in: http://www.oecd-ilibrary.org/avoidable-admissions-diabetes-complications_5ks5mgftfbzw.pdf?contentType=/ns/Chapter,/ns/StatisticalPublication&itemId=/content/chapter/health_glance-2009-49-en&containerItemId=/content/serial/19991312&accessItemIds=&mimeType=application/pdf.
- Papanas, N., Papatheodorou, K., Papazoglou, D., Kotsiou, S., Christakidis, D., & Maltezos, E. (2007). An insertion/deletion polymorphism in the alpha2B adrenoceptor gene is associated with peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 115, 327–330.
- Price, S. A., Dent, C., Duran-Jimenez, B., Liang, Y., Zhang, L., Rebar, E. J., et al. (2006). Gene transfer of an engineered transcription factor promoting expression of VEGF-A protects against experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*, 55, 1847–1854.
- Ropper, A. H., Gorson, K. C., Gooch, C. L., Weinberg, D. H., Pieczek, A., Ware, J. H., et al. (2009). Vascular endothelial growth factor gene transfer for diabetic polyneuropathy: a randomized, double-blinded trial. *Annals of Neurology*, 65, 386–393.
- Rudofsky, G., Jr, Reismann, P., Witte, S., Humpert, P. M., Isermann, B., Chavakis, T., et al. (2004). Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27, 179–183.
- Sands, M. L., Shetterly, S. M., Franklin, G. M., & Hamman, R. F. (1997). Incidence of distal symmetric (sensory) neuropathy in NIDDM. The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes Care*, 20, 322–329.

- Schemmel, K. E., Padiyara, R. S., & D'Souza, J. J. (2010). Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. *Journal of Diabetes and its Complications*, 24, 354–360.
- Sivenius, K., Pihlajamaki, J., Partanen, J., Niskanen, L., Laakso, M., & Uusitupa, M. (2004). Aldose reductase gene polymorphisms and peripheral nerve function in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27, 2021–2026.
- Smith, A. G., Russell, J., Feldman, E. L., Goldstein, J., Peltier, A., Smith, S., et al. (2006). Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy. *Diabetes Care*, 29, 1294–1299.
- Stephens, J. W., Dhamrait, S. S., Acharya, J., Humphries, S. E., & Hurel, S. J. (2006). A common variant in the ACE gene is associated with peripheral neuropathy in women with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*, 20, 317–321.
- Suzuki, Y., Taniyama, M., Muramatsu, T., Higuchi, S., Ohta, S., Atsumi, Y., et al. (2004). ALDH2/ADH2 polymorphism associated with vasculopathy and neuropathy in type 2 diabetes. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 28, 111S–116S.
- Tahrani, A. A., Askwith, T., & Stevens, M. J. (2010). Emerging drugs for diabetic neuropathy. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 15, 661–683.
- Tapp, R. J., Shaw, J. E., De Courten, M. P., Dunstan, D. W., Welborn, T. A., & Zimmet, P. Z. (2003). Foot complications in type 2 diabetes: an Australian population-based study. *Diabetic Medicine*, 20, 105–113.
- Tesfaye, S., Chaturvedi, N., Eaton, S. E., Ward, J. D., Manes, C., Ionescu-Tirgoviste, C., et al. (2005). Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *New England Journal of Medicine*, 352, 341–350.
- Tesfaye, S., Boulton, A. J., Dyck, P. J., Freeman, R., Horowitz, M., Kempler, P., et al. (2010). Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care*, 33, 2285–2293.
- Tian, C., Fang, S., Du, X., & Jia, C. (2011). Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: a meta-analysis. *Diabetologia*, 54, 803–811.
- UK Prospective Diabetes Study Group. (1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 352, 837–853.
- Vamos, E. P., Bottle, A., Edmonds, M. E., Valabhji, J., Majeed, A., & Millett, C. (2010). Changes in the incidence of lower extremity amputations in individuals with and without diabetes in England between 2004 and 2008. *Diabetes Care*, 33, 2592–2597.
- Vinik, A. I., Erbas, T., Park, T. S., Stansberry, K. B., Scanelli, J. A., & Pittenger, G. L. (2001). Dermal neurovascular dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 24, 1468–1475.
- Volarevic, V., Arsenijevic, N., Lukic, M. L., & Stojkovic, M. (2010). Mesenchymal stem cell treatment of complications of diabetes mellitus. *Stem Cells*, 29, 5–10.
- Wu, Z., Mata, M., & Fink, D. J. (2011). Prevention of diabetic neuropathy by regulatable expression of HSV-mediated erythropoietin. *Molecular Therapy*, 19, 310–317.
- Yamasaki, H., Sasaki, H., Ogawa, K., Shono, T., Tamura, S., Doi, A., et al. (2006). Uncoupling protein 2 promoter polymorphism –866G/A affects peripheral nerve

dysfunction in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 29, 888–894.

Ybarra, J., Pou, J. M., Romeo, J. H., Mercé, J., & Jurado, J. (2010). Transforming growth factor 1 (TGFB1) as a biomarker of diabetic peripheral neuropathy: cross-sectional study. *Journal of Diabetes and its Complications*, 24, 306–312.

Yesil, S., Akinci, B., Bayraktar, F., Havitcioglu, H., Karabay, O., Yapar, N., et al. (2009). Reduction of major amputations after starting a multidisciplinary diabetic foot care team: single centre experience from Turkey. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 117, 345–349.

ARTÍCULO 3

Cardiovascular disease predicts diabetic peripheral polyneuropathy in subjects with type 2 diabetes: A 10-year prospective study

European Journal of Cardiovascular Nursing
1-7
© The European Society of Cardiology 2014
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1474515114565215
cnu.sagepub.com


Juan Ybarra-Muñoz*, **Jeronimo Jurado-Campos***, Maria Garcia-Gil, Edurne Zabaleta-del-Olmo, Teresa Mir-Coll, Adelaida Zabalegui, Josep Vidal, June H Romeo.

* These authors contributed equally to this work.

Cardiovascular disease predicts diabetic peripheral polyneuropathy in subjects with type 2 diabetes: A 10 year prospective study.

European Journal of Cardiovascular Nursing. 2014 Dec 19. pii: 1474515114565215. [Epub ahead of print] DOI: 10.1177/1474515114565215.

Impact Factor: 1,828 (Journal Citation Reports 2013), Q1 (Nursing).

Disponible en:

<http://cnu.sagepub.com/content/early/2014/12/15/1474515114565215>

Sage Publications Ltd. 1 Oliver's Yard, 55 City Road, London EC1Y 1SP, England

RESUMEN

Antecedentes: Si bien diversos estudios sugieren una relación entre la enfermedad cardiovascular (ECV) y la neuropatía diabética periférica (PND), esta relación se basa principalmente en datos procedentes de estudios transversales de asociación y centrados en los factores de riesgo cardiovascular más que en la presencia de ECV establecida. El

objetivo fue evaluar la presencia de ECV como un factor predictor del desarrollo de PND en una población con diabetes mellitus tipo 2.

