

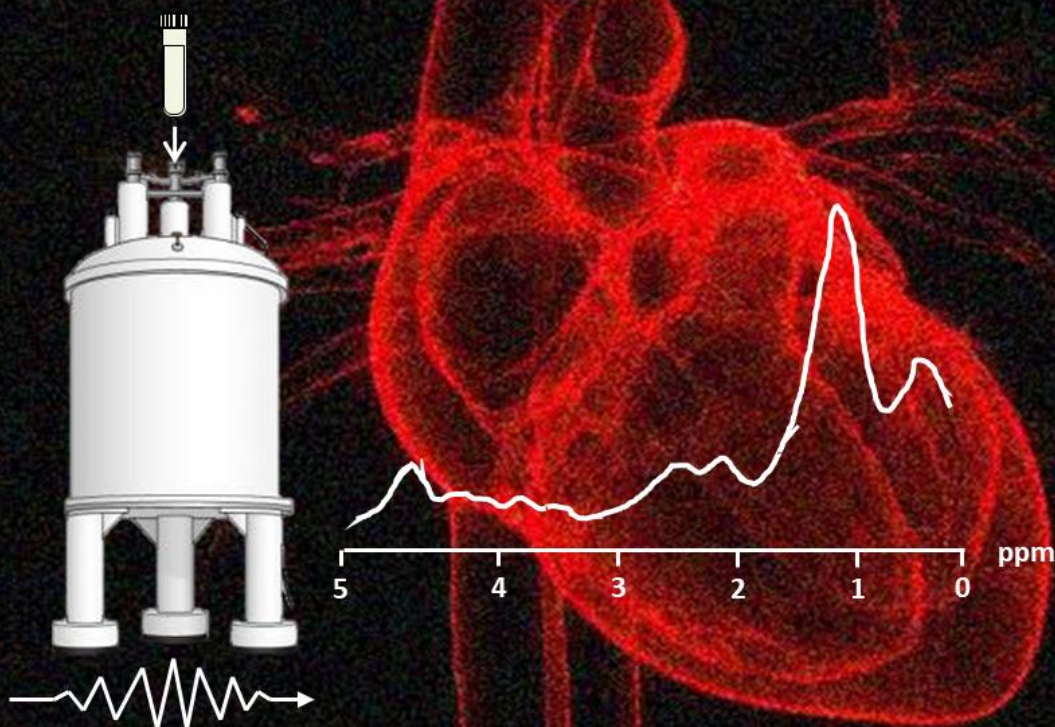


Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



***ANÀLISI MOLECULAR AVANÇAT MITJANÇANT
ESPECTROSCÒPIA DE RESSONÀNCIA NUCLEAR
MAGNÈTICA EN LA INSUFICIÈNCIA CARDÍACA***

***Tesi Doctoral
Albert Teis Soley***

**Universitat Autònoma
de Barcelona**

2022

TESI DOCTORAL

**ANÀLISI MOLECULAR AVANÇAT MITJANÇANT
ESPECTROSCÒPIA DE RESSONÀNCIA NUCLEAR
MAGNÈTICA EN LA INSUFICIÈNCIA CARDÍACA**

Albert Teis Soley

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Direcció:

Nuria Alonso Pedrol

Germán Eduardo Cediel Calderón

Tutor: Josep Lupón Rosés

UAB Universitat Autònoma
de Barcelona

Badalona, 2022

A la Paula, el meu sol

A en Guillem i na Carla, els meus tresors

Als meus pares i germanes

Als avis, tots, allí on siguin

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi doctoral és fruit del treball i esforç de tot un equip professionals amb els qui he tingut la oportunitat de treballar i aprendre en tots aquests últims anys. Sense la seva col·laboració i esforç, la present tesi doctoral no hauria estat possible. A tots ells, moltes gràcies.

Vull expressar el meu agraïment als doctors Germán Cediél i Nuria Alonso, codirectors de la present tesi, per la seva capacitat d'estímul i empena, la seva valuosa dedicació a l'activitat clínica i científica i el seu esperit de docència i lideratge.

Al Dr Antoni Bayés-Genís, per haver-me contaminat d'aquest esperit de recerca en el món de la Cardiologia i la seva motivació i ajuda per a iniciar diferents projectes de recerca.

