



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA

TRABALLO FIN DE GRAO DE MEDICINA

Título do TFG: Asociación de los valores séricos de transferrina deficiente en carbohidratos (transferrina desialilada) con alteraciones metabólicas frecuentes en la población

Autora: Fátima de la Osa Benhadhoum

Titores: Tomás González Vidal e Arturo González Quintela

Departamento: Área de Medicina

Curso académico: 2024-2025

Convocatoria: Xuño 2025

Arturo González Quintela, catedrático del Área de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela,

Hago constar:

Que el trabajo titulado “*Asociación los valores séricos de transferrina deficiente en carbohidratos (transferrina desialilada) con alteraciones metabólicas frecuentes en la población*” ha sido realizado por la alumna D^a Fátima de la Osa Benhadhoum bajo mi dirección y la del Dr. Tomás González Vidal.

La alumna ha aprovechado para este TFG los datos del estudio AEGIS (*A-Estrada Glycation and Inflammation Study*). El estudio, de base poblacional adulta tras muestreo aleatorio, fue iniciado en 2011 y continúa en seguimiento actual. Como es natural, la alumna no participó en la recogida inicial de datos que dio base al estudio. La alumna ha participado en el seguimiento y en análisis e interpretación de los datos que han dado lugar a un manuscrito que ha iniciado su proceso de publicación. Su participación la faculta como coautora de dicha publicación, cuyo manuscrito, ya enviado a una revista, se adjunta como anexo a este TFG.

Por el motivo mencionado en el párrafo anterior, algunas de las figuras (las contenidas en el artículo enviado) se han mantenido en su formato en lengua inglesa.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Arturo Quintela', is positioned above a horizontal dashed line.

Prof. Arturo González Quintela
Mayo de 2025

Índice

Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción	6
1.1. La glicómica y la glicosilación	6
1.2. La transferrina deficiente en carbohidratos (transferrina deficiente en ácido siálico)	8
2. Objetivos	11
3. Métodos	11
3.1. Diseño y ámbito del estudio	11
3.2. Determinaciones principales	11
3.2.1. Variables de estilo de vida	11
3.2.2. Determinaciones metabólicas	12
3.2.3. Determinación de la transferrina deficiente en carbohidratos (CDT) en suero	12
3.3. Aspectos éticos	13
3.4. Análisis estadísticos	13
4. Resultados	13
4.1. Distribución general de las concentraciones séricas de CDT	14
4.2. Relación de la CDT con variables demográficas y de estilo de vida	14
4.3. Relación de la CDT con variables metabólicas	15
4.4. Valor predictivo de las isoformas de transferrina en la incidencia de diabetes mellitus ...	20
5. Discusión	22
6. Conclusiones	24
7. Referencias	26
Anexo I	30

Artículo “*Diabetes and obesity modify the effect of alcohol consumption on carbohydrate-deficient transferrin*” remitido a la revista *Glycobiology*

Resumen

Antecedentes y objetivo: Los niveles séricos de transferrina deficiente en carbohidratos (CDT, la suma de sus glicoconjugados asialilados y disialilados) son un marcador comercial del abuso de alcohol. Este estudio tuvo como objetivo investigar, en una población adulta general, la posible influencia de factores metabólicos en los niveles séricos de CDT y el valor predictivo de las glicoconjugaciones de la transferrina para el desarrollo de la diabetes mellitus.

Métodos: Los niveles séricos de CDT se midieron mediante electroforesis capilar en 1516 individuos (edad mediana de 52 años; 55.3% mujeres) seleccionados aleatoriamente de la población adulta general de un municipio.

Resultados: El índice de masa corporal y la presencia de diabetes mellitus modificaron el efecto del consumo de alcohol sobre los niveles de CDT; es decir, los niveles de CDT en bebedores excesivos fueron más bajos en personas con obesidad que en aquellas con peso normal, y también fueron más bajos en personas con diabetes que en individuos normoglucémicos. La abundancia relativa de las isoformas de transferrina no se asoció significativamente con el desarrollo de diabetes mellitus tras un seguimiento medio de 7.4 años.

Conclusiones: Existe una interacción entre el consumo de alcohol y factores asociados con la resistencia a la insulina en relación con la sialilación de la transferrina. El valor diagnóstico de la CDT para la detección del consumo excesivo de alcohol puede estar limitado en pacientes con obesidad o diabetes mellitus.

Abstract

Background and aims: Serum levels of carbohydrate-deficient transferrin (CDT, the sum of its asialylated and disialylated glycoforms) are a commercial marker of alcohol abuse. The aim of this was to investigate, the potential influence of metabolic factors on serum CDT levels and the predictive value of transferrin glycoforms for the development of diabetes mellitus in a general adult population.

Methods: Serum CDT levels were measured by capillary electrophoresis in 1516 individuals (median age 52 years; 55.3% women) randomly selected from the general adult population of a municipality.

Results: Insulin resistance and the associated body mass index and diabetes mellitus modified the effect of alcohol consumption on CDT levels, i.e., CDT in heavy drinkers was lower in individuals with obesity than in lean counterparts and was also lower in people with diabetes than in normoglycemic individuals. The relative abundance of transferrin glycoforms was not significantly associated with the development of diabetes mellitus after a mean follow-up of 7.4 of years.

Conclusions: There is an interaction between alcohol consumption and factors associated with insulin resistance in relation to transferrin sialylation. The diagnostic value of CDT for detecting heavy alcohol consumption may be limited in patients with obesity or diabetes mellitus.

1. Introducción

1.1. La glicómica y la glicosilación

La identidad de la totalidad de carbohidratos de un organismo o un elemento del mismo es referida colectivamente como el **glicoma**. La **glicómica**, un término análogo al de otras "ómicas", como genómica y proteómica, es el estudio comprensivo de los glicomas, incluyendo, entre otros, aspectos genéticos, fisiológicos y patológicos. Ya en el año 2003, el MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) incluyó en su revista periódica a la glicómica (Figura 1) entre las 10 tecnologías que cambiarán el mundo. "Sin glicosilación, no hay vida" [MIT 2003].

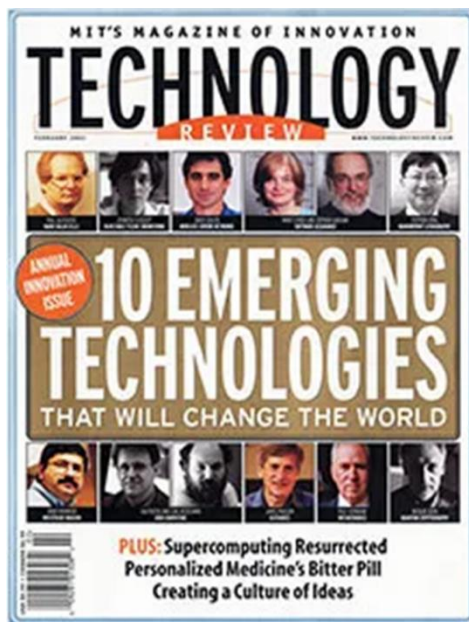


Figura 1. Portada de la revista *MIT's Magazine of Innovation Technology* en 2003. Entre las 10 tecnologías emergentes que cambiarán el mundo, la revista incluye la glicómica, con el número 7.

Sin embargo, la glicómica ha recibido menos atención que otras disciplinas análogas, como la proteómica o la genómica. Es posible que ello sea debido a la complejidad de los azúcares, a la variabilidad de la glicosilación de unas personas a otras y a lo largo de la vida de la misma persona, así como a la dificultad técnica para los estudios glicómicos. También es verdad que la glicómica rompe, de alguna manera, el esquema clásico de ADN → ARN → proteína → función, ya que la diferente glicosilación de las proteínas puede modificar significativamente su función. Baste decir, como ejemplos, que un cambio en un único glicano en la inmunoglobulina E (IgE) puede condicionar el desarrollo o no de anafilaxia [Shade *et al.*, 2015] o que la diferente glicosilación de un anticuerpo monoclonal terapéutico puede modificar su mayor o menor efectividad [Cymer *et al.*, 2018].

Una gran parte de las proteínas tienen glicanos unidos a ellas y son por tanto glicoproteínas. Los glicanos se unen a las proteínas por enlaces covalentes de tipo N- (al grupo amida del aminoácido asparagina, Figura 1) o bien por enlaces de tipo O- (al grupo hidroxilo de serina o treonina). Los más abundantes en el humano, los más estudiados hasta la fecha y aquellos cuyas

variantes más se han visto asociadas a enfermedad son los N-glicanos [Varki et al., 2008], cuya estructura general se representa en la Figura 2.

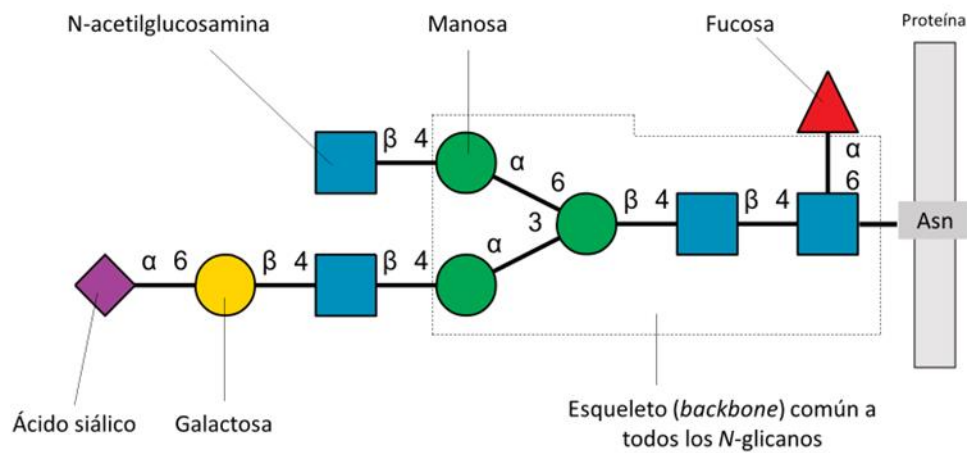


Figura 2. Ejemplo de la estructura y nomenclatura de los N-glicanos. Todos los N-glicanos contienen una columna vertebral (*backbone*) común de dos moléculas de N-acetilglucosamina. La primera de ellas se une al aminoácido asparagina (Asn) en la proteína. La segunda de ellas se une a una molécula de manosa que, a su vez, está unida a otras dos manosas que completan el esqueleto común. Estas últimas manosas pueden estar o no unidas a moléculas de N-acetilglucosamina, cuyo número determina la ramificación (en el caso dibujado en la figura, hay 2 ramificaciones o antenas). Estas moléculas de N-acetilglucosamina pueden estar o no galactosiladas (una de ellas lo está, en el caso de la figura) y la galactosa puede estar o no sialilada, como en este ejemplo. Algunos glicanos, como el de la figura, pueden estar fucosilados. La fucosa puede unirse a la primera N-acetilglucosamina del backbone (*core-fucose*, como en el ejemplo presentado) o la fucosilación puede estar en las ramas periféricas (*outer arm fucose*). De acuerdo con la agrupación por sus características [Saldova et al., 2014] el N-glicano aquí presentado, se clasificaría como biantenarío, core-fucosilado, monogalactosilado y monosialilado. En la nomenclatura internacional SNFG (*Symbol Nomenclature for Glycans*) su denominación sería FA2[3]G1S[6]1 (F de fucosa, A de antenas, G de galactosa y S de síalico; los números entre corchetes indican la posición molecular del enlace químico en la molécula). El gráfico es de elaboración de los autores.

La **glicosilación** es un proceso enzimático diferente de la mera **glicación** química y es la modificación post-traslacional más común de las proteínas (Tabla 1). La **glicación** es un proceso patológico, no regulado, que suele ocurrir en proteínas plasmáticas a las que, de forma no enzimática, se unen moléculas de azúcares simples cuya estructura química puede modificarse posteriormente, resultando una proteína anormal e inestable. Un ejemplo característico es la hemoglobina glicada como resultado de la hiperglucemia en la diabetes mellitus, que se usa clínicamente como marcador de su buen o mal control. La **glicosilación** (Tabla 1), por el contrario, es un proceso fisiológico, enzimático, sometido a mecanismos de regulación, que ocurre de modo intracelular (en el citosol; se inicia en el retículo endoplásmico y se completa en el aparato de Golgi) y de cual, mediante la unión de glicanos complejos, resulta una proteína estable y funcionalmente activa. Para ello intervienen diversas enzimas glicosiltransferasas, codificadas por sus respectivos genes [Varki et al., 2008]. Los genes que codifican proteínas directamente involucradas en la biosíntesis de glicanos son múltiples y comprenden del 1 al 4 % de todos los genes humanos [Kikuchi y Narimatsu, 2006; Narimatsu, 2006; Cummings y Pierce,

2014]. La glicosilación se da en todas las células eucariotas y afecta al 25%-50% las proteínas humanas, incluidas casi todas las proteínas de membrana y secretadas, que son así glicoproteínas [Apweiler et al., 1999; Khoury et al., 2011; Moremen et al., 2012].

Tabla 1. Diferencias entre glicación y glicosilación		
Característica	Glicación	Glicosilación
Tipo de modificación	No enzimática	Enzimática
Regulación	No	Sí
Molécula añadida a la proteína (o a otro elemento)	Azúcares simples: glucosa, fructosa o galactosa, con modificaciones posteriores	Glicanos (O-glicanos o N-glicanos) más o menos complejos, compuestos de N-acetilglucosamina, manosa, galactosa, fucosa y ácido siálico
Lugar y modo donde se realiza el cambio	Fundamentalmente en la circulación: adición covalente a proteína o lípido	En el retículo endoplásmico liso o el aparato de Golgi: modificación postraslacional intracelular
Proteínas involucradas	Maduras	Inmaduras o no modificadas
Efecto predominante	Hace la proteína anormal e inestable	Hace la proteína funcional (función variable según la glicosilación) y estable
Ejemplo	Hemoglobina glicada	Glicosilación variable de la transferrina

La glicosilación de las proteínas es variable de un individuo a otro y es variable para un mismo individuo en función de circunstancias ambientales; y se asocia, como causa o consecuencia, con enfermedades. Así pues, la variabilidad glicómica es mucho mayor que la variabilidad genómica o proteómica. Esto es especialmente importante, porque la diferente glicosilación de las proteínas influye en su estabilidad, conformación espacial, en la interacción con otras proteínas y en la diferenciación y desarrollo celular. Influye, por todo ello, en la salud y en la enfermedad [Varki et al., 2008], como ya se ha comentado. Por todo ello, los marcadores glicómicos están adquiriendo protagonismo en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades. Lo que sigue a continuación es un ejemplo.

1.2. La transferrina deficiente en carbohidratos (transferrina deficiente en ácido siálico)

La transferrina, una de las proteínas circulantes más abundantes, se produce fundamentalmente en el hígado y su función es la de transportar hierro [Clerc et al., 2016]. La transferrina tiene varias isoformas que derivan de su diferente glicosilación [Stibler, 1991; Arndt, 2001; Bortolotti et al., 2006; Clerc et al., 2016]. La transferrina tiene dos puntos de N-glicosilación en los residuos de asparagina en las posiciones 432 and 630 de la proteína [Spik et al., 1985; Clerc et al., 2016]. Los N-glicanos de la transferrina son fundamentalmente biantenarios o triantenarios, con o sin core-fucosilación, mayoritariamente sialilados [Spik et al., 1985; Clerc et al., 2016; Trbojević-Akmačić et al., 2023]. Los ácidos siálicos (N-acetilneuramínicos) son amino-azúcares cargados negativamente que se encuentran comúnmente, como ya se ha comentado más arriba (Figura

1), en el extremo terminal de los N-glicanos y participan así en múltiples interacciones moleculares y celulares [Schauer, 2009; Ibrahim et al., 2024]. En consecuencia, bajo condiciones normales, aproximadamente el 15% de las isoformas de transferrina circulan como pentasialotransferrina, el 75% como tetrasialotransferrina, el 5% como trisialotransferrina, menos del 2% como disialotransferrina, y menos del 1% como monosialo- o asialotransferrina [Arndt, 2001]. El concepto de transferrina deficiente en carbohidratos (CDT, por sus siglas en inglés [*Carbohydrate-Deficient Transferrin*]) se refiere colectivamente al grupo de isoformas de transferrina con un menor grado de glicosilación (específicamente, deficiencia de residuos de ácido siálico, es decir, la suma de disialo-, monosialo- [casi ausente en condiciones normales] y asialotransferrina) [Stibler, 1991; Arndt, 2001; Bortolotti et al., 2006]. La proporción y cantidad de CDT pueden calcularse mediante diferentes métodos [Arndt, 2001; Fleming et al., 2004], entre los cuales la electroforesis capilar es uno de los disponibles comercialmente [Bortolotti et al., 2007].