Métodos: Estudio prospectivo multicéntrico en atención primaria de 10 años de seguimiento en una cohorte seleccionada al azar. La presencia ECV incluyó: accidente cerebrovascular, enfermedad coronaria o isquemia periférica valorados a partir de la historia clínica. El diagnóstico de la PND se basó en el examen clínico neurológico, síntomas de neuropatía y estudios de conducción nerviosa.

Resultados: De los trescientos diez (N=310) pacientes reclutados inicialmente, doscientos sesenta y siete (N=267) fueron incluidos en el estudio. La incidencia acumulada de PND fue del 18,3% (IC95: 14,1% -23,4%; N=49). El desarrollo de PND fue significativamente más frecuente en los participantes que presentaban enfermedad cardiovascular al inicio del estudio ($p = 0,01$). En el análisis de regresión logística final, la presencia de ECV al inicio se mantuvo asociada a un mayor riesgo de PND (odds ratio 2,32; IC del 95%: 01.03 a 05.22), además de la duración de la diabetes y los niveles de colesterol LDL.

Conclusiones: En nuestra serie de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, la presencia de ECV al inicio del estudio, se asoció a un mayor riesgo de desarrollar PND en los diez años de seguimiento. Nuestros resultados sugieren que las medidas orientadas a la prevención, control y tratamiento de la enfermedad cardiovascular, también pueden ayudar a prevenir el desarrollo de DPN. Nuestro estudio aporta datos sobre la incidencia acumulada de PND en una población de nuestro medio tras un seguimiento a largo plazo (10 años).

Palabras clave: neuropatía cardíaca autonómica, enfermedad cardiovascular, neuropatía diabética periférica, LDL-colesterol, estudios prospectivos, diabetes mellitus tipo 2.

Juan Ybarra-Muñoz ^{*, 1}, **Jeronimo Jurado-Campos** ^{*, 2, 3}, Maria Garcia-Gil ², Eduarne Zabaleta-del-Olmo ^{2, 4}, Teresa Mir-Coll ³, Adelaida Zabalegui ⁵, Josep Vidal ⁶, June H Romeo ^{7, §}. **Cardiovascular disease predicts diabetic peripheral polyneuropathy in subjects with type 2 diabetes: A 10 year prospective study.** *Eur J Cardiovasc Nurs.* 2014 Dec 19. pii: 1474515114565215. [Epub ahead of print].

*These authors contributed equally to this work

Author details

¹ Hospital Quirón-Teknon, Barcelona, Spain.

² Institut Universitari d'Investigació en Atenció Primària (IDIAP) Jordi Gol, Spain.

³ Institut Català de la Salut, Girona, Spain.

⁴ Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

⁵ CEO Nursing, Hospital Clinic of Barcelona, Spain.

⁶ Endocrinology Dept. Hospital Clinic of Barcelona, Spain.

⁷ Cleveland Clinic/Medina Hospital, Heart Failure Clinic, Medina, USA.

§ **Corresponding author:** June Hart Romea, Medina Hospital/Cleveland Clinic, 1000 East Washington Street, Medina, OH 44256, USA. Email: romeoj@ccf.org

ABSTRACT

Background: the relationship between cardiovascular disease (CVD) and diabetic peripheral neuropathy (DPN) is mainly sustained by data retrieved from cross-sectional studies focused on cardio-vascular risk factors. We aimed to assess the presence of CVD as a risk factor for developing DPN in a type 2 diabetes mellitus population.

Methods: 10-year prospective primary care multicenter study in a randomly selected cohort. CVD presence included stroke, coronary artery disease, and/or peripheral ischemia. DPN diagnosis was based on clinical neurological examination as well as the Neuropathy Symptoms Score and Nerve Conduction Studies.

Results: Three hundred and ten (N=310) patients were initially recruited. Two-hundred and sixty seven (N=267) patients were included in the study. DPN cumulative incidence was 18.3% (95CI: 14.1%-23.4%; N=49). DPN development was significantly more frequent in participants presenting with CVD at baseline (P=0.01). In the final logistic regression analysis, the presence of CVD remained associated with an increased risk for DPN (Odds ratio 2.32, 95% C.I. 1.03-5.22) in addition to diabetes duration and LDL-cholesterol levels.

Conclusions: In our series, type 2 diabetes mellitus patients with CVD at baseline present with an increased risk of developing DPN at ten years of follow-up. Our results suggest that measures aimed at the prevention, control and treatment of CVD, can also help prevent DPN development.

Key words: cardiac autonomic neuropathy, cardiovascular disease, diabetic peripheral neuropathy, LDL-cholesterol, prospective studies, type 2 diabetes mellitus.

INTRODUCTION

Diabetic peripheral neuropathy (DPN) is the most commonly reported long-term diabetic complication, affecting up to 20%–40% of type 2 diabetic (T2DM) patients. Additionally, DPN is a major contributory factor in patients affected by diabetic foot ulceration and is responsible for up to 50%–75 % of non-traumatic foot amputations [1-3]. Furthermore, DPN is closely related to other micro-angiopathic complications as well as with peripheral

RESULTADOS GLOBALES

Estudio 1

Los niveles circulantes de TGFβ1 fueron significativamente más elevados en aquellas personas con DM2 que presentaban PND ($P < 0,0005$).

Tres parámetros derivados del análisis de regresión logística [TGFβ1 ($OR = 7,5$; $P = 0,006$), edad ($OR = 1,1$; $P = 0,005$) y microalbuminuria ($OR = 2,0$; $P = 0,016$)] contribuyen de manera significativa a la identificación de la presencia de PND.

La curva ROC que integra los tres parámetros expresa una sensibilidad (78,1%), una especificidad (76,0%), un valor predictivo positivo (79,2%) y un valor predictivo negativo (70,3%) relevantes en relación con la presencia de PND.

La prevalencia de PND fue de un 40,6%, sin diferencias significativas por sexo. En el análisis de regresión logística univariante, la PND mostró una relación positiva con la edad, duración de la DM2, presencia de ECV, nefropatía diabética incipiente, retinopatía diabética y TGFβ1, y una relación negativa con el colesterol total y el LDL-colesterol. Se observó una relación significativa entre la PND y: sexo, IMC, circunferencia de la cintura, hipertensión arterial, glucosa en plasma, HbA1c, creatinina, colesterol HDL y triglicéridos.

Estudio 2

En la evaluación al inicio del estudio, la presencia de PND se relacionó positivamente con la edad ($p = 0,001$), pero no con el sexo ($p = 0,466$) ni la duración de la DM2 ($p = 0,555$). La presencia heterocigótica (genotipo D/I) del polimorfismo del ACE se asoció de manera independiente a un menor riesgo de desarrollar PND (RR, 0,51; I.C, 0,30–0,86).

La incidencia acumulada de PND observada a los tres años fue del 10,44% (I.C., 6,18 - 14,71).

En el análisis de regresión de Poisson final, la edad y la presencia de ECV se mantuvieron asociados de forma independiente a un mayor riesgo de PND. La presencia del genotipo heterocigoto (D/I) se mantuvo asociada de manera independientemente a un menor riesgo de PND (RR, 0,71; (I.C.: 0,53–0,96).