El més sincer dels agraïments per al Dr Lupón i tot l'equip de la Unitat d'Insuficiència Cardíaca, així com als meus companys de la Unitat d'Imatge Cardíaca, Jorge López-Ayerbe, Dra Ferrer, Dra Vallejo, Gladys Juncà, Gizem Kasa, Dr Gual i tot equip d'infermeria (Rosa, Esperanza, Tere...) pel seu suport, ajuda, dedicació i també, perquè no dir-ho, per la seva paciència al llarg de tot aquest procés.

Als doctors Nuria Amigó i Josep Julve, per haver pogut compartir idees des del punt de vista no mèdic i haver-me ajudat en tot moment.

El més sincer dels agraïments amb meus pares, Josep Maria i Roser, i a en Manel i na Dolors, a qui els dec el qui soc. Gràcies pel vostre amor, ensenyances, sacrificis i companyia en els moments bons i no tant bons.

Cada una de les fites aconseguides ha estat també gràcies a vosaltres. A les meves germanes Maria i Elisabet pel seu amor i recolzament. A la resta de la família, de sang i política, pel seu recolzament incondicional.

Finalment, tot el meu agraïment i amor a les 3 persones més importants de la meva vida. A la Paula, la meva companya de viatge, amiga, amor, esposa i mare dels nostres fills. Gràcies per la teva paciència, fortalesa i amor en tot aquest procés, a vegades feixuc. Sense el teu suport, no hagués estat possible. A en Guillem i na Carla, els meus tresors. Gràcies per haver estat pacients i estimar-me com feu cada dia. El vostre amor és el que permet que cada dia sigui únic.

ABREVIATURES

| | |
|----------------|--------------------------------------------------|
| ARA-II | Antagonistes del receptors de l'angiotensina |
| C-HDL | Colesterol HDL |
| C-LDL | Colesterol LDL |
| CV | Cardiovascular |
| DAI | Desfibril·lador automàtic implantable |
| FG | Taxa estimada de filtració glomerular |
| Glic | Glicoproteïna |
| Glic-A | Glicoproteïna A |
| Glic-B | Glicoproteïna B |
| HDL | Lipoproteïna d'alta densitat |
| HDL-C/P | Quocient colesterol HDL sobre partícula HDL |
| HDL-Sz | Mida normalitzada de les HDL |
| IECA | Inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina |
| IC | Insuficiència cardíaca |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IMC | Índex de massa corporal |
| LDL | Lipoproteïna de baixa densitat |

| | |
|--------------------------------|------------------------------------------------|
| NT-proBNP | terminal-N del pro-pèptid natriurètic cerebral |
| PCR | Proteïna C reactiva |
| P-HDL | Concentració de partícula HDL |
| P-LDL | Concentració de partícula LDL |
| PPM | Parts per milió |
| RMN-H¹ | Ressonància nuclear magnètica d'hidrogen |
| ST2 | Interleukin-1 receptor-like 1 |
| TNF-α | Factor de necrosi tumoral alfa |
| TnT-US | Troponina T d'alta sensibilitat |
| UIC | Unitat d'Insuficiència Cardíaca |
| VLDL | Lipoproteïna de molt baixa densitat |

ÍNDIX DE FIGURES

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Prevalença d'IC en els estudis poblacions a nivell mundial, per regions..... | 24 |
| Figura 2. Evolució dels últims 28 anys i escenari actual de l'epidemiologia en IC..... | 25 |
| Figura 3. Principals activitats biològiques de les lipoproteïnes HDL..... | 28 |
| Figura 4. Hipòtesi de causalitat circular en la disfunció de les partícules HDL en relació a la inflamació i la resistència a la insulina en el context de la IC . | 29 |
| Figura 5. Equip d'espectroscòpia per ressonància nuclear magnètica | 32 |
| Figura 6. Espectre de senyal inicial obtingut d'una mostra de plasma per espectroscòpia en un equip de RNM-H ¹ | 34 |
| Figura 7. Perfil lipoproteic basat en espectroscòpia ordenada per difusió bidimensional..... | 35 |
| Figura 8. Anàlisi dels pics de l'espectre corresponents a Glic-A i Glic-B | 37 |
| Figura 9. Afectació multiorgànica en IC | 39 |
| Figura 10. Esquema de l'anàlisi molecular avançat mitjançant espectroscòpia de RMN-H1..... | 44 |
| Figura 11. Anàlisi de l'associació entre nivells de Glic-B i ST-2 | 83 |
| Figura 12. Incidència d'ingressos recurrents per IC segons els tercils de Glic-B en el subgrup de pacients d'etiologia no isquèmica | 85 |
| Figura 13. Significació clínica de la concentració de Glic-B en la insuficiència cardíaca crònica de causa no isquèmica | 88 |