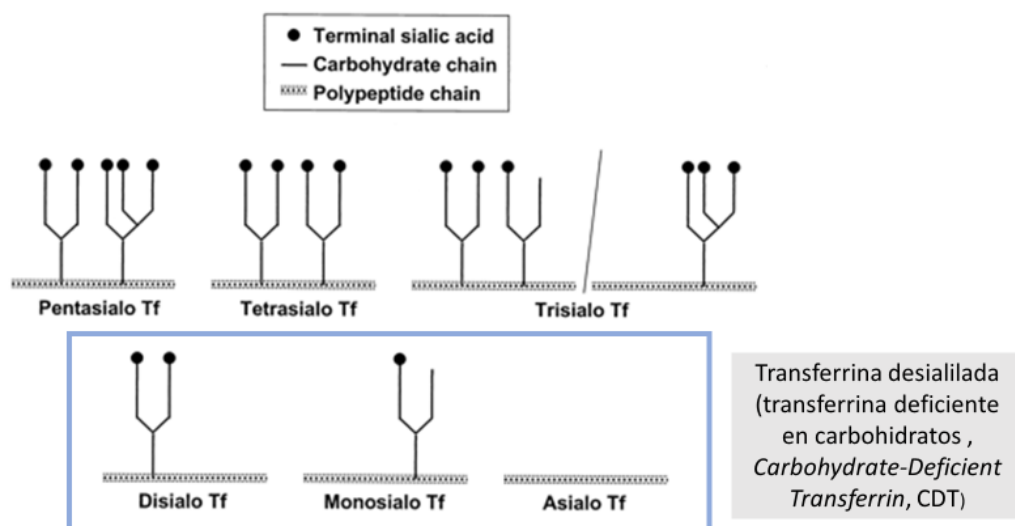


Figura 3. Representación esquemática de las diferentes isoformas de la transferrina según su glicosilación, concretamente respecto al número de residuos terminales de ácido siálico en sus dos puntos de N-glicosilación (modificado de Helander et al., 2001).

El abuso de alcohol se asocia con trastornos en la glicosilación de proteínas [O’Flaherty et al., 2023], por lo que el aumento de la CDT ha generado interés como marcador de consumo excesivo de alcohol [Stibler, 1991; Arndt, 2001; Bortolotti et al., 2006; Niemelä, 2007; Fagan et al., 2013, 2014; Morinaga et al., 2022]. El mecanismo del aumento de CDT en personas con abuso de alcohol no se conoce completamente, pero posiblemente se deba a una alteración en la actividad de las glicosil-transferasas inducida por el acetaldehído, el principal metabolito del etanol [Stibler & Borg, 1991; Ghosh et al., 1995; Gong et al., 2008]. La CDT se considera generalmente anormal cuando su porcentaje (%CDT) es superior al 2.5% o si sus niveles aumentan en un 25% [Fleming et al., 2004], aunque otros autores consideran que un valor igual o superior al 1.6% es específico de un consumo sostenido de grandes cantidades de alcohol

[Bergstrom & Helander, 2008]. El aumento de la CDT es un marcador confiable del abuso de alcohol, aunque en general su especificidad es mejor que su sensibilidad [Stibler, 1991; Niemela, 2007, 2016]. Los trastornos congénitos de la glicosilación inducen cambios en la CDT similares a los del consumo de alcohol [Babovic-Vuksanovic & O'Brien, 2007; Lipiński P & Tylki-Szymańska, 2021; Raynor et al., 2024].

Los trastornos metabólicos (obesidad, síndrome metabólico y la resistencia a la insulina asociada) pueden influir en las concentraciones de CDT, aunque el tema ha sido escasamente estudiado. Bergström y Helander encontraron diferencias pequeñas y en su mayoría no significativas estadísticamente en CDT entre 1387 individuos de diferentes países, etnias, edades, sexos e índice de masa corporal (IMC) [Bergström & Helander, 2008]. Sillanauke et al. mostraron que el IMC se asoció negativamente con la CDT en una muestra poblacional de 8025 hombres y mujeres de Finlandia [Sillanauke et al., 2000]. Whitfield et al. hallaron efectos significativos del IMC sobre la curva dosis-respuesta entre alcohol y CDT en un estudio de 2088 hombres y mujeres de un registro comunitario de gemelos [Whitfield et al., 1998, 2008], es decir, el IMC y las anomalías lipídicas mostraron interacciones con la ingesta de alcohol al influir en los resultados de la CDT [Whitfield et al., 1998, 2008]. Por lo tanto, la CDT puede ser un marcador poco fiable del consumo excesivo de alcohol en individuos con sobrepeso u obesidad [Whitfield et al., 1998, 2008]. Aunque los autores no midieron concentraciones de insulina, especularon que la resistencia a la insulina, indicada por un fenotipo de alto IMC, triglicéridos elevados y colesterol HDL bajo, se asocia con una disminución de la sensibilidad de la determinación de CDT para detectar el abuso de alcohol [Whitfield et al., 1998], lo que indica que la respuesta de la CDT a la ingesta de alcohol es un fenómeno metabólico y que, ya sea la síntesis de los glicanos o el proceso de eliminación de la CDT mediado por receptores, está asociado con aspectos del metabolismo lipídico, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico [Whitfield et al., 2008]. De hecho, Fagerberg et al. y colaboradores (1994) mostraron que la resistencia a la insulina (revelada por estudios de *clamp* euglucémico hiperinsulinémico) se asociaba con menor probabilidad de tener concentraciones altas de CDT en una muestra seleccionada de 48 pacientes con hipertensión arterial a tratamiento, con al menos uno de los siguientes factores: hipercolesterolemia, antecedente de tabaquismo o diabetes mellitus [Fagerberg et al., 1994]. En consonancia con esto, Fagan et al. reportaron que un IMC elevado reduce la utilidad diagnóstica de la CDT para detectar alta ingesta de alcohol en 246 pacientes con enfermedad hepática crónica [Fagan et al., 2013; 2014]. Sin embargo, Morinaga et al. reportaron que la CDT es un marcador útil de consumo de alcohol para el diagnóstico diferencial entre enfermedad hepática alcohólica y no alcohólica en 120 pacientes con enfermedad hepática grasa [Morinaga et al., 2022]. En nuestro conocimiento, no existen estudios poblacionales que hayan investigado la relación de la CDT con la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico y la diabetes mellitus. Este estudio, como se especifica en el apartado siguiente, tuvo como objetivo investigar la posible relación de la CDT con estas variables metabólicas, así como explorar su posible valor predictivo en su desarrollo.

2. Objetivos

1. Investigar la posible asociación de los valores de CDT sérica con alteraciones metabólicas frecuentes en la población adulta en las cuales subyace resistencia a la insulina, como obesidad y sobrepeso, diabetes y prediabetes, en individuos con y sin consumo de alcohol.
2. Investigar el posible valor predictivo de las isoformas de sialilación de la transferrina sérica, incluida la CDT, para el desarrollo de diabetes mellitus en la población general adulta.

3. Métodos

3.1. Diseño y ámbito del estudio

Una descripción detallada de este estudio de cohorte (Estudio A-Estrada sobre Glicación e Inflamación [A-Estrada Glycation and Inflammation Study, AEGIS], NCT01796184; www.clinicaltrials.gov) ha sido publicada previamente [Alende et al., 2019]. El estudio se llevó a cabo en el municipio de A Estrada, en el noroeste de España. Se extrajo una muestra aleatoria estratificada por edad de la población de 18 años o más del Registro del Sistema Nacional de Salud de España, que cubre a más del 95% de la población. Desde noviembre de 2012 hasta marzo de 2015, los participantes fueron convocados sucesivamente en el Centro de Atención Primaria, donde completaron un cuestionario estructurado administrado por entrevistador que recogía datos demográficos y antropométricos e información sobre su estilo de vida (incluyendo actividad física, consumo de alcohol y tabaquismo). Los participantes proporcionaron una muestra de sangre venosa en ayunas. La población del estudio incluyó a 1516 participantes (838 mujeres [55.3%]; edad mediana de 52 años, rango de 18 a 91 años).

3.2. Determinaciones principales

3.2.1. Variables de estilo de vida

Actividad física. Todos los participantes completaron el Cuestionario Internacional de Actividad Física (formato corto) y los equivalentes metabólicos de tarea se calcularon según lo descrito por Craig et al. [Craig et al., 2003].

Consumo de alcohol. El consumo de alcohol se registró en unidades estándar de bebida, sumando el número de copas de vino (aproximadamente 10 g de alcohol por copa), botellas de cerveza (aproximadamente 10 g por unidad) y unidades de bebidas espirituosas (aproximadamente 20 g de alcohol por medida) consumidas regularmente por semana, según se ha descrito anteriormente [Gual et al., 1999; O'Flaherty et al., 2023]. Todos los participantes también completaron el cuestionario AUDIT (*Alcohol Use Disorders Identification Test*), que ha sido validado en España [Rubio-Valladolid et al., 1998].

Tabaquismo. El tabaquismo se registró como el número de cigarrillos consumidos regularmente por día. Se consideraron fumadores aquellos que consumían al menos un cigarrillo al día. Las personas que habían dejado de fumar durante el año anterior también fueron consideradas fumadoras.

3.2.2. Determinaciones metabólicas

Índice de masa corporal (IMC). El IMC se calculó como el peso (en kg) dividido por el cuadrado de la estatura (en metros). En consecuencia, los participantes fueron clasificados como con peso normal (≤ 25 kg/m²), sobrepeso (>25 – 30 kg/m²) u obesidad (>30 kg/m²).

Síndrome metabólico. Se consideró que los participantes presentaban síndrome metabólico si cumplían al menos 3 de los siguientes criterios del Panel de Tratamiento de Adultos III [*Adult Treatment Panel III, ATP-III, 2001*]:

1. Obesidad abdominal (perímetro de cintura >102 cm en hombres y >88 cm en mujeres),
2. Hipertrigliceridemia (triglicéridos en ayunas ≥ 150 mg/dL),
3. Niveles bajos de colesterol HDL (HDL en ayunas <40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL en mujeres),
4. Presión arterial elevada ($\geq 130/\geq 85$ mmHg o tratamiento antihipertensivo en curso),
5. Hiperglucemia (glucosa en ayunas ≥ 110 mg/dL o tratamiento antidiabético actual).

Estado glucémico. Se consideró que una persona tenía diabetes si había sido previamente diagnosticada como tal, o presentaba una hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6.5\%$ y/o una glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dL. La HbA1c se determinó por cromatografía líquida de alta resolución usando un analizador HA-8160 de Menarini Diagnostics; todos los valores se convirtieron a los alineados con el DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) [*Hoelzel, 2004*]. Se consideró que tenían prediabetes aquellos individuos con HbA1c entre 5.7 y 6.4% o glucemia en ayunas entre 100 y 125 mg/dL. El resto de individuos se consideraron normoglucémicos [*American Diabetes Association, 2024*]. Para calcular la incidencia de diabetes, se hizo seguimiento a los individuos sin diabetes desde la evaluación inicial (noviembre 2012–marzo 2015) hasta la fecha de la última analítica registrada en la historia clínica electrónica (julio-agosto de 2022).

Resistencia a la insulina. Se estimó mediante el modelo HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*), calculado como glucosa en ayunas (mg/dL) \times insulina en ayunas (μ U/mL) $\div 405.23$ [*Gayoso-Diz et al., 2013*]. Las concentraciones de insulina se midieron en suero fresco mediante inmunoanálisis quimioluminiscente usando el sistema ADVIA Centaur XP (Siemens, Barcelona, España).

3.2.3. Determinación de la transferrina deficiente en carbohidratos (CDT) en suero

La CDT sérica se determinó utilizando el kit comercial CAPILLARYS CDTTM en un dispositivo MINICAP CDTTM (Sebia, EE.UU.), según lo reportado previamente [*O'Flaherty et al., 2023*]. Se

siguieron estrictamente las instrucciones del fabricante. El análisis se basa en electroforesis capilar. Las isoformas de transferrina se separan según su movilidad electroforética y flujo electroosmótico en el capilar. Las proteínas se detectan directamente en el extremo catódico. Durante el análisis, las isoformas de transferrina se separan en cinco fracciones principales según su nivel de sialilación: asialotransferrina (no sialilada), disialotransferrina, trisialotransferrina, tetrasialotransferrina y pentasialotransferrina. En 17 individuos se observaron variantes de sialilación y en 22 individuos se encontraron interferencias que impidieron determinar el porcentaje de transferrina con 5, 4 y 3 residuos de sialico, aunque se pudo calcular la CDT. Las isoformas con baja sialilación (disialotransferrina, asociada en algunos casos a la asialotransferrina) constituyen el %CDT, cuyo valor se calcula automáticamente. El fabricante recomienda esta interpretación:

1. Normal (%CDT \leq 1.3%),
2. Indeterminado (%CDT $>$ 1.3% y \leq 1.6%),
3. Anormal o indicativo de abuso de alcohol (%CDT $>$ 1.6%).

La transferrina total en suero se midió con un autoanalizador ADVIA-Centaur (Siemens, España). En un participante no se dispuso de esta determinación. La CDT absoluto (en mg/dL) se estimó multiplicando la concentración de transferrina (en mg/dL) por el %CDT.

3.3. Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Regional (código 2012-025) y se ajustó a la Declaración de Helsinki vigente. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado por escrito.

3.4. Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para comparar proporciones. La prueba de Mann-Whitney se usó para comparar variables numéricas entre grupos el test de Jonckheere-Terpstra se usó para valorar la tendencia de variables numéricas entre categorías ordinales. El test de rangos de Spearman se utilizó para analizar la correlación entre variables numéricas. Para el análisis multivariante de los factores asociados al %CDT, se usó un modelo aditivo generalizado para localización, escala y forma (GAMLSS) con distribución Beta. Este método es adecuado para variables de respuesta continuas y acotadas entre 0 y 1, como proporciones, ya que considera su distribución no normal y posible heterocedasticidad [Stasinopoulos *et al.*, 2017]. Para facilitar la interpretación, los coeficientes de regresión beta se transformaron en razones de probabilidades (*odds ratios*, OR) mediante exponenciación. Se evaluó la interacción de primer orden entre las variables predictoras y el consumo de alcohol. La inclusión de estos términos en el modelo final se basó en una prueba de razón de verosimilitud. La asociación entre %CDT e incidencia de diabetes se estimó mediante un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Se calcularon modelos univariantes (efecto independiente de la CDT) y modelos multivariantes (ajustados por factores clínicos de confusión). Los resultados se presentaron

como razones de riesgo (*hazard ratios*, HR) con sus intervalos de confianza del 95%. La capacidad de discriminación del modelo se evaluó usando el índice C. Además, se estudió la asociación entre la concentración relativa de las distintas glicoformas de la CDT y la incidencia de diabetes. Estos datos, de naturaleza composicional, se incluyeron en los modelos predictivos como balances. Un balance representa una relación proporcional entre subconjuntos de partes de una composición, calculado como combinación lineal de los logaritmos de las partes, ponderadas según su importancia relativa. Primero se imputaron ceros mediante un método simple para datos composicionales. Luego, se identificó el balance con mayor capacidad predictiva para la incidencia de diabetes o mortalidad usando un modelo *elastic net* para datos censurados [Pujolassos et al., 2024]. Los análisis se realizaron con el software estadístico R [R Core Team, 2024]. Se utilizó el paquete *gamlss* [Rigby & Stasinopoulos, 2005] para modelar el efecto de variables clínicas sobre la concentración de CDT, el paquete *survival* [Therneau, 2024] para los modelos de Cox, y el paquete *coda4microbiome* [Calle et al., 2024] para tratar las glicoformas de la transferrina como datos composicionales.

4. Resultados

4.1. Distribución general de las concentraciones séricas de CDT

La distribución de las 5 isoformas de transferrina en la población del estudio se muestra en la Figura 4. La isoforma más abundante fue la tetrasialilada. El %CDT mediana (la suma de las isoformas disialilada y asialilada) fue del 0.70% (media, 0.84%; rango intercuartílico, 0.50–0.90%; rango total, 0.10–10.9%). La distribución (histograma) de las concentraciones de CDT en porcentaje y en términos absolutos (mg/dL) se representa en la Figura 5. Ambos parámetros presentaron una distribución sesgada hacia la derecha.

4.2. Relación de la CDT con variables demográficas y de estilo de vida

En el análisis univariado (Tabla 1), las concentraciones de CDT fueron mayores en hombres que en mujeres, y no se observó una relación significativa con la edad ni con la actividad física regular (Tabla 1). Las concentraciones séricas de CDT fueron más elevadas en los fumadores actuales que en los no fumadores (Tabla 1). Como era de esperar, las concentraciones séricas de CDT fueron más altas en los consumidores de alcohol. El efecto del alcohol sobre los niveles de CDT se observó tanto cuando el consumo de alcohol se midió en gramos/semana como cuando se aplicó el cuestionario AUDIT (*Alcohol Use Disorders Identification Test*). El efecto del consumo de alcohol sobre la CDT fue evidente incluso en los bebedores ligeros, en comparación con los abstemios (Tabla 1). Además, se observó una tendencia significativa al aumento de la CDT a medida que aumentaba el consumo de alcohol ($P < 0.001$).