Estudio 3

Un 17% de sujetos presentaba ECV al inicio del estudio. El desarrollo posterior de la PND fue más frecuente en el grupo que presentaba ECV al inicio del estudio ($P = 0,001$). La incidencia acumulada de PND a los 10 años fue del 18.3% (I.C.: 14,1%-23,4%).

En el análisis de regresión logística final, ajustada por años de duración de la DM2 y el LDL-colesterol, la presencia previa de ECV se mantuvo asociada a un mayor riesgo de desarrollar PND (R.R., 2,32; I.C.: 1,03-5,22). Los sujetos que desarrollaron PND durante el seguimiento habían presentado niveles más elevados de colesterol total ($P = 0,014$) y de colesterol LDL ($P = 0,013$). Los valores de HbA1c ($P = 0,946$) y triglicéridos ($P = 0,221$) no mostraron diferencias.

Objetivo específico 4

Los tres estudios observaron una elevada prevalencia de PND (40,6% en el primero, 39,9% en el total del segundo y 37,9% en el tercero). La incidencia acumulada observada en el segundo estudio fue del 10.4% y en el tercero del 18.3%.

DISCUSIÓN

Estudio 1

Aunque algunos datos experimentales sugieren un papel del TGF β 1 en la neuropatía diabética experimental (Anjaneyulu, 2008), no nos consta que esta relación (PND vs. TGF β 1) se haya descrito previamente en entornos clínicos humanos. En nuestro estudio, el TGF β 1 aparece como una nueva molécula biomarcadora indirecta de la presencia clínica o subclínica de la PND.

El hallazgo más novedoso del estudio es la predicción significativa del diagnóstico de PND mediante tres factores independientes: los niveles de TGF β 1, la nefropatía incipiente y la edad, con una sensibilidad y una especificidad notables. En consecuencia, además de la evidencia observada sobre el TGF β 1 como una citoquina efectora clave en la nefropatía diabética [89, 90], también podría ser considerado como una molécula biomarcadora indirecta de la presencia de PND.

Estos resultados observados sobre el TGF β -1 pueden considerarse un paso adelante en la identificación de moléculas biomarcadoras indirectas de la PND. No obstante deberán confirmarse mediante posteriores estudios; como ha sido el caso con el NT-proBNP, en el que recientemente se han observado resultados similares [91] a los obtenidos anteriormente en nuestra línea de investigación [62].

De confirmarse en estudios prospectivos, el TGF β -1, junto a otros biomarcadores, podría contribuir a configurar modelos predictivos para el cribado precoz de la PND subclínica. Aunque, para dicho objetivo, deberá tenerse en cuenta el posible papel de marcador de riesgo múltiple (ECV, PND y la nefropatía), uno de los motivos por los que lo elegimos.

Estudio 2

El hallazgo más relevante observado en el estudio es el efecto protector del genotipo heterocigoto (D/I) del gen del ACE en el desarrollo de PND. Tanto en la línea de base, como a lo largo y al final del estudio, la presencia de PND se relacionó negativamente con el genotipo heterocigoto (D/I) del ACE.

Aunque los resultados confirman los obtenidos en un estudio previo por nuestro grupo [80], no concuerdan con los de un reciente metanálisis [92], que integra estudios de diversa procedencia, y que observa el genotipo D/I como factor de riesgo de desarrollar PND en personas con DM2. Esa discordancia sugiere la necesidad de profundizar en el tema y confirmar si nuestros resultados únicamente corresponden a nuestro contexto o población.

Por otra parte, en personas con PND, se ha observado que el genotipo homocigótico D/D presenta niveles plasmáticos del ACE dos veces más altos que el genotipo homocigoto de I/I [93]. Inanir [94] sugiere que estos altos niveles plasmáticos de ACE causan daño a los nervios por jugar un papel en el desencadenamiento del estrés oxidativo, de mecanismos proinflamatorios y dando lugar a resistencia a la insulina [29]. La medición de la actividad de la ACE en muestras de sangre podría contribuir a aclarar la relación entre genotipo, actividad de la ACE y desarrollo de PND en nuestra población.

Estos resultados sugieren, de manera un tanto sorprendente, que el genotipo heterocigótico “D/I” podría ser un factor protector del desarrollo de PND. Los genotipos heterocigóticos raramente se consideran como un factor protector, sin embargo una presencia significativa de combinaciones heterocigóticas, pero relacionada con otros genes, también se ha observado asociada a una prevalencia reducida de neuropatía en la DM2 [95]. En nuestro caso, la presencia del genotipo D/I podría asociarse a niveles plasmáticos del ACE equilibrados o adecuados, un aspecto que debería tenerse en cuenta en futuros estudios.

En principio algunos aspectos de la información genética en relación con el desarrollo de la PND, podrían considerarse entre los factores de riesgo/protección no modificables, como por ejemplo el sexo y la edad. No obstante, los probables efectos epigenéticos de diferentes factores ambientales podrían influir modulando su expresión fenotípica o, incluso, establecer un efecto legado positivo.

Disponer de técnicas para determinar marcadores genéticos de riesgo de PND, en nuestro caso los polimorfismos del ACE, presentarían la posibilidad de actuar en estadios de riesgo hasta ahora no contemplados o inabordables.

Indudablemente, los polimorfismos del gen del ACE conllevan problemas de coste y de disponibilidad para su determinación, de manera similar a las que plantearon en su día la HbA1c, la determinación de anticuerpos y otros procedimientos, hoy en día usuales en la práctica. Sin embargo, a corto plazo, la biotecnología permitirá disponer de microarrays y biochips para la detección de SNP's, con menor costo económico y los tests genéticos podrán formar parte integral de los cuidados de salud.

Estudio 3

El estudio supone un enfoque pionero al contemplar la presencia previa de ECV como factor de riesgo para el desarrollo de PND en un estudio prospectivo. A los diez años de seguimiento, la asociación se mantuvo, ajustada por duración de la DM2 y niveles de colesterol LDL. Por lo tanto, la ECV podría presentarse como marcador precoz de PND en pacientes con DM2.

Algunos estudios prospectivos han observado relaciones entre los factores de riesgo cardiovascular y el desarrollo de PND en la diabetes tipo 1 [30, 55, 96] y en la diabetes tipo 2 [27, 88, 97]. En el caso de la DM1, la presencia de ECV en línea base se ha asociado al riesgo doble de neuropatía, independientemente de los factores de riesgo cardiovasculares

[30]. Sin embargo, dichos resultados deben ser interpretados con cautela puesto que la diabetes tipo 1 y la tipo 2 difieren en sus características [98]. Si bien algunos estudios, como el primero de esta tesis sugieren la asociación entre PND y ECV, nuestra búsqueda bibliográfica previa no había identificado ningún estudio prospectivo que mostrase una asociación longitudinal entre ambas entidades nosológicas. Esa falta de pruebas impulsó la realización de este estudio.