ÍNDIX DE TAULES

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Taula 1. Causes de Mort a Espanya any 2019. Font: Institut Nacional d'Estadística (INE)..... | 23 |
| Taula 2. Característiques basals de la població a estudi del tercer article. ... | 80 |
| Taula 3. Quocient de risc amb interval de confiança del 95% per als esdeveniments clínics associats amb Glic-A i Glic-B en el grup de IC d'etiologia no isquèmica. | 82 |
| Taula 4. Quocient de risc amb interval de confiança del 95% per als esdeveniments clínics associats amb Glic-A i Glic-B en el grup de IC d'etiologia no isquèmica amb valors de ST2 disponibles..... | 83 |
| Taula 5. Rendiment dels models per a l'esdeveniment combinat en el subgrup d'IC d'etiologia no isquèmica. | 84 |
| Taula 6. Associació entre nivells de Glic-A i Glic-B amb el risc d'ingrés hospitalari recurrent per IC en el subgrup d'etiologia no isquèmica..... | 85 |
| Taula 7. Quocient de risc amb interval de confiança del 95% per als esdeveniments clínics associats amb Glic-A i Glic-B en el grup de IC d'etiologia isquèmica. | 86 |
| Taula 8. Associació entre nivells de Glic-A i Glic-B amb el risc d'ingrés hospitalari recurrent per IC en el subgrup d'etiologia isquèmica..... | 87 |

ÍNDIX GENERAL

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUM | 17 |
| SUMMARY | 21 |
| 1. INTRODUCCIÓ | 23 |
| 1.1. EPIDEMIOLOGIA DE LA INSUFICIÈNCIA CARDÍACA..... | 23 |
| 1.2. ESTAT ACTUAL DEL COLESTEROL EN LA INSUFICIÈNCIA CARDÍACA | 26 |
| 1.2.1. <i>Colesterol total i colesterol LDL en IC. La paradoxa del colesterol ...</i> | <i>26</i> |
| 1.2.2. <i>Colesterol HDL en IC</i> | <i>27</i> |
| 1.2.3. <i>Estudi de les partícules HDL en IC</i> | <i>27</i> |
| 1.3. ANÀLISI MOLECULAR AVANÇAT PER ESPECTROSCÒPIA DE RESSONÀNCIA NUCLEAR MAGNÈTICA D'HIDROGEN..... | 31 |
| 1.3.1. <i>Especificacions tècniques de l'espectroscòpia de RMN-H¹</i> | <i>31</i> |
| 1.3.2. <i>Senyal espectroscòpica i anàlisi del perfil lipoproteic per espectroscòpia de RMN-H¹</i> | <i>32</i> |
| 1.3.3. <i>Anàlisi molecular avançat del perfil de glicoproteïnes plasmàtiques associades a la inflamació mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹</i> | <i>36</i> |
| 1.4. INFLAMACIÓ EN LA INSUFICIÈNCIA CARDÍACA | 38 |
| 2. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI | 43 |
| 3. HIPÒTESI | 47 |
| 3.1. HIPÒTESI D'ESTUDI | 47 |
| 4. OBJECTIUS | 49 |
| 4.1. OBJECTIU PRINCIPAL | 49 |
| 4.2. OBJECTIU SECUNDARI | 49 |
| 5. COMPENDI DE PUBLICACIONS | 51 |
| 5.1. INTRODUCCIÓ..... | 51 |
| 5.2. PRIMER ARTICLE..... | 51 |

| | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.3. | SEGON ARTICLE..... | 63 |
| 6. | RESUM GLOBAL DELS RESULTATS..... | 75 |
| 6.1. | DIFERÈNCIES I UTILITAT PRONÒSTICA DE L'ESTUDI DEL PERFIL LIPOPROTEIC AVANÇANT PER ESPECTROSCÒPIA DE RMN-H ¹ EN LA IC CRÒNICA..... | 75 |
| 6.2. | UTILITAT PRONÒSTICA DE L'ESTUDI DE L'ESTAT INFLAMATORI SISTÈMIC PER ESPECTROSCÒPIA DE RMN-H ¹ EN LA IC CRÒNICA..... | 79 |
| 6.2.1. | <i>Resum dels resultats de l'anàlisi de l'estat inflamatori en el subgrup d'etiologia no isquèmica.....</i> | <i>81</i> |
| 6.2.2. | <i>Resum dels resultat de l'anàlisi de l'estat inflamatori en el subgrup d'etiologia isquèmica.....</i> | <i>86</i> |
| 7. | RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ DELS RESULTATS OBTINGUTS..... | 89 |
| 7.1. | DIFERÈNCIES I UTILITAT PRONÒSTICA DE L'ESTUDI DEL PERFIL LIPOPROTEIC AVANÇANT PER ESPECTROSCÒPIA DE RMN-H ¹ EN LA IC CRÒNICA..... | 89 |
| 7.2. | UTILITAT PRONÒSTICA DE L'ESTUDI DE L'ESTAT INFLAMATORI SISTÈMIC PER ESPECTROSCÒPIA DE RMN-H ¹ EN LA IC CRÒNICA..... | 95 |
| 7.3. | LIMITACIONS..... | 99 |
| 8. | CONCLUSIONS..... | 101 |
| 9. | LÍNIES DE FUTUR..... | 103 |
| 10. | BIBLIOGRAFIA..... | 105 |
| 11. | ANNEXES..... | 119 |
| 11.1. | MATERIAL SUPLEMENTARI PRIMER ARTICLE..... | 119 |
| 11.2. | MATERIAL SUPLEMENTARI SEGON ARTICLE..... | 124 |
| 11.3. | TERCER ARTICLE..... | 127 |
| 11.4. | MATERIAL SUPLEMENTARI TERCER ARTICLE..... | 137 |

RESUM

Malgrat els avenços terapèutics de les darreres dècades, la malaltia cardiovascular (CV) segueix essent la principal causa de morbiditat i mortalitat en països desenvolupats. En particular, en el camp de la insuficiència cardíaca (IC), la incidència i prevalença de la mateixa estan incrementant anualment. Des del primer contacte mèdic, es requereix d'una bona estratificació pronòstica de cara a saber quins malalts es beneficiaran millor de teràpies específiques o de seguiments clínics més estrets. En aquest context, els biomarcadors han esdevingut una eina important de cara al seguiment clínic de malalts, essent incorporats en diversos models predictius d'esdeveniments futurs. De totes maneres, tot i la recerca creixent en aquest camp, segueix existint un alt percentatge de malalts que presenten una evolució clínica desfavorable. Aquest fet ha propiciat innovació en la cerca de nous biomarcadors que permetin una millor estratificació pronòstica en la malaltia CV. S'ha realitzat un gran avenç en l'estudi molecular avançat mitjançant espectroscòpia per ressonància nuclear magnètica d'hidrogen (RMN- H^1) per l'estudi de complexos moleculars com les lipoproteïnes i les glicoproteïnes plasmàtiques en el camp de la malaltia CV arterioscleròtica i en la valoració de l'estat infamatori en la síndrome metabòlica i altres escenaris com la diabetis, el càncer o els processos inflamatoris crònics, però tot just s'està començant en el context de la IC.

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral és estudiar el valor afegit que poden aportar diferents nous biomarcadors derivats de l'anàlisi molecular avançat mitjançant espectroscòpia de RMN- H^1 en la població amb IC. A partir d'una cohort prospectiva de pacients afectes d'IC crònica seguits en un hospital de

tercer nivell, s'estudia les alteracions existents en el perfil lipoproteic i es comparen amb els valors obtinguts d'una població aparellada sense IC. En segon lloc, s'estudia l'associació entre les alteracions observades amb la mortalitat CV en la cohort amb IC. Finalment, la darrera part del treball es centra en la valoració de l'estat inflamatori associat al perfil de proteïnes glicosilades estudiat mitjançant la tècnica d'espectroscòpia de RMN-H¹ en la cohort d'IC i la seva correlació amb els esdeveniments clínics a llarg termini.