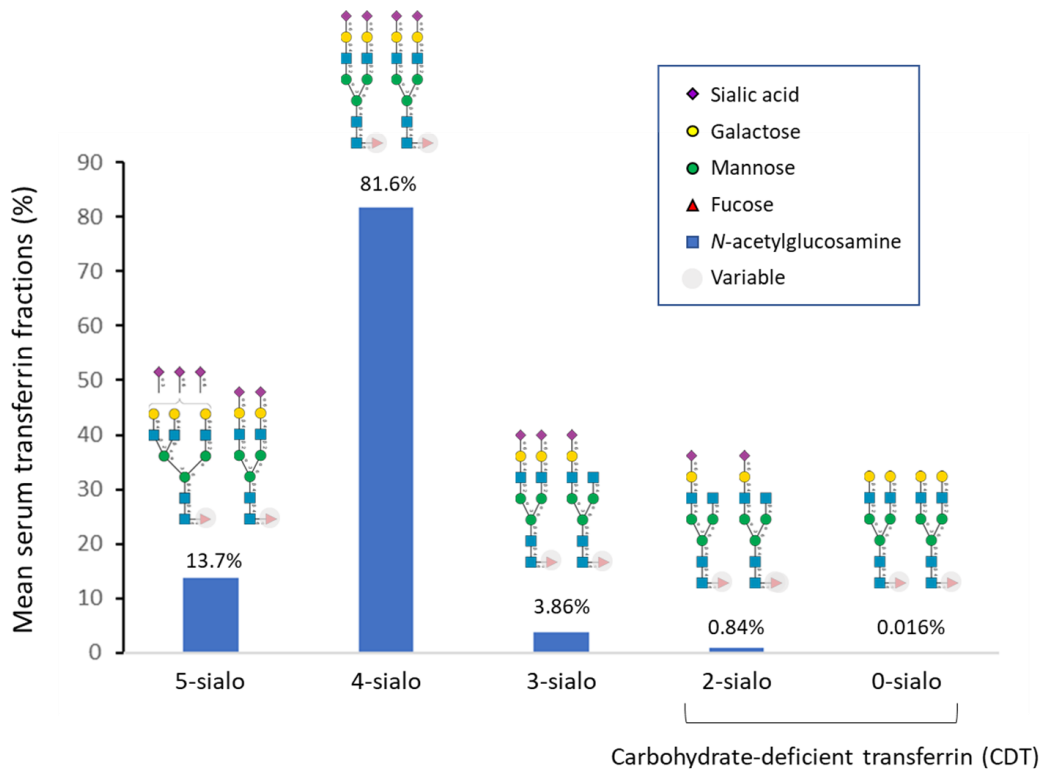


Figura 4. Representación esquemática de la *N*-glicosilación de la transferrina y porcentaje medio de las diferentes glicoformas (pentasialada [5-sialo], tetrasialada [4-sialo], trisialada [3-sialo], disialada [2-sialo], y asialada [0-sialo]) en el presente estudio ($n=1477$; 39 individuos se excluyeron de estos cálculos debido a variantes de sialilación [$n=22$] o interferencias en el método [$n=17$]). En humanos, la transferrina tiene dos puntos de *N*-glicosilación en residuos de asparagina 432 y asparagina 630. Los *N*-glicanos de la transferrina suelen ser de tipo complejo, diantenarios or triantenarios, sialilados, con o sin core fucosilación. Los *N*-glicanos de la transferrina más abundantes son los diantenarios, disialilados y afucosilados [Clerc *et al.*, 2016; Trbojević-Akmačić *et al.*, 2024]. La glicoforma más abundante de la transferrina es la tetrasialilada. La suma de la transferrina disialilada y asialilada es lo que se conoce como CDT (*carbohydrate-deficient transferrin*). Los *N*-glicanos representados en la figura son solo potenciales ejemplos dentro de la gran variabilidad de los *N*-glicanos complejos que se pueden unir a la transferrina [Clerc *et al.*, 2016; Trbojević-Akmačić *et al.*, 2024].

4.3. Relación de la CDT con variables metabólicas

En el análisis univariado (Tabla 1), los individuos con obesidad y los individuos con síndrome metabólico mostraron niveles de CDT significativamente más altos (ya sea como %CDT o en términos absolutos) que los individuos sin estos trastornos, aunque las diferencias en términos absolutos fueron pequeñas (Tabla 1). Asimismo, los niveles de CDT fueron más altos entre individuos con algunos componentes del síndrome metabólico, como hipertensión e hipertrigliceridemia (Tabla 1). Las personas con diabetes ($n=183$; de los cuales 178 [97.3%] tenían diabetes tipo 2) y prediabetes también mostraron niveles más altos de CDT que los individuos normoglucémicos (Tabla 1). En consecuencia, los niveles de CDT fueron mayores entre los participantes con resistencia a la insulina, como lo revelan los valores elevados de HOMA (Tabla 1). Hubo una correlación positiva y significativa entre los valores de HOMA y el %CDT ($Rho = 0.146$; $P < 0.001$).

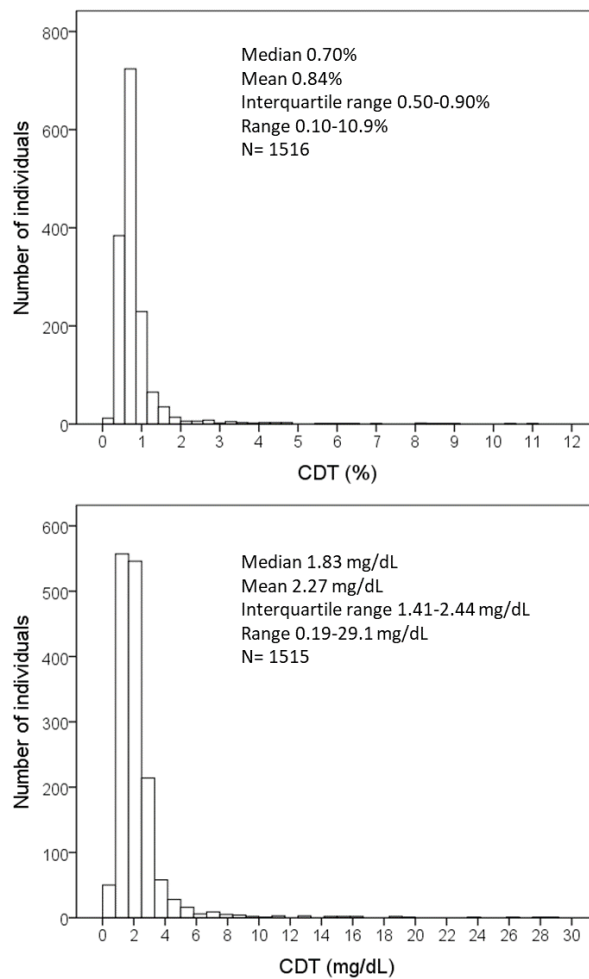


Figura 5. Histograma y términos descriptivos generales de la distribución de los valores de la transferrina deficiente en carbohidratos (*carbohydrate-deficient transferrin*, CDT) del presente estudio, en porcentaje y en términos absolutos (mg/dL).

La Figura 6 muestra la interacción entre el consumo de alcohol y algunas variables metabólicas y de estilo de vida en relación con el %CDT. El efecto del consumo de alcohol sobre la CDT fue menor en los participantes con obesidad y sobrepeso que en aquellos con peso normal. De manera similar, el efecto del alcohol sobre la CDT fue menor en participantes con diabetes y prediabetes que en aquellos con peso normal. Asimismo, el efecto del alcohol fue menor en participantes con resistencia a la insulina (estimada mediante el índice HOMA-IR) que en los participantes sin ella. Por el contrario, el efecto del alcohol sobre la CDT fue mayor en fumadores que en no fumadores (Figura 2).

Entre los 131 participantes con consumo excesivo de alcohol (≥ 280 g/semana), la proporción de individuos con %CDT $\geq 1.6\%$ (es decir, la sensibilidad de la prueba) fue del 38.5% (25/65) en individuos normoglucémicos, del 18.2% (8/36) en pacientes con prediabetes, y del 18.2% (4/18) en pacientes con diabetes ($P = 0.036$). Asimismo, entre los participantes con consumo excesivo de alcohol, la proporción de individuos con %CDT $\geq 1.6\%$ fue del 50.0% (9/18) en participantes con peso normal, del 37.3% (19/51) en participantes con sobrepeso, y del 14.5% (9/62) en participantes con obesidad ($P = 0.002$).

Tabla 1. Niveles de transferrina deficiente en carbohidratos (CDT) en relación con factores demográficos, de estilo de vida y metabólicos

Factor	CDT (%)			CDT (mg/dL)		
	N	Mediana (RIQ)	P-valor	N	Mediana (RIQ)	P-valor
Sexo						
Mujer (ref.)	838	0.6 (0.5-0.8)	-	837	1.7 (1.3-2.2)	-
Hombre	678	0.8 (0.6-1.0)	<0.001	678	2.0 (1.4-2.7)	<0.001
Edad (años)						
18-35 (ref.)	296	0.7 (0.5-0.8)	-	296	1.8 (1.3-2.3)	-
>35-50	413	0.7 (0.5-0.9)	0.179	412	1.8 (1.3-2.5)	0.661
>50-65	391	0.7 (0.6-0.9)	0.010	391	1.8 (1.4-2.5)	0.280
>65	416	0.7 (0.5-0.9)	0.415	416	1.7 (1.3-2.3)	0.399
Consumo de alcohol (g/semana)						
0-9 (ref.)	546	0.6 (0.5-0.7)	-	546	1.6 (1.2-2.1)	-
10-139	598	0.7 (0.5-0.8)	<0.001	597	1.8 (1.3-2.3)	<0.001
140-279	241	0.8 (0.6-1.1)	<0.001	241	2.1 (1.6-2.8)	<0.001
≥280	131	1.0 (0.8-1.8)	<0.001	131	2.8 (2.0-4.7)	<0.001
AUDIT (puntos en el test)						
0-7 (ref.)	1390	0.7 (0.5-0.8)	-	1389	1.8 (1.3-2.3)	-
≥8	126	0.9 (0.6-1.5)	<0.001	126	2.5 (1.6-3.6)	<0.001
Fumador (actual)						
No (ref.)	1220	0.7 (0.5-0.8)	-	1219	1.7 (1.3-2.3)	-
Sí	296	0.8 (0.6-1.0)	<0.001	296	2.0 (1.5-2.9)	<0.001
Actividad física						
Baja (ref.)	596	0.7 (0.5-0.9)	-	595	1.8 (1.4-2.4)	-
Moderada	552	0.7 (0.5-0.9)	0.324	552	1.8 (1.3-2.4)	0.288
Alta	368	0.7 (0.5-0.9)	0.760	368	1.8 (1.4-2.4)	0.726
Índice de masa corporal (kg/m²)						
≤25 (ref.)	424	0.6 (0.5-0.8)	-	424	1.7 (1.3-2.2)	-
>25-30	574	0.7 (0.5-0.9)	0.019	573	1.7 (1.3-2.4)	0.160
>30	518	0.7 (0.6-0.9)	<0.001	518	1.9 (1.5-2.5)	<0.001
Obesidad abdominal^a						
No	856	0.7 (0.5-0.9)	-	855	1.8 (1.3-2.4)	-
Sí	659	0.7 (0.6-0.9)	0.171	659	1.8 (1.4-2.4)	0.280
Presión arterial alta^a						
No (ref.)	746	0.7 (0.5-0.8)	-	745	1.7 (1.3-2.3)	-
Sí	770	0.7 (0.6-0.9)	<0.001	770	1.9 (1.4-2.6)	<0.001
HDL-colesterol bajo^a						
No (ref.)	1249	0.7 (0.5-0.9)	-	1248	1.8 (1.3-2.5)	-

Sí	266	0.7 (0.6-0.8)	0.769	266	1.8 (1.4-2.2)	0.757
Hipertrigliceridemia^a						
No (ref.)	1232	0.7 (0.5-0.8)	-	1231	1.8 (1.3-2.3)	-
Sí	277	0.7 (0.6-0.9)	0.001	277	1.9 (1.6-2.6)	<0.001
Síndrome metabólico						
No (ref.)	1202	0.7 (0.5-0.9)	-	1201	1.8 (1.4-2.4)	-
Sí	314	0.7 (0.6-0.9)	<0.001	314	2.0 (1.6-2.5)	<0.001
Resistencia a la insulina						
No (HOMA-IR <3, ref.)	983	0.7 (0.5-0.8)	-	982	1.7 (1.3-2.3)	-
Sí (HOMA-IR ≥3)	533	0.7 (0.6-0.9)	<0.001	533	2.0 (1.6-2.5)	<0.001
Estado glicémico						
Normoglucemia (ref.)	944	0.7 (0.5-0.8)	-	943	1.7 (1.3-2.3)	-
Prediabetes	389	0.7 (0.6-0.9)	0.004	389	1.9 (1.4-2.4)	0.024
Diabetes	183	0.7 (0.6-0.9)	0.002	183	2.0 (1.6-2.7)	<0.001

^aSegún los criterios ATP-III [Adult Treatment Panel-III, 2001]. RIQ, rango intercuartil. AUDIT, Alcohol Use Disorders Identification Test. HDL, high-density lipoprotein. HOMA, Homeostatic Model Assessment for insulin resistance. Ref., categoría de referencia.

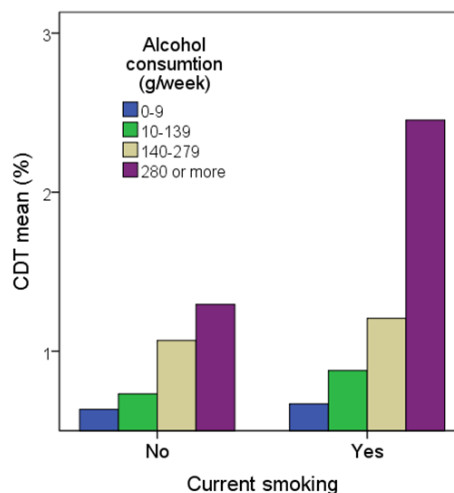
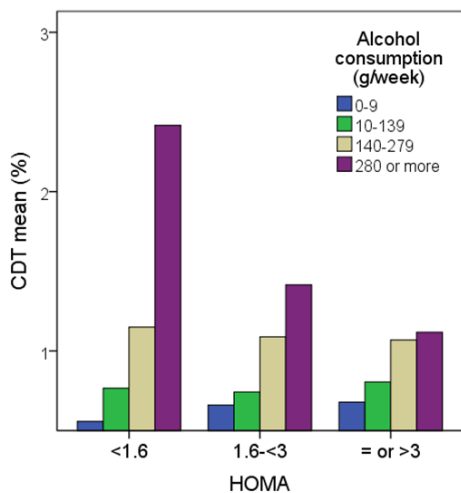
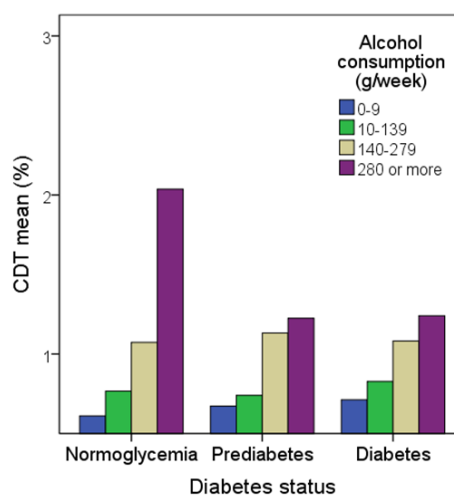
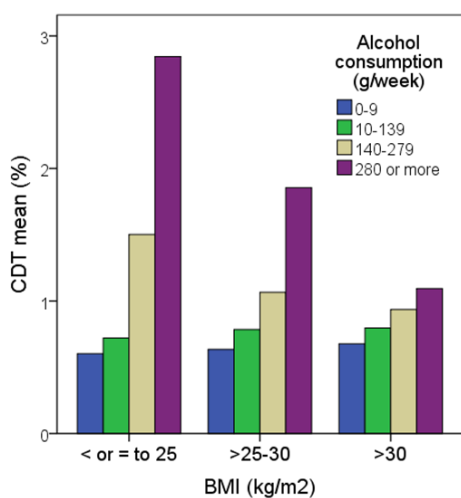


Figura 6 (página anterior). Media de la CDT (*carbohydrate-deficient transferrin*) en la población estratificada por el consumo de alcohol, variables metabólicas y tabaquismo. Los niveles de CDT aumentan con el consumo de alcohol en todas las categorías, pero los niveles de CDT en bebedores excesivos (280 g/semana o más) son menores conforme aumenta el IMC (*body mass index* [BMI]; $P<0.001$), conforme aumenta la resistencia a la insulina (HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*, dividida en terciles); $P<0.001$) y conforme empeora el estado glucémico (normogluemia > prediabetes > diabetes) ($P=0.017$). Por contra. Los niveles de CDT dentro de los bebedores excesivos son mayores en fumadores que en no fumadores ($P=0.001$).