En personas de edad avanzada sin diabetes se observa una relación entre la presencia de factores de riesgo cardiovascular y la incidencia de neuropatía simétrica distal idiopática crónica [99]. Por lo tanto, si el desarrollo de la neuropatía en personas sin diabetes está asociado a factores de riesgo cardiovascular potencialmente modificables, el fondo aterogénico/inflamatorio de la DM2 [56] podría desempeñar un papel en esta relación. La asociación entre la ECV previa y el desarrollo de PND puede ser parcialmente entendida cuando se tienen en cuenta las pruebas sobre la relación entre DM2 y los factores de riesgo cardiovascular [27, 88, 97].

Posteriormente al inicio de nuestro estudio se han publicado resultados relacionados con nuestra hipótesis. Un estudio casos controles -en personas sin diabetes- observó una relación entre varios tipos de ECV y el daño axonal [100]. Otro estudio, con un seguimiento a tres años, observó que los factores vasculares predicen la polineuropatía en personas ancianas -sin diabetes- [99]. Otro estudio -en la DM1- observó que los factores de riesgo cardiovascular predicen la disfunción de fibras nerviosas largas [55].

No obstante, aparte de nuestro estudio, los datos disponibles son insuficientes para probar asociaciones longitudinales entre la presencia de ECV y el desarrollo PND en la DM2. Por lo que las comparaciones directas y rectas tendrán que esperar por el momento. Por otra parte, los resultados sugieren que las medidas encaminadas a la prevención, control y tratamiento de la ECV, también pueden ayudar a prevenir el desarrollo de PND.

Objetivo específico 4

En España no conocemos estudios comparables para contrastar nuestros resultados. Por ejemplo, los estudios de Mundet [101] y Arrieta [102] -el primero de base poblacional-, realizados en AP a partir de registros clínicos de PND, no incluyen criterios unificados o adecuados en su diagnóstico. A nivel internacional, como exponemos en la introducción, diferentes estudios utilizan criterios diagnósticos que, en nuestra opinión, infravaloran la presencia de PND en la DM2 [28, 29]. Los estudios con criterios diagnósticos adecuados son escasos, por ejemplo: el estudio de Tesfaye había observado una incidencia acumulada a siete años de PND superior a la nuestra, pero en la DM1 [30]; por su parte, el estudio de Perkins [103] responde a criterios estrictos para el diagnóstico de la PND. Este estudio, con un seguimiento de 4 años, observó una incidencia también más elevada que en nuestros estudios, aunque se llevó a cabo en una muestra no seleccionada de manera aleatoria y configurada por personas con DM1 y DM2.

Nuestros resultados, en muestras de personas con DM2 seleccionadas de manera aleatoria y utilizando criterios diagnósticos robustos y sensibles, ajustados a las recomendaciones del Consenso de San Antonio [19] y a los criterios del grupo de Toronto [26], presentan una validez adecuada. Teniendo en cuenta las prevalencias iniciales, las incidencias acumuladas observadas adquieren relevancia a la vez que permiten estimar unas elevadas prevalencias finales de la PND en nuestro ámbito.

Posibles limitaciones y fortalezas de los estudios

Estudio 1

Su diseño transversal, aunque permite generar hipótesis, no expresa una asociación epidemiológica lineal. En la totalidad de la muestra la determinación del TGFB-1 se llevó a cabo por primera vez, utilizando valores puntuales en lugar de ponderados.

Estudio 2

Teniendo en cuenta que la PND probablemente es una complicación microangiopática multifactorial con un fondo poligénico, el estudio únicamente incluyó el polimorfismo del ACE. Por lo tanto, no permite llevar a cabo un análisis de asociación y mapas de alta densidad de SNPs (single nucleotide polymorphisms), que habría requerido una muestra muy amplia y aumentar el presupuesto.

Estudio 3

No se evaluó la neuropatía autonómica cardíaca ya que el objetivo del estudio fue analizar la presencia de ECV y el desarrollo de PND. Además, a nivel de nuestra AP, la evaluación precisa y homogénea de las formas pre-clínicas de neuropatía autonómica cardíaca es una tarea difícil de realizar.

Las diferentes formas clínicas de la ECV (infarto de miocardio, angina de angor, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, etc.) no se analizaron de manera aislada debido a la concurrencia en su presentación y a que su estudio habría requerido una muestra de población mucho mayor. Sin embargo, diferentes estudios transversales han relacionado cada una de ellas con la presentación de PND [83].

Algunas variables independientes de carácter continuo, como por ejemplo la HbA1c y subfracciones de colesterol, no se incluyeron en el análisis debido a su variabilidad, y a la oportunidad y la influencia concomitante de los diferentes tipos de medicamentos que se usan para el control metabólico y lipídico de la DMT2 (tratamientos que también siguieron variando durante el estudio).

Limitaciones comunes de los tres estudios

Para diagnosticar la PND no se efectuaron pruebas de biopsia nerviosa ni de exploración funcional cardiovascular autonómica (CAF) por limitaciones logísticas y técnicas; pero sí

pruebas de electrodiagnóstico (electromiografía sensitiva y motora), aceptadas como la herramienta más sensible para el diagnóstico de la PND.

No se utilizaron las escalas completas del NSS (*Neuropathy Symptom Score*), NIS (*Neuropathy Impairment Score*) ni del NIP (*Neuropathy Impairment Profile*); desarrolladas para diagnosticar la neuropatía en general pero no para la PND específicamente. Son adecuadas para el seguimiento de los pacientes, pero son muy extensas y pueden presentar dificultades de aplicación en la AP.

Puntos fuertes de los estudios

Las muestras finales, con pérdidas acumuladas inferiores a las previstas, no presentaron diferencias significativas por edad y sexo con las seleccionadas inicialmente y fueron representativas de nuestra población general con DM2.

Los tres estudios se han llevado a cabo en AP que, por su capacidad, proximidad al paciente -que permite un mejor seguimiento- y por su papel esencial en la prevención secundaria de la PND, es el ámbito natural donde debe demostrarse su efectividad en condiciones reales de la práctica clínica.

El diseño de los estudios minimizó al máximo los posibles sesgos de selección, exploración e información. Junto a la metodología empleada en cada estudio, le confieren validez interna y externa a los resultados.

CONCLUSIONES

1. Los niveles circulantes de TGF β 1 son más elevados en personas con DM2 que presentaban PND. El TGF β 1, junto a la presencia de nefropatía diabética incipiente y la edad, pueden predecir el diagnóstico categórico de PND. En consecuencia, el TGF β 1 no sólo aparece como una citoquina efectora clave en la nefropatía diabética, sino que también podría ser considerado como una molécula biomarcadora indirecta de la presencia de PND.
2. El genotipo heterocigótico D/I del gen del ACE indica protección ante la PND; predice de manera significativa e independiente el no desarrollo categórico de la PND. Por lo tanto, podría considerarse como un novedoso marcador genético de riesgo de desarrollar PND. No obstante, se debería investigar si estos resultados son aplicables en otros contextos.
3. A los diez años de seguimiento, la presencia previa de ECV se identifica como un factor de riesgo de desarrollar PND, incluso ajustado por duración de la DM2 y niveles de colesterol LDL. Por lo tanto, la ECV podría considerarse como un marcador precoz de la PND en personas con DM2. Estos resultados sugieren que las medidas encaminadas a la prevención, control y tratamiento de la ECV, también pueden contribuir a prevenir el desarrollo de la PND.
4. Los tres estudios aportan resultados orientados a identificar potenciales candidatos a desarrollar PND, con la posibilidad de que dicha identificación se lleve a cabo antes de sus manifestaciones clínicas, lo cual permitiría anticipar aún más las medidas de prevención secundaria e intensificar las actuaciones sobre sus factores de riesgo.
5. El seguimiento de dos cohortes -una a 3 años y otra a 10 años- ha permitido determinar la incidencia de la PND en nuestro medio, un dato que no habíamos observado hasta el presente en España.