Els resultats obtinguts mostren que, en els pacients afectes d'IC crònica, existeixen clares diferències en el perfil lipoproteic estudiat mitjançant d'espectroscòpia de RMN-H¹ quan comparats amb subjectes sense IC. Les diferències principals es centren en les lipoproteïnes de baixa densitat (*low density lipoproteins*, LDL) i, sobretot, en les d'alta densitat (*high density lipoprotein*, HDL), on trobem que la mida mitjana de les mateixes es troba augmentada, principalment a expenses d'una pèrdua del component de mida més petita, i que, globalment, es troben més carregades de colesterol. A més, hem observat que aquestes diferències s'accentuen com més evolucionat està el procés d'IC i que són predictors independents per a mortalitat CV en la cohort amb IC, fins i tot en models ajustats per múltiples factors de risc i biomarcadors coneguts en aquest camp. Finalment, hem descrit l'estat inflamatori en la cohort amb IC mitjançant la concentració sèrica de glicoproteïna (Glic) A i B derivats de l'anàlisi per espectroscòpia de RMN-H¹, i hem observat associació entre la concentració de les mateixes amb l'esdeveniment combinat de mortalitat o ingrés per IC a llarg termini en el subgrup de pacients amb IC d'etiologia no isquèmica.

En resum, en la IC crònica existeixen clares alteracions moleculars que poden ser detectades mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹. En particular, i de forma independent a altres factors de risc i biomarcadors coneguts en l'escenari de la IC, les alteracions detectades mitjançant aquest mètode en

les partícules HDL es correlacionen amb la mortalitat CV i els ingressos per IC en la cohort global, i les concentracions de Glic amb la mortalitat o ingrés per IC en el subgrup d'IC de causa no isquèmica. Les alteracions descrites poden aportar valor afegit en el control clínic i seguiment dels pacients amb IC crònica. No obstant, abans de la seva translació a la pràctica clínica diària, encara és necessària més recerca en aquest camp per establir punts de tall consistents i validació en estudis aleatoritzats per a que puguin ser usats com a guia en les decisions terapèutiques.

SUMMARY

Despite therapeutic advances in recent decades, cardiovascular (CV) disease remains the leading cause of morbidity and mortality in developed countries. In particular, in the field of heart failure (HF), its incidence and prevalence is increasing year after year. From the first medical contact, a good prognostic stratification is required in order to know which patients will benefit best from specific therapies or closer clinical follow-up. In this context, biomarkers have become an important tool for the clinical follow-up of patients, being incorporated into various predictive models of future events. However, despite the growing research in this field, there is still a high percentage of patients with an unfavorable clinical course. This fact has led to innovation in the search for new biomarkers that allow a better prognostic stratification in CV disease. Much progress has been made in the advanced molecular analysis by hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H-MRS}$) for the study of lipoproteins in the field of atherosclerotic CV disease and in the assessment of the inflammatory state in metabolic syndrome and other scenarios such as diabetes mellitus, cancer or chronic inflammatory processes, but the study of advanced molecular analysis by $^1\text{H-MRS}$ in context of HF is just beginning.

The aim of this doctoral thesis is to study the added value that different new biomarkers derived from the advanced molecular analysis by $^1\text{H-MRS}$ can provide to the population with HF. From a prospective cohort of patients with chronic HF followed up in a tertiary hospital, the existing alterations in the lipoprotein profile are studied and compared with the values obtained from a matched population without HF. Second, the correlation between the observed alterations in the lipoprotein profile with CV mortality is studied in

the HF cohort. Finally, the last part of the work focuses on the assessment of the inflammatory state using 1H-MRS and its correlation with long-term clinical events.

The results obtained show that, in patients with chronic HF, there are clear differences in the lipoprotein profile studied by 1H-MRS compared to subjects without HF. The main differences focus on low-density lipoproteins and, above all, on high-density lipoproteins (HDL), where we find that their overall size is high, mainly at expense of a loss of the small component, and that, overall, they are overloaded of cholesterol. In addition, we observed that these differences are accentuated as the HF process evolves, and that they are independent predictors for CV mortality in the cohort with HF, even in models adjusted for multiple risk factors and known biomarkers in this field. Finally, we described the inflammatory state in the HF cohort by detecting glycoprotein (Glyc) A and B levels derived from 1H-MRS analysis, and observed a correlation of both levels with the composite end-point of mortality or HF readmission in the non-ischemic subgroup of patients.