Tabla 2. Análisis multivariado de los factores asociados con la CDT (<i>carbohydrate-deficient transferrin</i>, en %). Se utilizó un modelo aditivo generalizado <i>for location, scale and shape</i> (GAMLSS) con distribución beta. El modelo incluye interacciones de primer orden con el consumo de alcohol			
Factor	OR	IC 95%	P-valor
Sexo			
Mujer (ref.)	1	--	--
Hombre	1.01	(0.91-1.13)	0.770
Edad (años)	1.002	(1.000-1.004)	0.036
Consumo de alcohol (g/semana)			
0-9 (ref.)	1	--	--
10-139	1.08	(0.96-1.22)	0.204
140-279	1.41	(1.17-1.70)	<0.001
≥280	1.89	(1.37-2.63)	<0.001
Fumador actual			
No (ref.)	1	--	--
Sí	1.11	(0.98-1.28)	0.100
Presión arterial alta			
No (ref.)	1	--	--
Yes	0.98	(0.88-1.09)	0.750
Índice de masa corporal (kg/m²)			
≤25 (ref.)	1	--	--
>25-30	0.98	(0.88-1.10)	0.837
>30	1.06	(0.95-1.20)	0.274
Estado glucémico			
Normogluemia (ref.)	1	--	--
Prediabetes	1.05	(0.94-1.17)	0.363
Diabetes	1.12	(0.97-1.29)	0.121
Interacción entre sexo y consumo de alcohol			
Hombre y 10-139 g/semana	1.14	(1.00-1.31)	0.045
Hombre y 140-279 g/semana	1.21	(1.03-1.43)	0.020
Hombre y ≥280 g/semana	1.28	(0.93-1.78)	0.125
Interacción entre tabaquismo y consumo de alcohol			
Fumador y 10-139 g/semana	0.98	(0.84-1.16)	0.877
Fumador y 140-279 g/semana	1.03	(0.85-1.26)	0.724
Fumador y ≥280 g/semana	1.36	(1.12-1.66)	0.002
Interacción entre hipertensión y consumo de alcohol			
Hipertensión y 10-139 g/semana	1.02	(0.88-1.18)	0.787
Hipertensión y 140-279 g/semana	1.17	(0.99-1.39)	0.061
Hipertensión y ≥280 g/semana	1.21	(1.00-1.48)	0.047

Interacción entre IMC y consumo de alcohol			
>25-30 kg/m ² y 10-139 g/semana	1.04	(0.90-1.21)	0.581
>25-30 kg/m ² y 140-279 g/semana	0.81	(0.67-0.98)	0.030
>25-30 kg/m ² y ≥280 g/semana	0.90	(0.73-1.13)	0.386
>30 kg/m ² y 10-139 g/semana	1.00	(0.86-1.18)	0.950
>30 kg/m ² y 140-279 g/semana	0.69	(0.56-0.85)	<0.001
>30 kg/m ² y ≥280 g/semana	0.58	(0.46-0.75)	<0.001
Interacción entre diabetes y consume de alcohol			
Prediabetes y 10-139 g/semana	0.90	(0.78-1.05)	0.200
Prediabetes y 140-279 g/semana	1.06	(0.90-1.26)	0.450
Prediabetes y ≥280 g/semana	0.69	(0.57-0.85)	<0.001
Diabetes y 10-139 g/semana	0.85	(0.70-1.06)	0.149
Diabetes y 140-279 g/semana	0.81	(0.65-1.02)	0.079
Diabetes y ≥280 g/semana	0.71	(0.55-0.92)	0.009

Se utilizó un modelo de regresión beta porque la variable dependiente era continua, pero constreñida en el intervalo (0,1). Para facilitar la interpretación, los coeficientes beta se transformaron en *odds ratios* (OR, con sus intervalos de confianza al 95%) tras exponenciarlos. La interpretación de los coeficientes (OR) es similar a una regresión logística. Si es menor de 1, indica que hay una reducción en la proporción de CDT. Si es mayor de 1, indica un aumento en la proporción. IMC, índice de masa corporal. Ref., categoría de referencia. El modelo incluyó 1515 individuos.

El análisis multivariado de los factores asociados con los niveles de %CDT se representa en la Tabla 2. El modelo incluye interacciones de primer orden con el consumo de alcohol. El sexo masculino y el consumo de alcohol mantuvieron una asociación independiente con los valores de %CDT. Por el contrario, el IMC, el tabaquismo y la diabetes por sí mismos no se asociaron significativamente con los valores de %CDT tras ajustar por factores de confusión. Cabe destacar que el sexo masculino, el tabaquismo y la hipertensión mostraron una interacción positiva y significativa con el consumo de alcohol (particularmente con el consumo excesivo, ≥280 g/semana) en relación con los valores de %CDT. Por el contrario, la obesidad, la diabetes y la prediabetes mostraron una interacción negativa significativa con el consumo de alcohol en relación con los valores de %CDT, después de ajustar por factores de confusión (Tabla 2). Se obtuvieron resultados similares cuando la CDT se introdujo en los modelos multivariantes en mg/dL, en lugar de %CDT (datos no mostrados).

4.4. Valor predictivo de las isoformas de transferrina para la incidencia de diabetes mellitus

La cuantificación relativa de las cinco isoformas de transferrina (asialotransferrina, disialotransferrina, trisialotransferrina, tetrasialotransferrina y pentasialotransferrina) estuvo disponible en 1300 individuos sin diabetes. Dos pacientes fueron excluidos porque durante el seguimiento desarrollaron diabetes mellitus simultáneamente con un cáncer de páncreas. De los restantes 1298 individuos, 68 desarrollaron diabetes tipo 2, lo que se traduce en una incidencia del 5.2% (IC 95%: 4.1–6.6) tras un seguimiento medio de 7.4 años. Como se muestra en la Tabla 3, la concentración basal de %CDT no mostró una asociación significativa con la incidencia de diabetes, ni en el análisis univariado ni tras ajustar por otras variables clínicas. El balance entre pentasialotransferrina y trisialotransferrina mostró una tendencia a la asociación

con la incidencia de diabetes en el análisis univariado. Sin embargo, esta asociación se atenuó sensiblemente después de ajustar por el efecto de covariables adicionales. En el mismo modelo, el IMC y la prediabetes mostraron una asociación significativa con la incidencia de diabetes mellitus (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis multivariado de los factores asociados con la incidencia de diabetes mellitus (regresión de Cox). La sialilación de la transferrina se introdujo como la abundancia (en porcentaje) relativa de las diferentes isoformas y la abundancia (en porcentaje) de la CDT (<i>carbohydrate-deficient transferrin</i>)				
	HR (95% CI)	HR (95% CI)	HR (95% CI)	HR (95% CI)
Edad (años)	--	0.99 (0.97, 1.01) P=0.213	--	0.99 (0.97, 1.01) P=0.236
Sexo				
Mujer (ref.)	--	1	--	1
Hombre		1.11 (0.63, 1.95) P=0.712		1.02 (0.58, 1.80) P=0.932
Índice de masa corporal (kg/m²)				
≤25 (ref.)	--	1	--	1
25 – <30	--	1.56 (0.50, 4.84) P=0.445	--	1.53 (0.49, 4.74) P=0.465
≥30	--	4.16 (1.44, 12.06) P=0.009	--	3.97 (1.38, 11.47) P=0.011
Consumo de alcohol (g/semana)				
0-9 (ref.)		1	--	1
10-139	--	0.83 (0.46, 1.53) P=0.555	--	0.87 (0.47, 1.61) P=0.659
140-279	--	0.85 (0.42, 1.73) P=0.664	--	0.80 (0.39, 1.62) P=0.528
≥280	--	0.75 (0.28, 2.02) P=0.573	--	0.73 (0.27, 1.98) P=0.530
Fumador actual				
No (ref.)	--	1	--	1
Sí		0.86 (0.35, 2.12) P=0.746		0.79 (0.32, 1.91) P=0.598
Prediabetes				
No (ref.)	--	1	--	1
Sí	--	16.5 (7.1, 38.3) P<0.001	--	16.1 (6.9-37.4) P<0.001
CDT (%)	0.77 (0.46, 1.31) P=0.334	0.55 (0.23-1.28) P=0.165	--	--
Balance de isoformas de transferrina^a	--	--	1.76(0.94, 3.28) P=0.076	1.44 (0.72-2.87) P=0.303
Índice-C (IC 95%)	0.45 (0.38, 0.52)	0.86 (0.81, 0.90)	0.58 (0.51-0.64)	0.86 (0.82-0.90)

HR, *hazard ratio*. IC, interval de confianza. CDT, *carbohydrate-deficient transferrin*. Índice-C, índice de concordancia. ^aEl balance de isoformas de transferrina con el poder predictivo más alto fue [log(transferrina pentasialilada) - log(transferrina trisialilada)] (los datos para este análisis específico estuvieron disponibles en 1298 individuos).

5. Discusión

En este estudio basado en una población general, observamos que los trastornos metabólicos comunes (obesidad y diabetes) modifican el efecto del consumo de alcohol sobre los niveles séricos de CDT. En nuestra experiencia, estos trastornos metabólicos por sí mismos tienen poca influencia sobre los niveles de CDT, pero su interacción con el consumo de alcohol es significativa y puede afectar el rendimiento diagnóstico de la CDT como marcador de abuso de alcohol.

Estudios previos en un registro de gemelos mostraron que el IMC tiene efectos significativos sobre la curva dosis-respuesta entre el alcohol y la CDT [Whitfield et al., 1998, 2008]. Los autores especularon que la resistencia a la insulina podría tener un papel, pero no la midieron en sus estudios [Whitfield et al., 1998, 2008]. En nuestro conocimiento, éste es el primer estudio en una población adulta general que investiga la interacción entre el consumo de alcohol y el IMC, así como la presencia de diabetes o prediabetes, y la resistencia a la insulina, estimada mediante el HOMA-IR, en relación con los valores de CDT. De acuerdo con nuestros resultados, parece plausible que un estado de resistencia a la insulina modifique el efecto del consumo de alcohol sobre la sialilación de la transferrina. Los mecanismos de esto no se conocen completamente. Se ha encontrado que el gen ST6GAL1, que codifica la beta-galactosidasa alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (principal responsable de la transferencia de residuos de ácido siálico a residuos terminales de galactosa), es regulado negativamente por el aumento del consumo de alcohol e inhibido por el acetaldehído, el principal subproducto del metabolismo del etanol; se propone que esto incrementa las formas de transferrina con baja sialilación (CDT) [Gosh et al., 1995; Gong et al., 2008]. Además, la modulación de los ácidos siálicos es uno de los hallazgos patológicos importantes en la diabetes mellitus, como se ha revisado recientemente [Ibrahim et al., 2024]. En modelos animales, los residuos de ácido siálico en la superficie celular tienen un papel en la acción hepática de la insulina, y respaldan la hipótesis de que la disminución de dichos residuos contribuye a la resistencia a la insulina en la diabetes mellitus [Salhanick & Amatruda, 1988]. Las alteraciones en la glicosilación son una característica distintiva de la diabetes mellitus [Ibrahim et al., 2024]. El proceso enzimático activo de la glicosilación (incluida la sialilación) es distinto de la glicosilación pasiva y no enzimática, que también es una característica bien conocida de la diabetes, como lo revelan los niveles de HbA1c. Los ácidos siálicos están predominantemente elevados en casi todas las formas de condiciones diabéticas [Ibrahim et al., 2024]. Las explicaciones mecánicas plausibles para este aumento incluyen la desialilación por sialidasas, la estimulación de la vía de la hexosamina, la síntesis de proteínas de fase aguda, así como el estrés oxidativo [Ibrahim et al., 2024]. Los ácidos siálicos están profundamente asociados con el transporte de glucosa y la resistencia a la insulina en estudios en humanos [Ibrahim et al., 2024]. En ratones, la pérdida de síntesis de ácido siálico en el hígado causa resistencia a la insulina [Peng et al., 2023]. Además, los niveles de ácido siálico están elevados en sujetos con obesidad y se asocian con resistencia a la insulina [Rajappa et al., 2013].

De forma interesante, también existe una interacción entre el consumo de alcohol y el IMC en relación con el desarrollo de la diabetes tipo 2. Un metaanálisis de 26 estudios reportó una asociación en forma de U entre el consumo de alcohol y la diabetes tipo 2, con el menor riesgo observado entre los bebedores ligeros y moderados [Li et al., 2016]. De hecho, el consumo bajo o moderado de alcohol podría disminuir la resistencia a la insulina, mientras que el abuso de alcohol podría aumentarla [Lazarus et al., 1997]. Sin embargo, en otro metaanálisis de 55 estudios, el riesgo reducido observado parece ser específico para las mujeres en general y para aquellas con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ [Llamosas-Falcón et al., 2023]. Asimismo, en Japón, el consumo bajo o moderado de alcohol podría reducir el riesgo de diabetes tipo 2 en personas con exceso de peso corporal, mientras que el consumo elevado de alcohol podría aumentarlo en quienes tienen un IMC más bajo [Wang et al., 2025]. Estos hallazgos indican que la asociación entre el consumo de alcohol y el riesgo de diabetes tipo 2 varía según el IMC de los subgrupos poblacionales [Wang et al., 2025].

En un intento por desentrañar la posible interacción entre los cambios en la sialilación asociados con el consumo de alcohol, el IMC y el desarrollo de diabetes, estudiamos la incidencia de diabetes tipo 2 en esta población tras una mediana de seguimiento de 7 años. Los factores principalmente asociados con el desarrollo de diabetes tipo 2 fueron, como era de esperar, la obesidad y el estado de prediabetes. El consumo de alcohol y los niveles de CDT no se asociaron significativamente con el desarrollo de diabetes tipo 2. También estudiamos la posible asociación de todas las isoformas de transferrina con el desarrollo de diabetes tipo 2, un aspecto que ha sido poco investigado hasta ahora. En nuestra experiencia, el balance entre transferrina pentasialilada y trisialilada ($\log[\text{transferrina pentasialilada}] - \log[\text{transferrina trisialilada}]$) tendió a asociarse con el desarrollo de diabetes tipo 2, pero esta asociación se atenuó tras ajustar por factores de confusión.

Las principales fortalezas del estudio son su diseño aleatorizado basado en una población general, con un amplio rango de edad y la disponibilidad de seguimiento longitudinal. Además, el estudio incluyó una fenotipación extensa de variables de estilo de vida y metabólicas. Un punto fuerte adicional es la consistencia con estudios previos en otra población del mismo entorno geográfico, en los que se observaron resultados similares sobre la interacción entre consumo de alcohol e IMC en relación con los niveles de CDT (observación no publicada, Figura 7). La principal debilidad es que el estudio no aporta datos mecanísticos que expliquen la interacción entre consumo de alcohol, IMC y diabetes en relación con los niveles de CDT.

En resumen, los resultados del estudio tienen implicaciones clínicas prácticas. Los valores de CDT para la detección de abuso de alcohol deben interpretarse teniendo en cuenta el IMC del paciente. Se necesitarán estudios adicionales para esclarecer las interacciones entre consumo de alcohol, glicosilación, resistencia a la insulina, obesidad, diabetes y los mecanismos de su influencia sobre los niveles de CDT.

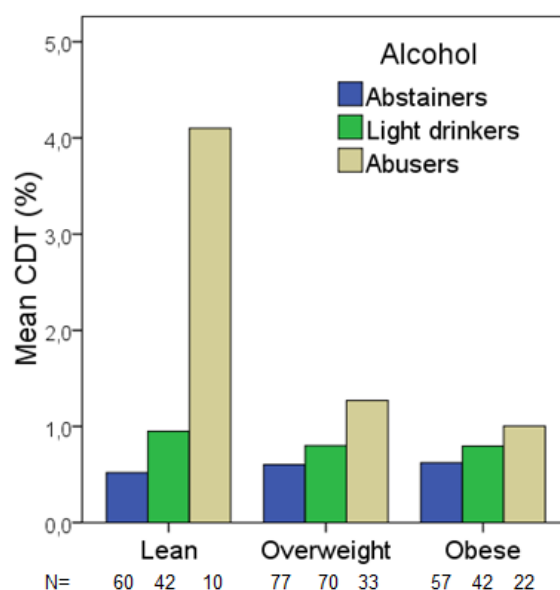


Figura 7. Abundancia media de CDT (en porcentaje) en una población de estudio de validación (n=413), estratificada por el consumo de alcohol y el índice de masa corporal. Los participantes adultos fueron diferentes de los del presente estudio, aunque eran de la misma área sanitaria, como se describió previamente [González-Quintela *et al.*, 2003]. Para este estudio de validación y como análisis de sensibilidad, los bebedores excesivos se definieron como las mujeres que habitualmente consumían más de 140 g de alcohol por semana (equivalentes a más de 20 g de alcohol por día) y los hombres que habitualmente consumían más de 210 g de alcohol por semana (equivalente a más de 30 g de alcohol por día). Los bebedores ligeros se definieron como los que bebían habitualmente alcohol, pero menos de esas cantidades. Los abstemios y los bebedores ocasionales se incluyeron en el mismo grupo. De acuerdo con el índice de masa corporal (IMC), los participantes se dividieron en normopeso (lean, <25 kg/m²), con sobrepeso (25-30 kg/m²), o con obesidad (>30 kg/m²). El método utilizado para la determinación de CDT fue el mismo que en el estudio principal de este trabajo. Se observa cómo el IMC modifica el efecto del alcohol en los niveles de CDT, siendo el efecto del abuso de alcohol mayor en sujetos con normopeso que en los sujetos con sobrepeso u obesidad.