REFERENCIAS

1. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012; 55:88-93.
2. Benbow SJ, Wallymahmed ME, Macfarlane IA. Diabetic peripheral neuropathy and quality of life. *QJM*. 1998; 91:733-7.
3. Abbott CA, Malik RA, van Ross ER, Kulkarni J, Boulton AJ. Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. *Diabetes Care*. 2011; 34:2220-4.
4. Jönsson B; CODE-2 Advisory Board. Revealing the cost of Type II diabetes in Europe. *Diabetologia*. 2002; 45(7):S5-12.
5. Lopez-Bastida J, Boronat M, Moreno JO, Schurer W. Costs, outcomes and challenges for diabetes care in Spain. *Global Health*. 2013; 1, 9:17.
6. Dyck PJ, Katz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM et al. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology*. 1993; 43:817-24.
7. Young MJ, Boulton AJM, McLeod AF, Williams DRR, Sonksen PH: A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the UK hospital clinic population. *Diabetologia*. 1993; 36:150-6.
8. Cabezas-Cerrato J. The prevalence of diabetic neuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. *Diabetologia*. 1998; 41:1263-9.
9. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 2003; 26:1553-79.
10. Boulton AJ, Malik RA., Arezzo JC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care*. 2004; 27:1458-86.

11. Holzer SE, Camerota A, Martens L, Cuerdon T, Crystal-Peters J, Zagari M. Costs and duration of care for lower extremity ulcers in patients with diabetes. *Clin Ther.* 1998; 20:169-81.
12. Mayfield JA, Reiber GE, Sanders LJ, Janisse D, Pogach LM. Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care.* 1998; 21(12):2161-77.
13. Boulton AJM, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G., Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet.* 2005; 366:1719-24.
14. England JD, Gronseth GS, Franklin G, Miller RG, Asbury AK, Carter GT et al. Distal symmetric polyneuropathy: A definition for clinical research. Report of the American Academy of Neurology, the American Association of Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology.* 2005; 64:199-207.
15. Gordois A, Scuffham P, Shearer A, Oglesby A, Tobian JA. The Health Care Costs of Diabetic Peripheral Neuropathy in the U.S. *Diabetes Care.* 2003; 26:6 1790-95.
16. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27(5):1047-53.
17. ADA Statements: American Diabetes Association: Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2007. *Diabetes Care.* 2008; 31(3): 596-615.
18. Malik RA. Wich Test for Diagnosing Early Human Diabetic neuropathy? *Diabetes.* 2014; 63:2206-8.
19. American Diabetes Association American Academy of Neurology Report and recommendations of the San Antonio Conference on Diabetic Neuropathy (Consensus Statement). *Diabetes Care.* 1988; 11:592-7.
20. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R et al. American Diabetes Association: Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2005; 28(4):956-62.
21. Boulton AJ, Armstrong DG, Albert SF, Frykberg RG, Hellman R, Kirkman MS *et al.* Comprehensive foot examination and risk assessment: a report of the task force of the foot care interest Group of the American Diabetes Association, with endorsement by the American Association of Clinical Endocrinologists. *Diabetes Care.* 2008; 31:1679-85.

22. Dyck PJ, Norell JE, Tritschler H, Schuette K, Samigullin R, Ziegler D et al. Challenges in design of multicenter trials: end points assessed longitudinally for change and monotonicity. *Diabetes Care*. 2007; 30:2752-63.
23. Jurado J, Caula J, Pou JM. Selection of risk and diagnosis in diabetic polyneuropathy. Validation of method of new systems. *Aten Prim*. 2006; 30:116-21.
24. Jurado J, Ybarra J, Pou JM. Isolated utilisation of vibration perception thresholds and Semmes-Weinstein monofilament in diagnosing diabetic polyneuropathy. The North Catalonia Diabetes Study. *Nurs Clin North Am*. 2007; 42:59-66.
25. Jurado J, Ybarra J, Romeo JH, Pou J. Clinical screening and diagnosis of diabetic polyneuropathy: The North Catalonia Diabetes Study. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39(3):183-9.
26. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P et al. Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care*. 2010; 33(10):2285-93.
27. Sima AA, Kamiya H. Diabetic neuropathy differs in type 1 and type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1084:235-1249.
28. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998; 352:837-53.
29. Costacou T, Chang Y, Ferrell RE, Orchard TJ. Identifying genetic susceptibilities to diabetes-related complications among individuals at low risk of complications: an application of tree-structured survival analysis. *Am J Epidemiol*. 2006; 164:862-72.
30. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Ward JD, Manes C, Ionescu-Tirgoviste C et al. for the EURODIAB Prospective Complications Study Group. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med*. 2005; 352(4):341-50.
31. Partanen J, Niskanen L, Lehtinen J, Mervaala E, Siitonen O, Uusitupa M. Natural history of peripheral neuropathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1995; 333:89-94.
32. Callaghan BC, Hur J, Feldman EL. Diabetic neuropathy: one disease or two? *Curr Opin Neurol*. 2012; 25(5):536-41.

33. Tesfaye S. Recent advances in the management of diabetic distal symmetrical polyneuropathy. *J Diabetes Investig.* 2011; 24;2(1):33-42.
34. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC Jr, Sowers JR. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 1999; 7;100(10):1134-46.
35. Kärvestedt L, Mårtensson E, Grill V, Elofsson S, von Wendt G, Hamsten A, Brismar K. Peripheral sensory neuropathy associates with micro- or macroangiopathy: results from a population-based study of type 2 diabetic patients in Sweden. *Diabetes Care.* 2009; 32(2):317-22.
36. Boulton AJ, Vileikyte L. The diabetic foot: the scope of the problem. *J Fam Pract.* 2000; 49(11Suppl):S3-8.
37. Jurado-Campos J, Zabaleta-del-Olmo E, Farré-Grau C, Barceló-Prats J, Juvinyà-Canal D. Recursos y modelos de atención al pie diabético en Cataluña (España): Estudio descriptivo sobre espacios de mejora. *Aten Prim.* 2012; 44:394-401.
38. de Alcalá Martínez-Gómez D, Moreno-Carrillo MA, Campillo-Soto A, Carrillo-García A, Aguayo-Albasini JL. Reduction in diabetic amputations over 15 years in a defined Spain population. Benefits of a critical pathway approach and multidisciplinary team work. *Rev Esp Quimioter.* 2014; 27(3):170-9.
39. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol.* 2012; 11(6):521-34.
40. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Stansberry KB, Scanelli JA, Pittenger GL. Dermal neurovascular dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2001; 24:1468-75.
41. Gorson KC, Ropper AH. Additional causes for distal sensory polyneuropathy in diabetic patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006; 77:354-8.
42. Andújar-Plata P, Pi-Sunyer X, Laferrère B. Metformin effects revisited. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012; 95(1):1-9.
43. Singh AK, Kumar A, Karmakar D, Jha RK. Association of B12 deficiency and clinical neuropathy with metformin use in type 2 diabetes patients. *J Postgrad Med.* 2013; 59(4):253-7.