6. Conclusiones

1. Algunas alteraciones metabólicas frecuentes como la obesidad y la diabetes, en las cuales subyace la resistencia a la insulina, interaccionan (es decir, modifican el efecto) del consumo de alcohol en los niveles de CDT sérica. La sensibilidad de la CDT para la detección de consumo perjudicial de alcohol es menor en pacientes con obesidad o con diabetes mellitus.
2. No se ha demostrado un valor predictivo significativo e independiente de la CDT sérica o de la abundancia de otras isoformas de sialilación de la transferrina sérica para el desarrollo de diabetes mellitus en la población general adulta tras una media de 7 años de seguimiento.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Financiación: Este estudio ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) a través del proyecto PI20/01069 y cofinanciado por la Unión Europea; y por la Red de Investigación en Cronicidad, Atención Primaria y Promoción de la Salud del ISCIII (RD21/0016/0022), cofinanciado por la Unión Europea–NextGenerationEU.

7. Referencias

- Adult Treatment Panel-III. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *JAMA* 2001;285:2486–2497.
- Alende-Castro V, Alonso-Sampedro M, Vazquez-Temprano N, Tuñez C, Rey D, García-Iglesias C, Sopeña B, Gude F, Gonzalez-Quintela A. Factors influencing erythrocyte sedimentation rate in adults: New evidence for an old test. *Medicine (Baltimore)* 2019;98:e16816.
- Alte D, Luedemann J, Rose HJ, John U. Laboratory markers carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase, and mean corpuscular volume are not useful as screening tools for high-risk drinking in the general population: results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:931-940.
- American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Diagnosis and classification of diabetes: Standards of care in diabetes-2024. *Diabetes Care* 2024;47:S20-S42.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473:4-8.
- Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem* 2001;47:13-27.
- Babovic-Vuksanovic D, O'Brien JF. Laboratory diagnosis of congenital disorders of glycosylation type I by analysis of transferrin glycoforms. *Mol Diagn Ther* 2007;11:303-311.
- Bergstrom JP, Helander A. Clinical characteristics of carbohydrate-deficient transferrin (%disialotransferrin) measured by HPLC: sensitivity, specificity, gender effects and relationship with other alcohol biomarkers. *Alcohol* 2008;43:436-441.
- Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005. *J Chromatogr B* 2006;841:96-109.
- Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Tagliaro F. Fully automated analysis of Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT) by using a multicapillary electrophoresis system. *Clin Chim Acta* 2007;380:4-7.
- Calle M, Susin T, Pujolassos M (2024). coda4microbiome: Compositional Data Analysis for Microbiome Studies. R package version 0.2.4, Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=coda4microbiome>.
- Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GS, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J* 2016;33:309-343.
- Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35:1381–1395.
- Cummings RD, Pierce JM The challenge and promise of glycomics. *Chem Biol* 2014;21:1–15.
- Cymer F, Beck H, Rohde A, Reusch D. Therapeutic monoclonal antibody N-glycosylation - Structure, function and therapeutic potential. *Biologicals* 2018;52:1-11.
- Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-2497.

Fagan KJ, Irvine KM, McWhinney BC, Fletcher LM, Horsfall LU, Johnson LA, Clouston AD, Jonsson JR, O'Rourke P, Martin J, Pretorius CJ, Ungerer JP, Powell EE. BMI but not stage or etiology of nonalcoholic liver disease affects the diagnostic utility of carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37:1771-1778.

Fagan KJ, Irvine KM, McWhinney BC, Fletcher LM, Horsfall LU, Johnson L, O'Rourke P, Martin J, Scott I, Pretorius CJ, Ungerer JP, Powell EE. Diagnostic sensitivity of carbohydrate deficient transferrin in heavy drinkers. *BMC Gastroenterol* 2014;14:97.

Fagerberg B, Agewall S, Urbanavicius V, Attvall S, Lundberg PA, Lindstedt G. Carbohydrate-deficient transferrin is associated with insulin sensitivity in hypertensive men. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:712-715.

Fleming MF, Anton RF, Spies CD. A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1347-1355.

Gayoso-Diz P, Otero-González A, Rodríguez-Alvarez MX, Gude F, García F, De Francisco A, Quintela AG. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocr Disord* 2013;13:47.

Ghosh P, Liu QH, Lakshman MR. Long-term ethanol exposure impairs glycosylation of both N- and O-glycosylated proteins in rat liver. *Metabolism* 1995;44:890-898.

Gong M, Castillo L, Redman RS, Garige M, Hirsch K, Azuine M, Amdur RL, Seth D, Haber PS, Lakshman MR. Down-regulation of liver Galbeta1, 4GlcNAc alpha2, 6-sialyltransferase gene by ethanol significantly correlates with alcoholic steatosis in humans. *Metabolism* 2008;57:1663-1668.

González-Quintela A, Gude F, Boquete O, Rey J, Meijide LM, Suarez F, Fernández-Merino MC, Pérez LF, Vidal C. Association of alcohol consumption with total serum immunoglobulin E levels and allergic sensitization in an adult population-based survey. *Clin Exp Allergy* 2003;33:199-205.

Gual A, Martos AR, Lligona A, Llopis JJ. Does the concept of a standard drink apply to viticultural societies? *Alcohol* 1999; 34:153-160.

Han M. The dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of type 2 diabetes among Asian men: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *J Diab Res* 2020;2020:1-8.

Helander A, Eriksson G, Stibler H, Jeppsson JO. Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clin Chem* 2001;47:1225-1233.

Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, Hoshino T, John WG, Kobold U, Little R, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Susanto F, Takei I, Thienpont L, Umemoto M, Wiedmeyer HM; IFCC Working Group on HbA1c Standardization. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem* 2004;50:166-174.

Ibrahim MA, Isah MB, Inim MD, Abdullahi AD, Adamu A. The connections of sialic acids and diabetes mellitus: therapeutic or diagnostic value? *Glycobiology* 2024;34:cwae053.

Kikuchi N, Narimatsu H. Bioinformatics for comprehensive finding and analysis of glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:578–583.

Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep* 2011;1:90.

Lado-Baleato Ó, Torre J, O'Flaherty R, Alonso-Sampedro M, Carballo I, Fernández-Merino C, Vidal C, Gude F, Saldoval R, González-Quintela A. Age-related changes in serum N-glycome in men and women-Clusters associated with comorbidity. *Biomolecules* 2023;14:17.

Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta* 2016;1860:1574-1582.

Lazarus R, Sparrow D, Weiss ST. Alcohol intake and insulin levels. The Normative Aging Study. *Am J Epidemiol* 1997;145:909-916.

Li XH, Yu F fei, Zhou YH, He J. Association between alcohol consumption and the risk of incident type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2016;103:818-829.

Lipiński P, Tylki-Szymańska A. Congenital disorders of glycosylation: What clinicians need to know? *Front Pediatr* 2021;9:715151.

Llamosas-Falcón L, Rehm J, Bright S, Buckley C, Carr T, Kilian C, Lasserre AM, Lemp JM, Zhu Y, Probst C. The Relationship Between Alcohol Consumption, BMI, and Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis. *Diabetes Care* 2023;46:2076-2083.

MIT's Magazine of Innovation (2003). Technology Review. Disponible en <http://www2.technologyreview.com/featured-story/401775/10-emerging-technologies-that-will-change-the/>

Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:448-462.

Morinaga M, Kon K, Uchiyama A, Fukada H, Fukuhara K, Yaginuma R, Nakadera E, Yamashina S, Ikejima K. Carbohydrate-deficient transferrin is a sensitive marker of alcohol consumption in fatty liver disease. *Hepatol Int* 2022;16:348-358.

Narimatsu H. Human glycogene cloning: focus on β 3-glycosyltransferase and β 4-glycosyltransferase families. *Curr Opin Struct Biol* 2006; 16:567–575.

Niemelä O. Biomarkers in alcoholism. *Clin Chim Acta* 2007;377:39-49.

O'Flaherty R, Simon Á, Alonso-Sampedro M, Sánchez-Batán S, Fernández-Merino C, Gude F, Saldoval R, González-Quintela A. Changes in serum N-glycome for risk drinkers: A comparison with standard markers for alcohol abuse in men and women. *Biomolecules* 2022;12:241.

Peng J, Yu L, Huang L, Paschoal VA, Chu H, de Souza CO, Varre JV, Oh DY, Kohler JJ, Xiao X, Xu L, Holland WL, Shaul PW, Mineo C. Hepatic sialic acid synthesis modulates glucose homeostasis in both liver and skeletal muscle. *Mol Metab* 2023;78:101812.

Pujolassos M, Susín A, Calle ML (2024). Microbiome compositional data analysis for survival studies. *NAR genomics and bioinformatics*, 2024;6: lqae038.

R Core Team (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing_ R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <https://www.R-project.org/>.

Rajappa M, Ikkurthi S, Nandeesh H, Satheesh S, Sundar I, Ananthanarayanan PH, Harichandrakumar KT. Relationship of raised serum total and protein bound sialic acid levels with hyperinsulinemia and indices of insulin sensitivity and insulin resistance in non-diabetic normotensive obese subjects. *Diabetes Metab Syndr* 2013;7:17-19.

Raynor A, Haouari W, Lebredonchel E, Foulquier F, Fenaille F, Bruneel A. Biochemical diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Adv Clin Chem* 2024;120:1-43.

Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019;15:346-366.

Rigby RA, Stasinopoulos DM. Generalized additive models for location, scale and shape. *Appl Statist* 2005; 54:507-554.

Rubio Valladolid G, Bermejo Vicedo J, Caballero Sánchez-Serrano MC, Santo-Domingo Carrasco J. Validation of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) in primary care. *Rev Clin Esp* 1998; 198: 11–14.

Rudman N, Gornik O, Lauc G. Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS Lett* 2019;593:1598-1615.

Saldova R, Asadi Shehni A, Haakensen VD, Steinfeld I, Hilliard M, Kifer I, Helland A, Yakhini Z, Børresen-Dale AL, Rudd PM. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res* 2014;13:2314-2327.

Salhanick AI, Amatruda JM. Role of sialic acid in insulin action and the insulin resistance of diabetes mellitus. *Am J Physiol* 1988;255:E173-E179.

Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* 2009;19:507-514.

Shade KT, Platzer B, Washburn N, Mani V, Bartsch YC, Conroy M, Pagan JD, Bosques C, Mempel TR, Fiebiger E, Anthony RM. A single glycan on IgE is indispensable for initiation of anaphylaxis. *J Exp Med* 2015;212:457-467.

Sillanauke P, Massot N, Jousilahti P, Vartiainen E, Sundvall J, Olsson U, Poikolainen K, Pönniö M, Allen JP, Alho H. Dose response of laboratory markers to alcohol consumption in a general population. *Am J Epidemiol* 2000;152:747-751.

Spik G, Debruyne V, Montreuil J, van Halbeek H, Vliegthart JF. Primary structure of two sialylated triantennary glycans from human serotransferrin. *FEBS Lett* 1985;183:65-69.

Stasinopoulos MD, Rigby RA, Heller GZ, Voudouris V, De Bastiani, F. Flexible regression and smoothing: using GAMLSS in R (2017). CRC Press, Taylor & Francis Group.

Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991;37:2029-2037.

Stibler H, Borg S. Glycoprotein glycosyltransferase activities in serum in alcohol-abusing patients and healthy controls. *Scand J Clin Lab Invest* 1991;51:43-51.

Therneau T (2024). A Package for Survival Analysis in R. R package version 3.6-4, Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.

Trbojević-Akmačić I, Vučković F, Pribić T, Vilaj M, Černigoj U, Vidič J, Šimunović J, Kepek A, Kolčić I, Klarić L, Novokmet M, Pučić-Baković M, Rapp E, Štrancar A, Polašek O, Wilson JF, Lauc G. Comparative analysis of transferrin and IgG N-glycosylation in two human populations. *Commun Biol* 2023;6:312.

Varki A, Cummins RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of glycobiology*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2008.

Wang Y, Inoue Y, Yamamoto S, Fukunaga A, Yamamoto S, Honda T, Nakagawa T, Hayashi T, Konishi M, Mizoue T. Association between alcohol consumption and the risk of type 2 diabetes mellitus across different body mass index categories among Japanese workers. *J Epidemiol* 2025. En prensa.

Whitfield JB, Dy V, Madden PAF, Heath AC, Martin NG, Montgomery GW. Measuring carbohydrate-deficient transferrin by direct immunoassay: factors affecting diagnostic sensitivity for excessive alcohol intake. *Clin Chem* 2008;54:1158-1165.

Whitfield JB, Fletcher LM, Murphy TL, Powell LW, Halliday J, Heath AC, Martin NG. Smoking, obesity, and hypertension alter the dose-response curve and test sensitivity of carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol intake. *Clin Chem* 1998;44:2480-2489.

Zhu W, Zhou Y, Guo L, Feng S. Biological function of sialic acid and sialylation in human health and disease. *Cell Death Discov* 2024;10:415.

Anexo I

PDF del artículo titulado "*Diabetes and obesity modify the effect of alcohol consumption on carbohydrate-deficient transferrin*" en la forma que fue enviado para valoración para publicación en la revista *Glycobiology*.



Diabetes and obesity modify the effect of alcohol consumption on carbohydrate-deficient transferrin

Journal:	<i>Glycobiology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Regular Manuscripts
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	González-Vidal, Tomás; University of Oviedo, Medicine Lado-Baleato, Óscar; Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Network for Research on Chronicity, Primary Care, and Health Promotion de la Osa, Fátima; University of Santiago de Compostela, Medicine Alonso-Sampedro, Manuela; Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Network for Research on Chronicity, Primary Care, and Health Promotion Fernández-Merino, Carmen; Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Network for Research on Chronicity, Primary Care, and Health Promotion Sánchez-Castro, Juan; Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Network for Research on Chronicity, Primary Care, and Health Promotion Gude, Francisco; Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Network for Research on Chronicity, Primary Care, and Health Promotion González-Quintela, Arturo; University of Santiago de Compostela, Medicine
Key Words:	carbohydrate-deficient transferrin, diabetes, obesity, alcohol, sialylation

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Title:

Diabetes and obesity modify the effect of alcohol consumption on carbohydrate-deficient transferrin

Short running head:

Effect of diabetes and obesity on CDT

Keywords: carbohydrate-deficient transferrin / diabetes / obesity / alcohol / sialylation

Authors:

Tomás González-Vidal¹, Óscar Lado-Baleato^{2,3}, Fátima de la Osa⁴, Manuela Alonso-Sampedro², Carmen Fernández-Merino^{2,4,5}, Juan Sánchez-Castro^{2,5}, Francisco Gude^{2,4,6}, and Arturo González-Quintela^{2,4,7}

Author affiliations:

1. Department of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain.
2. Research Methods Group (RESMET), Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Network for Research on Chronicity, Primary Care, and Health Promotion (RICAPPS-ISCI), Santiago de Compostela, Spain.
3. ISCI Support Platforms for Clinical Research, Health Research Institute of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.
4. Department of Medicine, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.
5. Department of Primary Care, A Estrada Primary Care Center, A Estrada, Spain.
6. Department of Primary Care, Concepción Arenal Primary Care Center, Santiago de Compostela, Spain.
7. Department of Internal Medicine, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

Supplementary files: Supplementary Figure 1 and Supplementary Figure 2.

Address for correspondence:

Dr. Arturo González-Quintela
Department of Medicine, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela,
15706 Spain
E-mail address: arturo.gonzalez.quintela@usc.es

Abstract

Background and aims: Serum levels of carbohydrate-deficient transferrin (CDT, the sum of its asialylated and disialylated glycoforms) are a commercial marker of alcohol abuse. Our aim was to investigate the potential influence of metabolic factors on serum CDT levels and the predictive value of transferrin glycoforms for the development of type 2 diabetes in a general adult population.

Methods: We measured serum CDT levels by capillary electrophoresis in 1516 individuals (median age 52 years; 55.3% women) randomly selected from the general adult population of a municipality.