44. Sun AL, Ni YH, Li XB, Zhuang XH, Liu YT, Liu XH, et al. Urinary methylmalonic acid as an indicator of early vitamin B12 deficiency and its role in polyneuropathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Res.* 2014; 2014:921616.
45. Smith, AG, Russell J, Feldman EL, Goldstein J, Peltier A, Smith S et al. Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy. *Diabetes Care.* 2006; 29:1294-99.
46. Dixit S, Maiya AG, Shastri BA. Effect of aerobic exercise on peripheral nerve functions of population with diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes: a single blind, parallel group randomized controlled trial. *J Diabetes Complicat.* 2014; 28(3):332-9.
47. Price SA, Dent C, Duran-Jimenez B, Liang Y, Zhang L, Rebar EJ et al. Gene transfer of an engineered transcription factor promoting expression of VEGF-A protects against experimental diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2006; 55:1847-54.
48. Kamiya H, Zhang W, Sima AA. The beneficial effects of C-peptide on diabetic polyneuropathy. *Rev Diabet Stud.* 2009; 6:187-202.
49. Schemmel KE, Padiyara RS, D'Souza JJ. Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. *J Diabetes Complicat.* 2010; 24:354-60.
50. Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Stojkovic M. Mesenchymal stem cell treatment of complications of diabetes mellitus. *Stem Cells.* 2010; 29:5-10.
51. Khamseh ME, Kazemikho N, Aghili R, Forough B, Lajevardi M, Hashem Dabaghian F et al. Diabetic distal symmetric polyneuropathy: effect of low-intensity laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(6):831-5.
52. Habib AA, Brannagan TH 3rd. Therapeutic strategies for diabetic neuropathy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2010; 10:92-100.
53. Kiernan MC, Emergence of a Predictive Clinical Biomarker for Diabetic Neuropathy. *Diabetes.* 2012; 61(6):1346-47.
54. Sung JY, Park SB, Liu YT, Kwai N, Arnold R, Krishnan AV, Lin CSY. Progressive Axonal Dysfunction Precedes Development of Neuropathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2012; 61(6):1592-8.
55. Elliott J, Tesfaye S, Chaturvedi N, Gandhi RA, Stevens LK, Emery C et al. EURODIAB Prospective Complications Study Group. Large-fiber dysfunction in diabetic peripheral

- neuropathy is predicted by cardiovascular risk factors. *Diabetes Care*. 2009; 32(10):1896-900.
56. Herder C, Lankisch M, Ziegler D, Rathmann W, Koenig W, Illig T, Döring A, Thorand B, Holle R, Giani G, Martin S, Meisinger C. Subclinical inflammation and diabetic polyneuropathy: MONICA/KORA Survey F3 (Augsburg, Germany). *Diabetes Care*. 2009; 32(4):680-2.
 57. Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T, Meisinger C, Mielck A; KORA Study Group. Prevalence of polyneuropathy in pre-diabetes and diabetes is associated with abdominal obesity and macroangiopathy: the MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Diabetes Care*. 2008; 31(3):464-9. Epub 2007 Nov 26.
 58. Lyons TJ, Basu A. Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers. *Transl Res*. 2012; 159(4):303-12.
 59. Sandhu HS, Butt AN, Powrie J, Swaminathan R. Measurement of circulating neuron-specific enolase mRNA in diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci*. 2008; 1137:258-63.
 60. Iwasaki T, Togashi Y, Terauchi Y. Significant association of serum albumin with severity of retinopathy and neuropathy, in addition to that of nephropathy, in Japanese type 2 diabetic patients. *Endocrin J*. 2008; 55(2):311-6.
 61. Shlipak MG, Ix JH, Bibbins-Domingo K, Lin F, Whooley MA. Biomarkers to predict recurrent cardiovascular disease: The Heart and Soul Study. *Am J Med*. 2008; 121:50-7.
 62. Jurado J, Ybarra J, Ferrandiz M, Comerma L, Pou JM. Is the aminoterminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) a marker for DPN? *Diabetes Care*. 2007; e86, 30.
 63. Acosta J, Qin X, Halperin J. Complement and complement regulatory protein as a potential molecular targets for vascular diseases. *Curr Pharm*. 2004; 10(2):203-11.
 64. Aarli A. Role of cytokines in neurological disorders. *Curr Med Chem*. 2003; 10(19):193-7.
 65. Satoh J, Yagihashi S, Toyota T. The possible Role of Tumor Necrosis Factor-alpha in Diabetic Polyneuropathy. *Int J Exp Diabetes Res*. 2003; 4(2):65-71.
 66. Skundric DS, Lisak RP. Role of neuropoietic cytokines in development and progression of diabetic polyneuropathy from glucose metabolism to neurodegeneration. *Int J Exp Diabetes Res*. 2003; 4(4):303-12.

67. Jiang X, Kanai H, Shigehara T, Maezawa A, Yano S, Naruse T. Metabolism of transforming growth factor-beta in patients receiving haemodialysis specially those with renal osteodystrophy. *Renal Failure*. 1988; 20:135-45.
68. Hong SY, Yang DH. Insulin levels and fibrinolytic activity in patients with end-stage renal disease. *Nephron*. 1994; 68:329-33.
69. Delarue J, Maingourd C, Couet C, Vidal S, Bagros P, Lamisse F. Effects of oral glucose on intermediary metabolism in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients versus healthy subjects. *Periton Dialys Int*. 1998; 18:505-11.
70. Krag S, Osterby R, Chai Q, Nielsen CB, Hermans C, Wogensen L. TGF β 1 induced glomerular disorders is associated with impaired concentrating ability mimicking primary glomerular disease with renal failure in men. *Lab Invest*. 2000; 80:1855-58.
71. Reeves WP, Andreoli TE. Transforming growth factor α contributes to progressive diabetic nephropathy. *P Natl Acad Sci USA*. 2000, 97:7667-9.
72. Anjaneyulu M, Berent-Spillson A, Inoue T, Choi J, Cherian K, Russell JW. Transforming growth factor-beta induces cellular injury in experimental diabetic neuropathy. *Exp Neurol*. 2008; 211:469-79.
73. Burdon KP, Langefeld CD, Wagenknecht LE, Carr JJ, Freedman BI, Herrington D et al. Association analysis of genes in the renin-angiotensin system with subclinical cardiovascular disease in families with type 2 diabetes mellitus: the Diabetes Heart Study. *Diabetic Med*. 2006; 23:228-34.
74. Klemm T, Paschke R. [Possible genetic causes for late complications of diabetes mellitus.] *Med Klin (Munich)*. 2000; 15;95(1):31-9.
75. Sivenius K, Pihlajamaki J, Partanen J, Niskanen L, Laakso M, Uusitupa M. Aldose reductase gene polymorphisms and peripheral nerve function in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(8):2021-6.
76. Wang F, Fang Q, Yu N, Wang F, Fang Q, Yu N et al. Association between genetic polymorphism of the angiotensin-converting enzyme and diabetic nephropathy: A meta-analysis comprising 26,580 subjects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2012; 13:161-74.