Results: Insulin resistance and the associated body mass index and diabetes modified the effect of alcohol consumption on CDT levels; i.e., CDT in heavy drinkers was lower in individuals with obesity than in lean counterparts and was also lower in people with diabetes than in normoglycemic individuals. The relative abundance of transferrin glycoforms was not significantly associated with the development of type 2 diabetes after a mean follow-up of 7.4 of years.

Conclusions: There is an interaction between alcohol consumption and factors associated with insulin resistance in relation to transferrin sialylation. The diagnostic value of CDT for detecting heavy alcohol consumption might be limited in patients with obesity or diabetes.

Abbreviations:

AUDIT: Alcohol Use Disorders Identification Test

BMI: body mass index

CDT: carbohydrate-deficient transferrin

HbA1c: glycated hemoglobin

HDL: high-density lipoprotein

HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance

T2DM: type 2 diabetes mellitus

1. Introduction

Glycosylation is the most common co- and post-translational modification of proteins in mammals (Lauc et al. 2016; Reily et al. 2019; Lado-Baleato et al. 2023; Ibrahim et al. 2024). It plays an essential role in the folding, stability, solubility and effector function of proteins. Glycans attached to glycoproteins and glycolipids are therefore involved in virtually all biological processes and in the pathophysiology of every major human disease; glycosylation changes can therefore be used as markers for a wide range of diseases (Lauc et al. 2016; Reily et al. 2019; Lado-Baleato et al. 2023; Ibrahim et al. 2024). Sialic (*N*-acetylneuraminic) acids are negatively charged amino sugars commonly found as terminal residues in glycans, where they are involved in many molecular and cellular interactions (Schauer 2009; Ibrahim et al. 2024; Zhu et al. 2024). Transferrin is a glycoprotein produced in the liver that is normally present in human plasma with the function of transporting iron (Clerc et al. 2016). Transferrin has several isoforms resulting from differences in its glycosylation (Stibler 1991; Arndt 2001; Bortolotti et al. 2006; Clerc et al. 2016). Transferrin has two *N*-glycosylation sites at asparagine residues 432 and 630 (Spik et al. 1985; Clerc et al. 2016). Transferrin *N*-glycans are predominantly diantennary and triantennary sialylated complex-type glycans, with or without fucose, with afucosylated diantennary disialylated glycans being the most abundant (Spik et al. 1985; Clerc et al. 2016; Trbojević-Akmačić et al. 2024). Thus, under normal conditions, approximately 15% of transferrin circulates as pentasialotransferrin, 75% as tetrasialotransferrin, 5% as trisialotransferrin, less than 2% as disialotransferrin, and less than 1% circulate as monosialo- or asialotransferrin (Arndt, 2001). The term carbohydrate-deficient transferrin (CDT) refers collectively to the group of transferrin isoforms with a lower degree of glycosylation; specifically, a lack of sialic acid residues, i.e., the sum of disialo-, monosialo- (almost absent under normal conditions) and asialotransferrin (Stibler 1991; Arndt 2001; Bortolotti et al. 2006). The proportion and amount of CDT can be calculated by various methods (Arndt 2001; Fleming et al. 2004), including commercially available capillary electrophoresis (Bortolotti et al. 2007).

Given that alcohol consumption has been associated with protein glycosylation disorders (O'Flaherty et al. 2022), CDT increase has gained interest as a marker of alcohol abuse (Stibler 1991; Arndt 2001; Bortolotti et al. 2006; Niemelä 2007; Fagan et al. 2013, 2014; Morinaga et al. 2022). However, the mechanism for CDT increase in alcohol abusers is not fully understood. It could be due to an alteration in the activity of glycosyltransferases induced by acetaldehyde, the main metabolite of ethanol (Stibler and Borg 1991; Ghosh et al. 1995; Gong et al., 2008). CDT is typically considered abnormal when its percentage (%CDT) is greater than 2.5% or when its level increases by 25% (Fleming et al. 2004), although other authors consider a value equal to or greater than 1.6% to be specific for prolonged consumption of large amounts of alcohol (Bergstrom and Helander 2008). Elevated CDT is a reliable marker of alcohol abuse, although its specificity is generally better than its sensitivity (Stibler 1991; Alte et al. 2004; Niemela 2007, 2016). Congenital disorders of glycosylation can cause changes in CDT similar to those caused by alcohol consumption (Babovic-Vuksanovic and O'Brien 2007; Lipiński P and Tyłki-Szymańska 2021; Raynor et al. 2024).

Metabolic disorders (obesity, metabolic syndrome and associated insulin resistance) can affect CDT levels, although this has not been well studied. Bergström and Helander found small and mostly not statistically significant differences in CDT in 1387 individuals from various countries, with different ethnicities, ages, sexes, and body mass indexes (BMIs) (Bergström and Helander 2008). Sillanaukee et al. showed that BMI was negatively associated with CDT levels in a population-based sample of 8025 Finnish men and women (Sillanaukee et al. 2000). Alte et al. showed that BMI negatively influenced the performance of CDT in screening for excessive alcohol consumption in a population-based sample of 4310 German men and women (Alte et al. 2004). Similarly, Whitfield et al. found significant effects of BMI on the alcohol-CDT dose-response curve in a study of 2088 men and women from a community-based twin registry (Whitfield et al. 1998, 2008); i.e., BMI and lipid abnormalities showed interaction with alcohol intake in influencing CDT levels (Whitfield et al. 1998, 2008). Therefore, CDT might be a poor marker of excessive alcohol

consumption in people who live with overweight or obesity (Whitfield et al. 1998, 2008). Although the authors did not measure insulin concentrations, they speculated that insulin resistance, as indicated by a phenotype of high BMI, high triglycerides, and low high-density lipoprotein (HDL) cholesterol is associated with reduced CDT sensitivity to alcohol intake (Whitfield et al. 1998, 2008). In fact, Fagerberg et al. showed that people with insulin resistance (as determined by hyperinsulinemic euglycemic clamp studies) were less likely to have high CDT concentrations in a selected sample of 48 patients with hypertension, hypercholesterolemia, history of smoking, or diabetes mellitus (Fagerberg et al. 1994). In line with this, Fagan et al. reported that an elevated BMI reduced the diagnostic utility of CDT for high alcohol consumption in 246 patients with chronic liver disease (Fagan et al. 2013, 2014). However, Morinaga et al., reported that CDT was a useful marker of alcohol consumption for the accurate diagnosis of alcoholic versus non-alcoholic liver disease in 120 patients with fatty liver disease (Morinaga et al. 2022). To our knowledge, no population-based studies have investigated the association of CDT with insulin resistance, diabetes mellitus and other components of metabolic syndrome. The aim of this study was to investigate the possible association of CDT with these metabolic variables and to explore the predictive value of transferrin sialylation for the development of type 2 diabetes mellitus (T2DM).

2. Methods

2.1. Study design and setting

A detailed description of this cohort study (A-Estrada Glycation and Inflammation Study [AEGIS], NCT01796184; www.clinicaltrials.gov) has been published elsewhere (Alende et al. 2019). The study was conducted in the municipality of A-Estrada, in northwestern Spain. An age-stratified random sample of the population aged 18 years and older was drawn from the Spanish National Health System Registry, which covers more than 95% of the Spanish population. Between November 2012 and March 2015, participants were consecutively invited to the Primary Care

Center to complete an interviewer-administered, structured questionnaire that collected demographic data, anthropometric data, and lifestyle information, including physical activity, alcohol consumption, and smoking. They also provided a fasting venous blood sample. The study population consisted of 1516 participants (838 [55.3%] women; median age 52 [range 18-91 years]).

2.2. Main determinations

2.2.1. Lifestyle variables

Alcohol consumption. Alcohol consumption was measured in standard drinking units by summing the number of glasses of wine (approximately 10 g of alcohol), bottles of beer (approximately 10 g of alcohol), and units of spirits (approximately 20 g alcohol per unit) regularly consumed per week, as previously described (Gual et al. 1999; O'Flaherty et al. 2022). All participants also completed the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) questionnaire, which has been validated in Spain (Rubio Valladolid et al. 1998).

Smoking. Smoking was recorded as the number of cigarettes regularly consumed per day. Consumers of at least 1 cigarette per day were considered smokers. Individuals who had quit smoking during the preceding year were considered smokers.

Physical activity. All participants completed the International Physical Activity Questionnaire (short form). The metabolic equivalents of task were calculated as described by Craig et al. (Craig et al. 2003).

2.2.2. Metabolic determinations

Body mass index. BMI was calculated as weight (in kg) divided by the square of height (in meters). Participants were classified as having normal weight (≤ 25 kg/m²), overweight (>25-30 kg/m²), or obesity (>30 kg/m²).

Metabolic syndrome. Participants were considered to have metabolic syndrome if they had at least 3 of the Adult Treatment Panel III criteria (Adult Treatment Panel III 2001): (1) abdominal obesity (waist circumference >102 cm for men and >88 cm for women); (2) hypertriglyceridemia (fasting serum triglycerides ≥ 150 mg/dL); (3) low HDL-cholesterol levels (fasting HDL-cholesterol levels <40 mg/dL for men and <50 mg/dL for women); (4) elevated blood pressure (arterial blood pressure $\geq 130/\geq 85$ mm Hg or current use of antihypertensive medication); and (5) hyperglycemia (fasting serum glucose levels ≥ 110 mg/dL or current use of antidiabetic therapy).

Glycemic status. Individuals were considered to have diabetes mellitus if they had been previously diagnosed with diabetes or had a glycated hemoglobin (HbA1c) level $\geq 6.5\%$, and/or a fasting plasma glucose concentration ≥ 126 mg/dL. HbA1c was determined by high performance liquid chromatography using a Menarini Diagnostics HA-8160 analyzer; all HbA1c values were converted to Diabetes Control and Complications Trial-aligned values (Hoelzel et al. 2004). Individuals with prediabetes were defined as those with an HbA1c between 5.7% and 6.4% or a fasting plasma glucose between 100 and 125 mg/dL. The remainder were considered normoglycemic (American Diabetes Association 2024). To calculate the incidence of T2DM, individuals without diabetes were followed from the time of assessment for study recruitment (November 2012-March 2015) until the date of the last blood test available when the computerized medical records were consulted (July 2022-August 2022).

Insulin resistance. Insulin resistance was estimated using the Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR), which is fasting serum glucose (mg/dL) \times fasting serum insulin (μ U/mL) \div 405.23 (Gayoso-Diz et al. 2013). For this purpose, insulin concentrations were measured in fresh serum samples from fasting participants using a commercially available chemiluminescent immunoassay in an ADVIA Centaur XP Immunoassay System (Siemens, Spain).

2.2.3. Determination of carbohydrate-deficient transferrin

Serum CDT was determined using the commercial CAPILLARYS CDT™ kit on a MINICAP CDT™ device (Sebia, USA), as reported elsewhere (O'Flaherty et al. 2022). The manufacturer's instructions were strictly followed. The assay is based on capillary electrophoresis. Transferrin glycoforms are separated by their electrophoretic mobility and electroosmotic flow in the capillary. The proteins are detected directly at the cathodic end of the capillary. During the analysis, serum transferrin is separated into 5 main isoforms according to their degree of sialylation (asialotransferrin [non-sialylated], disialotransferrin, trisialotransferrin, tetrasialotransferrin and pentasialotransferrin). Sialylation variants were observed in 17 individuals and method interference was present in 22 individuals, preventing the determination of the percentage of 5-, 4- and 3-sialylated transferrin, but not CDT. Low sialylation transferrin glycoforms (i.e., disialotransferrin plus asialotransferrin) make up %CDT, which is automatically calculated by the system. The manufacturer recommends the following results interpretation: (1) normal (%CDT ≤1.3%), (2) indeterminate (%CDT >1.3% and ≤1.6%) and (3) abnormal or indicative of alcohol abuse (%CDT >1.6%). Total serum transferrin was measured using an ADVIA-Centaur analyzer (Siemens, Spain). Transferrin measurement was not available for 1 participant. Absolute CDT (in mg/dL) was estimated by multiplying the transferrin concentration by the %CDT.

2.3. Ethical issues

The study was approved by the Regional Ethics Committee (code 2012-025) and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants.

2.4. Statistical analyses

The chi-squared test was used to compare proportions. The Mann-Whitney test was used to compare numerical variables between groups and the Jonckheere-Terpstra trend test was used to compare numerical variables among ordinal categories. The Spearman's rank test was used to assess correlation. The generalized additive model for location, scale, and shape (GAMLSS) with

beta distribution response was used for multivariate analysis of factors associated with %CDT. This method is well suited for response variables that are continuous and constrained within the (0,1) interval, such as proportions or rates, because it accounts for their non-normal distribution and potential heteroskedasticity (Stasinopoulos et al. 2017). For ease of interpretation, beta regression coefficients were converted to odds ratios by exponentiating them. In this model, the first-order interactions between the predictor variables and alcohol consumption were assessed. The inclusion of the interaction terms in the final model was based on a likelihood ratio test. The association between %CDT and T2DM incidence was estimated using a proportional hazards Cox regression model. We estimated univariate Cox models, estimating the independent effect of CDT, as well as multivariate models, adjusting for the confounding effect of other clinical factors. The results of these models were presented as hazard ratios with their 95% confidence intervals. The discriminatory power of the model was assessed using the C-index. We also examined the association between the relative concentration of the various CDT glycoforms and the incidence of T2DM. These compositional data were incorporated into the prediction models as balances. A balance is a measure that represents a proportional relationship between subsets of parts of a composition, calculated as a linear combination of the logarithms of the parts weighted by coefficients reflecting their relative importance. First, observations were completed with zeros using a simple imputation for compositional data. Second, we employed an elastic net model for censored data (Pujolassos et al. 2024) to identify the balance with the highest predictive capacity for T2DM incidence. The analyses were performed with the statistical analysis software R (R Core Team 2024). Specifically, the *gamlss* packages (Rigby and Stasinopoulos 2005) were used to model the effect of clinical variables on CDT concentration. The *survival* package (Therneau 2024) was used to estimate Cox models. Lastly, the *coda4microbiome* package (Calle et al. 2024) allowed the relative concentration of glycoform variants to be treated as a composition.

3. Results

3.1. General distribution of serum carbohydrate-deficient transferrin levels

The distribution of the 5 transferrin glycoforms in the study population is shown in Figure 1. The most common glycoform was tetrasialylated. The median %CDT (i.e., the sum of disialylated and asialylated glycoforms) was 0.70% (mean, 0.84%, interquartile range 0.50%-0.90%, range 0.10%-10.9%). The distribution (histogram) of CDT levels in percentages and in absolute terms (mg/dL) is shown in Supplementary Figure 1. Both parameters showed a right-skewed distribution (Supplementary Figure 1).

3.2. Association of carbohydrate-deficient transferrin with demographic and lifestyle variables

In the univariate analyses (Table I), CDT concentrations (either as %CDT or in absolute terms) were higher in men than in women, and no significant association was observed with age or regular physical activity (Table I). Serum CDT concentrations were higher in current smokers than in non-smokers (Table I). As expected, serum CDT concentrations were higher in alcohol drinkers. The effect of alcohol on CDT levels was observed both when alcohol was measured in g/week and when the AUDIT was used. Likewise, the effect of alcohol consumption on CDT was evident in light drinkers compared with abstainers (Table I). There was also a significant trend for CDT to increase with increasing alcohol consumption ($P<0.001$, trend test).

3.3. Association of carbohydrate-deficient transferrin with metabolic variables

In univariate analyses (Table I), individuals with obesity and those with metabolic syndrome had significantly higher CDT levels (either as %CDT or in absolute terms) than those without, although the absolute differences were small (Table I). Similarly, CDT levels were higher among individuals with some components of metabolic syndrome, such as hypertension and hypertriglyceridemia (Table I). Individuals with diabetes and prediabetes also had higher CDT levels than normoglycemic individuals (Table I). The vast majority of individuals with diabetes mellitus (178 of 183, 97.3%)

were classified as having T2DM. Accordingly, CDT levels were higher in participants with insulin resistance, as indicated by high HOMA-IR levels (Table I). There was a positive significant correlation between HOMA-IR levels and %CDT (Rho, 0.146; $P<0.001$).

Figure 2 shows the interaction (i.e., effect modification) between alcohol consumption and some metabolic and lifestyle variables in relation to %CDT. The effect of alcohol consumption on %CDT was lower in participants with obesity and overweight than in those with normal weight. Similarly, the effect of alcohol consumption on %CDT was lower in participants with diabetes and prediabetes than in those with normal weight. Likewise, the effect of alcohol consumption on %CDT was lower in participants with insulin resistance (as estimated by HOMA-IR) than in those without it. Conversely, the effect of alcohol consumption on %CDT was higher in smokers than in non-smokers (Figure 2).

Among the 131 participants with heavy drinking (≥ 280 g/week), the proportion of individuals with %CDT $\geq 1.6\%$ (i.e., the sensitivity of the test) was 38.5% (25/65) in normoglycemic individuals, 18.2% (8/36) in individuals with prediabetes, and 18.2% (4/18) in individuals with diabetes ($P=0.036$). Similarly, among participants with heavy drinking, the proportion of individuals with %CDT $\geq 1.6\%$ was 50.0% (9/18) in participants with normal weight, 37.3% (19/51) in participants with overweight, and 14.5% (9/62) in participants with obesity ($P=0.002$).

The multivariate analysis of factors associated with %CDT levels is shown in Table II. The model includes first-order interactions with alcohol consumption. Male sex and alcohol consumption retained an independent association with %CDT levels. Conversely, BMI, smoking, and diabetes *per se* were not significantly associated with %CDT levels after adjusting for confounders. Of note, male sex, smoking, and hypertension showed a positive significant interaction with alcohol consumption (especially with heavy drinking [≥ 280 g/week]) in relation to %CDT levels. Conversely, obesity, diabetes, and prediabetes showed a negative significant interaction with alcohol consumption (especially with heavy drinking [≥ 280 g/week]) in relation to %CDT values after

adjusting for confounders (Table II). Similar results were obtained when CDT was entered in mg/dL instead of %CDT in the multivariate models (data not shown).

3.4. Predictive value of transferrin glycoforms for incident type 2 diabetes mellitus

Relative quantification of the 5 transferrin glycoforms (asialotransferrin, disialotransferrin, trisialotransferrin, tetrasialotransferrin, and pentasialotransferrin) was available for 1300 individuals without diabetes. Two participants were excluded from these analyses because they developed diabetes secondary to pancreatic cancer during follow-up. A total of 68 from the remaining 1298 individuals developed T2DM, with an incidence of 5.2% (95% CI: 4.1%-6.6%) after a mean participant follow-up of 7.4 years. As shown in Table III, baseline %CDT concentration did not show a significant association with the T2DM incidence either univariately or after adjusting for additional clinical variables. The balance between pentasialotransferrin and trisialotransferrin tended to be associated with T2DM incidence in a univariate analysis, but this association was largely attenuated after adjusting for the effect of additional covariates (Table III). In the same model, the BMI and prediabetes were significantly associated with incident T2DM (Table III).

4. Discussion

In this general population-based study, we observed that common metabolic disorders (obesity and diabetes mellitus) modify the effect of alcohol consumption on serum CDT levels. In our experience, these metabolic disorders *per se* have little influence on CDT levels, but their interaction with alcohol consumption is significant and could affect the diagnostic performance of CDT as a marker of alcohol abuse.

Previous studies in a twin registry have shown that BMI has significant effects on the alcohol-CDT dose-response curve (Whitfield et al. 1998, 2008). The authors had speculated that insulin resistance might play a role, but they did not measure it in their studies (Whitfield et al. 1998, 2008). To our knowledge, this is the first study in a general adult population to examine the

interaction of alcohol consumption with BMI and also with the presence of diabetes or

prediabetes and with insulin resistance, as estimated by the HOMA-IR in relation to CDT levels.

According to our results, it appears plausible that a state of insulin resistance modifies the effect of alcohol consumption on transferrin sialylation. The mechanisms for this are not fully understood.

The ST6GAL1 gene, which encodes beta-galactosidase alpha-2,6-sialyltransferase 1 (a major enzyme responsible for the transfer of sialic acid residues to terminal galactose residues), was

found to be downregulated by acetaldehyde, the major by-product of ethanol metabolism (Gosh et al. 1995; Gong et al. 2008). In addition, the modulation of sialic acids is one of the important

pathological findings in diabetes mellitus, as recently reviewed (Ibrahim et al. 2024). In animal

models, cell surface sialic acids are involved in hepatic insulin action, supporting a role for reduced cell surface sialic acid residues in the insulin resistance of T2DM (Salhanick and Amatruda 1988).

Glycosylation abnormalities are a hallmark of diabetes mellitus (Rudman et al. 2019; Ibrahim et al.

2024). The enzymatic, active process of glycosylation (including sialylation) is distinct from the

passive, non-enzymatic glycation that is also a well-known feature of diabetes, as evidenced by

HbA1c levels. Sialic acids are closely associated with glucose transport and are elevated in almost

all forms of diabetes (Ibrahim et al. 2024). Furthermore, sialic acid levels are elevated in people

with obesity and are associated with reduced insulin sensitivity (Rajappa et al., 2013). Plausible

mechanistic explanations for the increased sialic acids in patients with diabetes mellitus include

increased desialylation by sialidases, stimulation of the hexosamine pathway and synthesis of

acute phase proteins, and oxidative stress (Ibrahim et al. 2024). In mice, loss of sialic acid synthesis

in the liver leads to insulin resistance (Peng et al. 2023). It is possible that the increased circulating

levels of sialic acid observed in people with diabetes and/or obesity (Rajappa et al. 2013; Ibrahim

et al., 2024) lead to increased transferrin sialylation or interfere with the transferrin desialylation

characteristic of heavy drinkers. Future studies are needed to evaluate whether increased sialic

acid concentrations and their effect on transferrin sialylation could be one of the reasons why

insulin-resistant heavy drinkers have lower CDT levels than non-insulin-resistant heavy drinkers.

1
2
3 Interestingly, previous studies have also shown an interaction between alcohol consumption and
4
5 BMI in relation to the development of T2DM. A meta-analysis of 26 studies reported a U-shaped
6
7 association between alcohol consumption and the development of T2DM, with the lowest risk of
8
9 T2DM observed among light and moderate alcohol drinkers (Li et al. 2016). In fact, low to
10
11 moderate alcohol might decrease insulin resistance, whereas alcohol abuse could increase it
12
13 (Lazarus et al. 1997; Han 2020). However, in another meta-analysis of 55 studies, the observed
14
15 reduced risk appeared to be specific to women in general and to women with a BMI ≥ 25 kg/m² in
16
17 particular (Llamas-Falc3n et al. 2023). Similarly, a study in Japan showed that low-to-moderate
18
19 alcohol consumption might reduce the risk of T2DM in people with excess body weight, whereas
20
21 high alcohol consumption might increase the risk of T2DM in those with lower BMI (Wang et al.
22
23 2025). These findings suggest that the association between alcohol consumption and T2DM risk
24
25 varies with BMI in subgroups of the population (Wang et al. 2025). In an attempt to disentangle
26
27 the possible cross-talk between changes in sialylation associated with alcohol consumption, BMI
28
29 and the development of T2DM, we examined the incidence of T2DM in this population after a
30
31 median of 7 years. The main factors associated with the development of T2DM were, as expected,
32
33 obesity and prediabetes status. However, alcohol consumption and CDT levels were not
34
35 significantly associated with the development of T2DM in our study. We also investigated the
36
37 possible association of other transferrin glycoforms with T2DM incidence, an aspect that has been
38
39 little studied. In our experience, the balance between transferrin isoforms was not significantly
40
41 associated with the development of T2DM after adjusting for confounders.
42
43 The main strengths of the study are its randomized design based on a general population with a
44
45 wide age range and the availability of longitudinal follow-up. In addition, the study included
46
47 extensive phenotyping of lifestyle and metabolic variables. An additional strength is the
48
49 consistency with previous studies in another study population in the same area, where similar
50
51 results were observed regarding the interaction between alcohol consumption and BMI in relation
52
53 to CDT levels (unpublished observation, Supplementary Figure 2). The main weakness of the study
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 is the lack of mechanistic data to explain the interaction between alcohol consumption, insulin
4
5 resistance, BMI and diabetes in relation to CDT levels.
6
7
8 In conclusion, the results of the study have practical clinical implications. CDT values for the
9
10 detection of alcohol abuse should be interpreted in light of the patient's BMI and glycemic status.
11
12 Further studies are needed to elucidate the interactions between alcohol consumption,
13
14 glycosylation, insulin resistance, obesity, diabetes and the mechanisms of their influence on CDT
15
16 levels.
17
18
19
20
21
22

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding statement: This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the project PI20/01069 and co-funded by the European Union; and the Network for Research on Chronicity, Primary Care, and Health Promotion, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), RD21/0016/0022, and co-funded by the European Union-NextGenerationEU. TGV was supported by a R3o Horteiga research contract (CM24/00080) from the ISCIII. 3LB was supported by ISCIII Support Platforms for Clinical Research (ISCIII/PT23/00118/Co-funded by European Union). The Galician Innovation Agency-Competitive Benchmark Groups (GAIN-GRC/IN607A/2021/02/Xunta de Galicia) supported MAS.

Author contributions: TGV: Data curation, writing – original draft, visualization. FdIO: Investigation, writing – original draft. 3LB: Formal analysis, methodology, software, validation, visualization. MAS: Data curation, project administration, validation. CFM: Investigation, resources, validation. JSC: Investigation, validation. FG: Funding acquisition, methodology, resources, software, supervision. AGQ: Conceptualization, data curation, funding acquisition, supervision, visualization, writing – original draft. All authors read and approved the final version of the manuscript.

1
2
3 **Data availability statement:** The data that support the findings of this study are available on
4
5 request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or
6
7 ethical restrictions.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Adult Treatment Panel-III. 2001. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *JAMA*. 285:2486–2497.
- Alende-Castro V, Alonso-Sampedro M, Vazquez-Temprano N, Tuñez C, Rey D, García-Iglesias C, Sopena B, Gude F, Gonzalez-Quintela A. 2019. Factors influencing erythrocyte sedimentation rate in adults: New evidence for an old test. *Medicine (Baltimore)*. 98:e16816.
- Alte D, Luedemann J, Rose HJ, John U. 2004. Laboratory markers carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase, and mean corpuscular volume are not useful as screening tools for high-risk drinking in the general population: results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Alcohol Clin Exp Res*. 28:931–940.
- American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2024. 2. Diagnosis and classification of diabetes: Standards of care in diabetes-2024. *Diabetes Care*. 47:S20–S42.
- Arndt T. 2001. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem*. 47:13–27.
- Babovic-Vuksanovic D, O'Brien JF. 2007. Laboratory diagnosis of congenital disorders of glycosylation type I by analysis of transferrin glycoforms. *Mol Diagn Ther*. 11:303–311.
- Bergstrom JP, Helander A. 2008. Clinical characteristics of carbohydrate-deficient transferrin (%disialotransferrin) measured by HPLC: sensitivity, specificity, gender effects and relationship with other alcohol biomarkers. *Alcohol Alcohol*. 43:436–441.
- Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F. 2006. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001–2005. *J Chromatogr B*. 841:96–109.
- Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Tagliaro F. 2007. Fully automated analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) by using a multicapillary electrophoresis system. *Clin Chim Acta*. 380:4–7.
- Calle M, Susin T, Pujolassos M. 2024. coda4microbiome: Compositional data analysis for microbiome studies. R package version 0.2.4. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=coda4microbiome>
- Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GS, Bondt A, Wuhrer M. 2016. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*. 33:309–343.
- Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, et al. 2003. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc*. 35:1381–1395.

1
2
3 Fagan KJ, Irvine KM, McWhinney BC, Fletcher LM, Horsfall LU, Johnson LA, Clouston AD, Jonsson JR,
4 O'Rourke P, Martin J, Pretorius CJ, Ungerer JP, Powell EE. 2013. BMI but not stage or etiology of
5 nonalcoholic liver disease affects the diagnostic utility of carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol*
6 *Clin Exp Res.* 37:1771–1778.
7
8 Fagan KJ, Irvine KM, McWhinney BC, Fletcher LM, Horsfall LU, Johnson L, O'Rourke P, Martin J, Scott I,
9 Pretorius CJ, Ungerer JP, Powell EE. 2014. Diagnostic sensitivity of carbohydrate-deficient transferrin in
10 heavy drinkers. *BMC Gastroenterol.* 14:97.
11
12 Fagerberg B, Agewall S, Urbanavicius V, Attvall S, Lundberg PA, Lindstedt G. 1994. Carbohydrate-
13 deficient transferrin is associated with insulin sensitivity in hypertensive men. *J Clin Endocrinol Metab.*
14 79:712–715.
15
16 Fleming MF, Anton RF, Spies CD. 2004. A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical
17 factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol Clin Exp Res.* 28:1347–1355.
18
19 Gayoso-Diz P, Otero-González A, Rodríguez-Alvarez MX, Gude F, García F, De Francisco A, Quintela AG.
20 2013. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult
21 population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocr Disord.* 13:47.
22
23 Ghosh P, Liu QH, Lakshman MR. 1995. Long-term ethanol exposure impairs glycosylation of both N- and
24 O-glycosylated proteins in rat liver. *Metabolism.* 44:890–898.
25
26 Gong M, Castillo L, Redman RS, Garige M, Hirsch K, Azuine M, Amdur RL, Seth D, Haber PS, Lakshman
27 MR. 2008. Down-regulation of liver Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-sialyltransferase gene by ethanol significantly
28 correlates with alcoholic steatosis in humans. *Metabolism.* 57:1663–1668.
29
30 González-Quintela A, Gude F, Boquete O, Rey J, Meijide LM, Suarez F, Fernández-Merino MC, Pérez LF,
31 Vidal C. 2003. Association of alcohol consumption with total serum immunoglobulin E levels and
32 allergic sensitization in an adult population-based survey. *Clin Exp Allergy.* 33:199–205.
33
34 Gual A, Martos AR, Lligona A, Llopis JJ. 1999. Does the concept of a standard drink apply to viticultural
35 societies? *Alcohol.* 34:153–160.
36
37 Han M. 2020. The dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of type 2
38 diabetes among Asian men: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *J Diab*
39 *Res.* 2020:1–8.
40
41 Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, Hoshino T, John WG, Kobold U,
42 Little R, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Susanto F, Takei I, Thienpont L, Umemoto M, Wiedmeyer HM; IFCC
43 Working Group on HbA1c Standardization. 2004. IFCC reference system for measurement of

1
2
3 hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan,
4 and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem.* 50:166–174.
5
6 Ibrahim MA, Isah MB, Inim MD, Abdullahi AD, Adamu A. 2024. The connections of sialic acids and
7 diabetes mellitus: therapeutic or diagnostic value? *Glycobiology.* 34:cwae053.
8
9 Lado-Baleato Ó, Torre J, O'Flaherty R, Alonso-Sampedro M, Carballo I, Fernández-Merino C, Vidal C,
10 Gude F, Saldova R, González-Quintela A. 2023. Age-related changes in serum N-glycome in men and
11 women—clusters associated with comorbidity. *Biomolecules.* 14:17.
12
13 Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. 2016. Mechanisms of disease: the human N-glycome. *Biochim*
14 *Biophys Acta.* 1860:1574–1582.
15
16 Lazarus R, Sparrow D, Weiss ST. 1997. Alcohol intake and insulin levels: the Normative Aging Study. *Am*
17 *J Epidemiol.* 145:909–916.
18
19 Li XH, Yu F, Zhou YH, He J. 2016. Association between alcohol consumption and the risk of incident type
20 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 103:818–829.
21
22 Lipiński P, Tyłki-Szymańska A. 2021. Congenital disorders of glycosylation: what clinicians need to
23 know? *Front Pediatr.* 9:715151.
24
25 Llamas-Falcón L, Rehm J, Bright S, Buckley C, Carr T, Kilian C, Lasserre AM, Lemp JM, Zhu Y, Probst C.
26 2023. The relationship between alcohol consumption, BMI, and type 2 diabetes: a systematic review
27 and dose-response meta-analysis. *Diabetes Care.* 46:2076–2083.
28
29 Morinaga M, Kon K, Uchiyama A, Fukada H, Fukuhara K, Yaginuma R, Nakadera E, Yamashina S, Ikejima
30 K. 2022. Carbohydrate-deficient transferrin is a sensitive marker of alcohol consumption in fatty liver
31 disease. *Hepatol Int.* 16:348–358.
32
33 Niemelä O. 2007. Biomarkers in alcoholism. *Clin Chim Acta.* 377:39–49.
34
35 O'Flaherty R, Simon Á, Alonso-Sampedro M, Sánchez-Batán S, Fernández-Merino C, Gude F, Saldova R,
36 González-Quintela A. 2022. Changes in serum N-glycome for risk drinkers: a comparison with standard
37 markers for alcohol abuse in men and women. *Biomolecules.* 12:241.
38
39 Peng J, Yu L, Huang L, Paschoal VA, Chu H, de Souza CO, Varre JV, Oh DY, Kohler JJ, Xiao X, Xu L, Holland
40 WL, Shaul PW, Mineo C. 2023. Hepatic sialic acid synthesis modulates glucose homeostasis in both liver
41 and skeletal muscle. *Mol Metab.* 78:101812.
42
43 Pujolassos M, Susín A, Calle ML. 2024. Microbiome compositional data analysis for survival studies.
44 *NAR Genomics Bioinform.* 6:lqae038.