77. Lu Y, Ge Y, Hu Q, Shi Y, Xue C, Shi Y et al. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and diabetic retinopathy in the Chinese population. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2012; 13:289-95.
78. Niu W, Qi Y, Gao P. Angiotensin converting enzyme D allele is associated with an increased risk of type 2 diabetes: Evidence from a meta-analysis. *Endocr J.* 2010; 57:431-8.
79. Stephens JW, Dhamrait SS, Acharya J, Humphries SE, Hurel SJ. A common variant in the ACE gene is associated with peripheral neuropathy in women with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complicat.* 2006; 20:317-21.
80. Jurado J, Pastoret M, Ybarra J, Gich I, Pou JM. Cardiovascular disease, diabetic polyneuropathy and ACE gen polymorphisms in the North Catalonia Diabetes Study (NCDS). *Diabetes.* 2006; 55: A507-A507 Suppl.
81. Suzuki Y, Taniyama M, Muramatsu T, Higuchi S, Ohta S, Atsumi Y et al. ALDH2/ADH2 polymorphism associated with vasculopathy and neuropathy in type 2 diabetes. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004; 28 (8 Suppl):111S-116S.
82. Ito H, Tsukui S, Kanda T, Utsugi T, Ohno T, Kurabayashi, M. Angiotensin-converting enzyme insertion/detection polymorphism and polyneuropathy in type 2 diabetes without macroalbuminuria. *J Int Med Res.* 2002; 30:476-82.
83. World Health Organization (WHO) [Internet]. Ginebra: WHO; 2012 [actualizado en enero 2015, citado el 2 de marzo de 2015]. *Diabetes. Fact sheet 312.* Disponible en: . <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
84. Isomaa B, Henricsson M, Almgren P, Tuomi T, Taskinen MR, Groop L. The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with type II diabetes. *Diabetologia.* 2001; 44(9):1148-54.
85. Costa LA, Canani LH, Lisboa HR, Tres GS, Gross JL. Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2004; 21(3):252-5.
86. Bonadonna RC, Cucinotta D, Fedele D, Riccardi G, Tiengo A. The metabolic syndrome is a risk indicator of microvascular and macrovascular complications in diabetes: results from Metascreen, a multicenter diabetes clinic-based survey. *Diabetes Care.* 2006; 29(12):2701-7.

87. Hsu WC, Chiu SY, Yen AM, Chen LS, Fann CY, Liao CS et al. Somatic neuropathy is an independent predictor of all- and diabetes-related mortality in type 2 diabetic patients: a population-based 5-year follow-up study (KCIS No. 29). *Eur J Neurol*. 2012; 19(9):1192-8.
88. Chung JO, Cho DH, Chung DJ, Chung MY. Association between Diabetic Polyneuropathy and Cardiovascular Complications in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Metab J*. 2011; 35(4):390-6.
89. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med*. 2000; 342:1350-58.
90. Navarro JF, Mora C. Diabetes, inflammation, proinflammatory cytokines, and diabetic nephropathy. *Scientific World Journal*. 2006; 6: 908-17.
91. Hamano K, Nakadaira I, Suzuki J, Gonai M. N-terminal fragment of pro-brain natriuretic peptide is associated with diabetes microvascular complications in type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag*. 2014; 10:585-9.
92. Li Y, Tong N. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2014; Aug 20. [Epub ahead of print].
93. Degirmenci I, Kebapci N, Basaran A, Efe B, Gunes HV, Akalin A et al. Frequency of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in Turkish type 2 diabetic patients. *Int J Clin Pract*. 2005; 59(10):1137-42.
94. Inanir A, Basol N, Karakus N, Yigit S. The importance of association between angiotensin-converting enzyme (ACE) Gene I/D polymorphism and diabetic peripheral neuropathy. *Gene*. 2013; 520:253-6.
95. Rudofsky G, Jr Reismann P, Witte S, Humpert PM, Isermann B, Chavakis T et al. Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27:179-83.
96. Sibal L, Law HN, Gebbie J, Home P. Cardiovascular risk factors predicting the of distal symmetrical polyneuropathy in people with type 1 diabetes: A 9-year follow-up study. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1084:304-18.

97. Owolabi MO, Ipadeola A, Adeleye JO. Aggregate cardiovascular risk is a stronger statistical correlate of clinically evident diabetic peripheral neuropathy than HbA1c alone. *J Natl Med Assoc.* 2010; 102(8):707-12.
98. Owolabi MO, Ipadeola A. Total vascular risk as a strong correlate of severity of diabetic peripheral neuropathy in Nigerian Africans. *Ethn Dis.* 2012; 22(1):106-12.
99. Baldereschi M, Inzitari M, Di Carlo A, Bovis F, Maggi S, Capurso A et al. ILSA Working Group: Vascular factors predict polyneuropathy in a nondiabetic elderly population. *Neurol Sci.* 2013; 34(6):955-62.
100. Teunissen LL, Franssen H, Wokke JHJ et al. Is cardiovascular disease a risk factor in the development of axonal polyneuropathy? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002; 72:590-95.
101. Mundet X, Pou A, Piquer N, Sanmartin MI, Tarruella M, Gimbert R, Farrus M. Prevalence and incidence of chronic complications and mortality in a cohort of type 2 diabetic patients in Spain. *Prim Care Diabetes.* 2008; 2(3):135-40.
102. Arrieta F, Piñera M, Iglesias P, Nogales P, Salinero-Fort MA, Abanades JC, Botella-Carretero JI, Calañas A, Balsa JA, Zamarrón I, Rovira A, Vázquez C; ESD2 Group. Metabolic control and chronic complications during a 3-year follow-up period in a cohort of type 2 diabetic patients attended in primary care in the Community of Madrid (Spain). *Endocrinol Nutr.* 2014; 61(1):11-7.
103. Perkins BA, Orszag A, Ngo M, Ng E, New P, Bril V. Prediction of incident diabetic neuropathy using the monofilament examination: a 4-year prospective study. *Diabetes Care.* 2010; 33(7):1549-54.