1
2
3 R Core Team. 2024. R: a language and environment for statistical computing. *R Foundation for*
4 *Statistical Computing*, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>
5
6
7 Rajappa M, Ikkurthi S, Nandeesh H, Satheesh S, Sundar I, Ananthanarayanan PH, Harichandrakumar
8 KT. 2013. Relationship of raised serum total and protein bound sialic acid levels with hyperinsulinemia
9 and indices of insulin sensitivity and insulin resistance in non-diabetic normotensive obese subjects.
10 *Diabetes Metab Syndr*. 7:17–19.
11
12 Raynor A, Haouari W, Lebredonchel E, Foulquier F, Fenaille F, Bruneel A. 2024. Biochemical diagnosis of
13 congenital disorders of glycosylation. *Adv Clin Chem*. 120:1–43.
14
15 Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. 2019. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*.
16 15:346–366.
17
18 Rigby RA, Stasinopoulos DM. 2005. Generalized additive models for location, scale and shape. *Appl*
19 *Statist*. 54:507–554.
20
21 Rubio Valladolid G, Bermejo Vicedo J, Caballero Sánchez-Serrano MC, Santo-Domingo Carrasco J. 1998.
22 Validation of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) in primary care. *Rev Clin Esp*.
23 198:11–14.
24
25 Rudman N, Gornik O, Lauc G. 2019. Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug
26 targets in diabetes. *FEBS Lett*. 593:1598–1615.
27
28 Salhanick AI, Amatruda JM. 1988. Role of sialic acid in insulin action and the insulin resistance of
29 diabetes mellitus. *Am J Physiol*. 255:E173–E179.
30
31 Schauer R. 2009. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol*.
32 19:507–514.
33
34 Sillanaukee P, Massot N, Jousilahti P, Vartiainen E, Sundvall J, Olsson U, Poikolainen K, Pönniö M, Allen
35 JP, Alho H. 2000. Dose response of laboratory markers to alcohol consumption in a general population.
36 *Am J Epidemiol*. 152:747–751.
37
38 Spik G, Debruyne V, Montreuil J, van Halbeek H, Vliegenthart JF. 1985. Primary structure of two
39 sialylated triantennary glycans from human serotransferrin. *FEBS Lett*. 183:65–69.
40
41 Stasinopoulos MD, Rigby RA, Heller GZ, Voudouris V, De Bastiani F. 2017. Flexible regression and
42 smoothing: using GAMLSS in R. CRC Press, Taylor & Francis Group.
43
44 Stibler H. 1991. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful
45 alcohol consumption reviewed. *Clin Chem*. 37:2029–2037.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Stibler H, Borg S. 1991. Glycoprotein glycosyltransferase activities in serum in alcohol-abusing patients
4 and healthy controls. *Scand J Clin Lab Invest*. 51:43–51.
5
6
7 Therneau T. 2024. A package for survival analysis in R. *R package version 3.6-4*. Available at:
8 <https://CRAN.R-project.org/package=survival>
9
10
11 Trbojević-Akmačić I, Vučković F, Pribić T, Vilaj M, Černigoj U, Vidič J, Šimunović J, Kepek A, Kolčić I, Klarić
12 L, Novokmet M, Pučić-Baković M, Rapp E, Štrancar A, Polašek O, Wilson JF, Lauc G. 2023. Comparative
13 analysis of transferrin and IgG N-glycosylation in two human populations. *Commun Biol*. 6:312.
14
15 Wang Y, Inoue Y, Yamamoto S, Fukunaga A, Yamamoto S, Honda T, Nakagawa T, Hayashi T, Konishi M,
16 Mizoue T. 2025. Association between alcohol consumption and the risk of type 2 diabetes mellitus
17 across different body mass index categories among Japanese workers. *J Epidemiol*. In press.
18
19 Whitfield JB, Dy V, Madden PAF, Heath AC, Martin NG, Montgomery GW. 2008. Measuring
20 carbohydrate-deficient transferrin by direct immunoassay: factors affecting diagnostic sensitivity for
21 excessive alcohol intake. *Clin Chem*. 54:1158–1165.
22
23 Whitfield JB, Fletcher LM, Murphy TL, Powell LW, Halliday J, Heath AC, Martin NG. 1998. Smoking,
24 obesity, and hypertension alter the dose-response curve and test sensitivity of carbohydrate-deficient
25 transferrin as a marker of alcohol intake. *Clin Chem*. 44:2480–2489.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legends

Figure 1. Schematic representation of serum transferrin *N*-glycosylation and mean percentage of the various isoforms (pentasialylated [5-sialo], tetrasialylated [4-sialo], trisialylated [3-sialo], disialylated [2-sialo], and asialylated [0-sialo]) observed in the present study (n=1477). The *N*-glycans shown are only potential examples of the most frequent forms within the great variability in transferrin glycosylation (Clerc et al. 2016; Trbojević-Akmačić et al. 2024).

Figure 2. Mean CDT (carbohydrate-deficient transferrin) levels in the study population, stratified by alcohol consumption and metabolic variables (BMI, glycemic status, and Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance [HOMA-IR], in tertile categories) and smoking. CDT levels increase with alcohol consumption in all categories, but CDT levels in heavy drinkers (280 g/w or more) are lower with increasing BMI ($P<0.001$), increasing insulin resistance (HOMA-IR) ($P<0.001$) and worsening glycemic status (normoglycemia > prediabetes > diabetes) ($P=0.017$). In contrast, CDT levels in heavy drinkers are higher in smokers than in non-smokers ($P=0.001$).

Supplementary Figure 1. Histogram of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) levels in percentage and in absolute terms (mg/dL).

Supplementary Figure 2. Mean CDT concentrations in a validation study population (n=413), stratified by alcohol consumption and body mass index. The adult participants were different from those in the present study although they were from the same health area, as described elsewhere (Gonzalez-Quintela et al. 2003). For this validation study and as a sensitivity analysis, alcohol abusers were defined as women who habitually consumed more than 140 g of alcohol per week (equivalent to more than 20 g of alcohol per day) and men who habitually consumed more than 210 g of alcohol per week (equivalent to more than 30 g of alcohol per day). Light drinkers were defined as those individuals who habitually consumed alcohol but less than these amounts.

Abstainers and occasional drinkers were included in the same group. According to BMI, individuals were classified as lean ($<25 \text{ kg/m}^2$), overweight ($25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$) or obese ($>30 \text{ kg/m}^2$). The method used to determine CDT was the same as in the main study. It was observed that BMI modifies the effect of alcohol consumption on CDT levels, with the effect being greater in lean individuals than in individuals with overweight or obesity.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table I. Serum concentrations of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in relation to demographic, lifestyle, and metabolic factors

Factor	CDT (%)			CDT (mg/dL)		
	No.	Median (IQR)	P value	No.	Median (IQR)	P value
Sex						
Woman (ref.)	838	0.6 (0.5-0.8)	-	837	1.7 (1.3-2.2)	-
Man	678	0.8 (0.6-1.0)	<0.001	678	2.0 (1.4-2.7)	<0.001
Age (years)						
18-35 (ref.)	296	0.7 (0.5-0.8)	-	296	1.8 (1.3-2.3)	-
>35-50	413	0.7 (0.5-0.9)	0.179	412	1.8 (1.3-2.5)	0.661
>50-65	391	0.7 (0.6-0.9)	0.010	391	1.8 (1.4-2.5)	0.280
>65	416	0.7 (0.5-0.9)	0.415	416	1.7 (1.3-2.3)	0.399
Alcohol consumption (g/week)						
0-9 (ref.)	546	0.6 (0.5-0.7)	-	546	1.6 (1.2-2.1)	-
10-139	598	0.7 (0.5-0.8)	<0.001	597	1.8 (1.3-2.3)	<0.001
140-279	241	0.8 (0.6-1.1)	<0.001	241	2.1 (1.6-2.8)	<0.001
≥280	131	1.0 (0.8-1.8)	<0.001	131	2.8 (2.0-4.7)	<0.001
AUDIT (test points)						
0-7 (ref.)	1390	0.7 (0.5-0.8)	-	1389	1.8 (1.3-2.3)	-
≥8	126	0.9 (0.6-1.5)	<0.001	126	2.5 (1.6-3.6)	<0.001
Smoking (current)						
No (ref.)	1220	0.7 (0.5-0.8)	-	1219	1.7 (1.3-2.3)	-
Yes	296	0.8 (0.6-1.0)	<0.001	296	2.0 (1.5-2.9)	<0.001
Physical activity						
Low (ref.)	596	0.7 (0.5-0.9)	-	595	1.8 (1.4-2.4)	-
Moderate	552	0.7 (0.5-0.9)	0.324	552	1.8 (1.3-2.4)	0.288
High	368	0.7 (0.5-0.9)	0.760	368	1.8 (1.4-2.4)	0.726
Body mass index (kg/m²)						
≤25 (ref.)	424	0.6 (0.5-0.8)	-	424	1.7 (1.3-2.2)	-
>25-30	574	0.7 (0.5-0.9)	0.019	573	1.7 (1.3-2.4)	0.160
>30	518	0.7 (0.6-0.9)	<0.001	518	1.9 (1.5-2.5)	<0.001
Abdominal obesity^a						
No	856	0.7 (0.5-0.9)	-	855	1.8 (1.3-2.4)	-
Yes	659	0.7 (0.6-0.9)	0.171	659	1.8 (1.4-2.4)	0.280
High blood pressure^a						
No (ref.)	746	0.7 (0.5-0.8)	-	745	1.7 (1.3-2.3)	-
Yes	770	0.7 (0.6-0.9)	<0.001	770	1.9 (1.4-2.6)	<0.001
Low HDL-cholesterol^a						
No (ref.)	1249	0.7 (0.5-0.9)	-	1248	1.8 (1.3-2.5)	-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Yes	266	0.7 (0.6-0.8)	0.769	266	1.8 (1.4-2.2)	0.757
Hypertriglyceridemia^a						
No (ref.)	1232	0.7 (0.5-0.8)	-	1231	1.8 (1.3-2.3)	-
Yes	277	0.7 (0.6-0.9)	0.001	277	1.9 (1.6-2.6)	<0.001
Metabolic syndrome						
No (ref.)	1202	0.7 (0.5-0.9)	-	1201	1.8 (1.4-2.4)	-
Yes	314	0.7 (0.6-0.9)	<0.001	314	2.0 (1.6-2.5)	<0.001
Insulin resistance						
No (HOMA-IR <3, ref.)	983	0.7 (0.5-0.8)	-	982	1.7 (1.3-2.3)	-
Yes (HOMA-IR ≥3)	533	0.7 (0.6-0.9)	<0.001	533	2.0 (1.6-2.5)	<0.001
Glycemic status						
Normoglycemia (ref.)	944	0.7 (0.5-0.8)	-	943	1.7 (1.3-2.3)	-
Prediabetes	389	0.7 (0.6-0.9)	0.004	389	1.9 (1.4-2.4)	0.024
Diabetes	183	0.7 (0.6-0.9)	0.002	183	2.0 (1.6-2.7)	<0.001

^aAccording to ATP-III criteria (Adult Treatment Panel-III, 2001). IQR, interquartile range. AUDIT, Alcohol Use Disorders Identification Test. HDL, high-density lipoprotein. HOMA-IR, Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance. Ref., reference category.

Table II. Multivariate analysis of factors associated with CDT (carbohydrate-deficient transferrin, proportion). Generalized additive model for location, scale and shape (GAMLSS) with Beta distribution response was used. The model includes first-order interactions with alcohol consumption

Factor	OR	95% CI	P value
Sex			
Woman (ref.)	1	--	--
Man	1.01	(0.91-1.13)	0.770
Age (years)	1.002	(1.000-1.004)	0.036
Alcohol consumption (g/week)			
0-9 (ref.)	1	--	--
10-139	1.08	(0.96-1.22)	0.204
140-279	1.41	(1.17-1.70)	<0.001
≥280	1.89	(1.37-2.63)	<0.001
Current smoking (yes)	1.11	(0.98-1.28)	0.100
High blood pressure (yes)			
No (ref.)	1	--	--
Yes	0.98	(0.88-1.09)	0.750
Body mass index (BMI) (kg/m²)			
≤25 (ref.)	1	--	--
>25-30	0.98	(0.88-1.10)	0.837
>30	1.06	(0.95-1.20)	0.274
Glycemic status			
Normoglycemia (ref.)	1	--	--
Prediabetes	1.05	(0.94-1.17)	0.363
Diabetes	1.12	(0.97-1.29)	0.121
Interaction between sex and alcohol consumption			
Male and 10-139 g/week	1.14	(1.00-1.31)	0.045
Male and 140-279 g/week	1.21	(1.03-1.43)	0.020
Male and ≥280 g/week	1.28	(0.93-1.78)	0.125
Interaction between smoking and alcohol consumption			
Smoking and 10-139 g/week	0.98	(0.84-1.16)	0.877
Smoking and 140-279 g/week	1.03	(0.85-1.26)	0.724
Smoking and ≥280 g/week	1.36	(1.12-1.66)	0.002
Interaction between hypertension and alcohol consumption			
Hypertension and 10-139 g/week	1.02	(0.88-1.18)	0.787
Hypertension and 140-279 g/week	1.17	(0.99-1.39)	0.061
Hypertension and ≥280 g/week	1.21	(1.00-1.48)	0.047
Interaction between BMI and alcohol consumption			
>25-30 kg/m ² and 10-139 g/week	1.04	(0.90-1.21)	0.581
>25-30 kg/m ² and 140-279 g/week	0.81	(0.67-0.98)	0.030
>25-30 kg/m ² and ≥280 g/week	0.90	(0.73-1.13)	0.386
>30 kg/m ² and 10-139 g/week	1.00	(0.86-1.18)	0.950
>30 kg/m ² and 140-279 g/week	0.69	(0.56-0.85)	<0.001
>30 kg/m ² and ≥280 g/week	0.58	(0.46-0.75)	<0.001
Interaction between diabetes and alcohol consumption			
Prediabetes and 10-139 g/week	0.90	(0.78-1.05)	0.200
Prediabetes and 140-279 g/week	1.06	(0.90-1.26)	0.450
Prediabetes and ≥280 g/week	0.69	(0.57-0.85)	<0.001
Diabetes and 10-139 g/week	0.85	(0.70-1.06)	0.149
Diabetes and 140-279 g/week	0.81	(0.65-1.02)	0.079
Diabetes and ≥280 g/week	0.71	(0.55-0.92)	0.009

A beta regression model was utilized because the response variable is continuous and constrained within the (0,1) interval. To facilitate interpretation, beta regression coefficients were transformed into odds ratios (OR,

with 95% confidence intervals, CI) by exponentiating them. The interpretation of the coefficients (OR) is similar to a logistic regression. If it is less than 1, there is a reduction in the CDT proportion; if it is a value greater than 1, it indicates an increase in the proportion. BMI, body mass index. Ref., reference category. The model includes 1515 individuals.

Table III. Multivariate analysis (Cox regression) of factors associated with the incidence of diabetes mellitus. Transferrin sialylation was introduced as the relative abundance of the different isoforms and as the absolute abundance of CDT (carbohydrate-deficient transferrin)

	HR (95% CI)	HR (95% CI)	HR (95% CI)	HR (95% CI)
Age (years)	--	0.99 (0.97, 1.01) P=0.213	--	0.99 (0.97, 1.01) P=0.236
Sex				
Woman (ref.)	--	1	--	1
Man		1.11 (0.63, 1.95) P=0.712		1.02 (0.58, 1.80) P=0.932
Body mass index (kg/m²)				
≤25 (ref.)	--	1	--	1
25 – <30	--	1.56 (0.50, 4.84) P=0.445	--	1.53 (0.49, 4.74) P=0.465
≥30	--	4.16 (1.44, 12.06) P=0.009	--	3.97 (1.38, 11.47) P=0.011
Alcohol consumption (g/week)				
0-9 (ref.)	--	1	--	1
10-139	--	0.83 (0.46, 1.53) P=0.555	--	0.87 (0.47, 1.61) P=0.659
140-279	--	0.85 (0.42, 1.73) P=0.664	--	0.80 (0.39, 1.62) P=0.528
≥280	--	0.75 (0.28, 2.02) P=0.573	--	0.73 (0.27, 1.98) P=0.530
Current smoking				
No (ref.)	--	1	--	1
Yes		0.86 (0.35, 2.12) P=0.746		0.79 (0.32, 1.91) P=0.598
Prediabetes				
No (ref.)	--	1	--	1
Yes	--	16.5 (7.1, 38.3) P<0.001	--	16.1 (6.9-37.4) P<0.001
CDT (%)	0.77 (0.46, 1.31) P=0.334	0.55 (0.23-1.28) P=0.165	--	--
Transferrin isoform balance^a	--	--	1.76 (0.94, 3.28) P=0.076	1.44 (0.72-2.87) P=0.303
C-index (95% CI)	0.45 (0.38, 0.52)	0.86 (0.81, 0.90)	0.58 (0.51-0.64)	0.86 (0.82-0.90)

HR, hazard ratio. CI, confidence interval. CDT, carbohydrate-deficient transferrin. C-index, concordance index. ^aThe transferrin isoform balance with the highest predictive power was [log(pentasilylated transferrin) - log(trisiallylated transferrin)] (data for this specific analysis were available for 1298 individuals). Ref., reference category.