ANEXO I

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La Doctora Adelaida Zabalegui Yarnoz y el Doctor Josep Vidal Cortada, como directores de la tesis “MARCADORES DE RIESGO DE POLINEUROPATÍA DIABÉTICA EN LA DIABETES TIPO 2” presentada por el doctorando Don Jerónimo Jurado Campos, de acuerdo con lo establecido los apartados 1.c y 2.b del artículo 37 -para tesis doctorales presentadas como compendio de publicaciones- de las normas de la Escuela de Doctorado de la Universitat de Barcelona (actualizadas el 18 de julio de 2014), emiten el siguiente,

INFORME:

En relación con los artículos compendiados en la tesis, ninguno de los coautores los ha utilizado, implícitamente o explícitamente, para elaborar una tesis doctoral, ni consta que estén pendientes de utilizarlos en un futuro. Los artículos son los siguientes:

1. *Transforming Growth Factor 1 (TGFB1) as a biomarker of Diabetic Peripheral Neuropathy: Cross-sectional Study. J Diabetes Complications 2010; 24(5):306-312. Impact Factor: 2,147 (Journal Citation Reports 2010), Q3 (Endocrinology & Metabolism).*
2. *Angiotensin converting enzyme gene polymorphisms as a genetic biomarker of diabetic peripheral neuropathy: Longitudinal prospective study. J Diabetes Complications 2012; 26(2):77-82. Impact Factor: 2,056 (Journal Citation Reports 2012), Q3 (Endocrinology & Metabolism).*

3. *Cardiovascular disease predicts diabetic peripheral polyneuropathy in subjects with type 2 diabetes: A 10 year prospective study. Eur J Cardiovasc Nurs. 2014 Dec 19. pii: 1474515114565215. [Epub ahead of print]. Impact Factor: 1,828 (Journal Citation Reports 2013), Q1 (Nursing).*

Mediante una exhaustiva y destacada participación en todas las fases de las investigaciones, el doctorando ha demostrado capacidad para desarrollar investigación de alta calidad.

El doctorando es responsable del diseño y la elaboración de los proyectos de investigación que han derivado en las publicaciones compendiadas. Como Investigador Principal obtuvo financiación en tres convocatorias del Fondo de Investigación Sanitaria [FIS 01/0846, FIS PI040181 y FIS PI070340]; gestionó la configuración de los equipos, la implementación, el seguimiento y la coordinación de los proyectos; ha colaborado en el análisis/interpretación de los resultados; ha coordinado la divulgación de los resultados; y ha sido el principal impulsor, coordinador y redactor de las publicaciones.

Los trabajos publicados configuran una unidad temática idónea para la presentación de la tesis como compendio de publicaciones: enfocados hacia un problema de salud importante y de elevada prevalencia, aportan nuevos conocimientos sobre marcadores de riesgo de presentar o desarrollar polineuropatía diabética, y abren vías innovadoras o poco estudiadas en su investigación con resultados aplicables a la práctica clínica.

Por los motivos expuestos anteriormente y a los efectos de la mencionada tesis doctoral, emiten el presente informe, en Barcelona a 2 de marzo de 2014.

Dra. Adelaida Zabalegui Yarnoz
Directora de Enfermería
Hospital Clínic Barcelona

Dr. Josep Vidal Cortada
Jefe del Servicio de Endocrinología
Hospital Clínic Barcelona

ANEXO II

Otras publicaciones del doctorando sobre la diabetes tipo 2

Jerónimo Jurado-Campos, Edurne Zabaleta-del-Olmo, Carme Farré-Grau, Josep Barceló-Prats, Dolors Juvinyà-Canal. Recursos y modelos de atención al pie diabético en Cataluña (España): Estudio descriptivo sobre espacios de mejora. *Aten Prim* 2012; 44:394-401.

(Orden ALFABETICO) M Abed, C Adelbrecht, JA Amado, J Amighi, HJ Ankersmit, JR de Berrazueta, E Bobbioni-Harsch, K Boyle, C Buechler, M Buemi, V Cernaro, JK Chang, CH Chen, WP Cheng, A Cuocolo, RPF Dullaart, P Ghafourifar, P Guzik, MM Hoffmann, J Jurado, V Kytö, F Lang, M Lichtenauer, ZY Lin, Y Minami, D Montero, F Mookadam, E Nicolai, R Pacher, R Rahimian, M Satoh, P Saukko, E Selzer, KG Shyu, J Sztajzel, A Vinet, MA Walter, M Willmann, K Winkler, A Wykretowicz, MY Köker, J Ybarra. “Research update for articles published in EJCI in 2009”. *Eur J Clin Invest* 2011; 41(11)1149-63.

Jurado J, Ybarra J, Romeo JH, Pou JM. Clinical Screening and Diagnosis of Diabetic Polyneuropathy: The North Catalonia Diabetes Study. *Eur J Clin Invest* 2009; 39(3)183-9.

Jerónimo Jurado Campos. La Infermeria d’Atenció Primària en l’atenció als problemes del peu en la diabetes tipus 2 a Catalunya. Edita: Universitat de Girona. Departament d’Infermeria. Girona 2009. ISBN: 978-84-692-5166-9. DL: GI-906-2009. Tesis Doctorales en Red <http://www.tdx.cat/TDX-0721109-103806>.

Jurado J, Caula JA, Hernández JM, Juvinyà D, Pou JM. Supresión de un programa de educación especializada en diabetes en atención primaria: Impacto a largo plazo sobre los resultados del control metabólico. *Aten Prim* 2009; 41(12):681-7.

Jurado J, Ybarra J, Solanas P, Caula J, Gich I, Pou JM, Romeo JH. Prevalence of cardiovascular disease and risk factors in a type 2 diabetic population of the North Catalonia diabetes study. *J Am Acad Nurse Pract* 2009; 21 (3)140-8.

Jurado J, Ybarra J, Ferrándiz M, Comerma L, Pou JM. Amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NTproBNP) is related to the presence of diabetic polyneuropathy independently of cardio-vascular disease. *Diabetes Care* 2007; Aug; 30(8):e86.

Jurado J, Ybarra J, Padrós C, Castell C, Pou JM. Escenarios de la diabetes: Los problemas del pie. *Anales de Patología Vascolar* 2007 sept octub 1(3):130-135.

Jurado J, Caula J, Pou JM i Torelló. Selección de Riesgo y Diagnóstico de la Polineuropatía Diabética. Validación Metodológica de Nuevos Sistemas. *Aten Prim* 2006; 38(2):116-121.

Jurado J, García JM, Gich I, Pou JM. The impact of previous diabetes education level on the control of cardiovascular risk factors in type 2 diabetic patients at the start of the North Catalonia Diabetes Study. *Int J Diabetes & Metab* 2006; 14:57-63.

Jurado J, Blanco R, Llover M, Vidal J, Pou JM. Evaluación de la neuropatía diabética y de diferentes factores de riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes tipo 2 de edad avanzada atendidos en asistencia primaria. *Endocrinol Nutr* 2002; 49(10):316-22.

Jerónimo Jurado Campos

MARCADORES DE RIESGO DE POLINEUROPATÍA DIABÉTICA EN LA DIABETES TIPO 2

Tesis para obtener el título de doctor por la Universitat de Barcelona. Programa de doctorado Medicina

Año 2015



Health Universitat de
Barcelona
Campus



Barcelona
Knowledge
Campus

Jerónimo Jurado Campos

MARCADORES DE RIESGO DE POLINEUROPATÍA DIABÉTICA EN LA DIABETES TIPO 2

Tesis para obtener el título de doctor por la Universitat de Barcelona. Programa de doctorado Medicina

Año 2015