In summary, in chronic HF, there are clear molecular alterations that can be detected by 1H-MRS. In particular, and independently of other known risk factors and biomarkers in the HF scenario, alterations detected by this method in HDL particles correlate with CV mortality and HF readmissions in the global cohort, and levels of Glyc correlate with total death or HF readmissions in the non-ischemic HF subgroup of patients. The alterations described may provide added value in the clinical control and follow-up of patients with chronic HF. However, prior to their translation into daily clinical practice, further research in this field is still needed to establish consistent cut-off values and validation in randomized studies to guide therapeutic decisions.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Epidemiologia de la insuficiència cardíaca

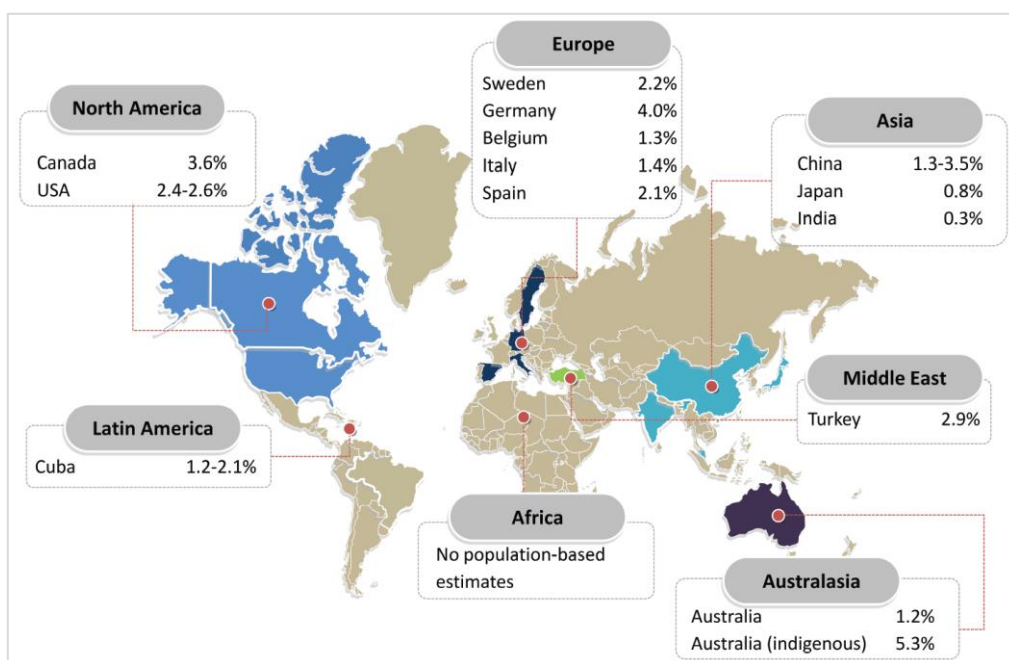
La malaltia cardiovascular (CV) es la principal causa de morbiditat i mortalitat en els països desenvolupats (1). L'Institut Nacional d'Estadística descriu a les malalties cardiovasculars com a la primera causa de mort a Espanya l'any 2019, representant un 27.9% de les morts totals nacionals, damunt de les neoplàsies i càncers (Taula 1) (2).

Taula 1. Causes de Mort a Espanya any 2019. Font: Institut Nacional d'Estadística (INE).

| Taula 1. Causes de mort a Espanya any 2019 | | | |
|--------------------------------------------|-----------------------------|--------|-------------|
| | Causa | Número | Percentatge |
| 1 | Malalties Cardiovasculars | 116615 | 27,9 |
| 2 | Tumors | 113059 | 27,0 |
| 3 | Sistema Respiratori | 47681 | 11,4 |
| 4 | Sistema Nerviós | 26120 | 6,2 |
| 5 | Malalties Mentals | 22896 | 5,5 |
| 6 | Sistema Digestiu | 22038 | 5,3 |
| 7 | Causes externes | 16141 | 3,9 |
| 8 | Sistema Genitourinari | 14123 | 3,4 |
| 9 | Malalties Endocrinològiques | 13351 | 3,2 |
| 10 | Altres | 10206 | 2,4 |
| 11 | Malalties Infeccioses | 6119 | 1,5 |
| 12 | Sistema Osteomuscular | 5162 | 1,2 |
| 13 | Malalties Hematològiques | 2012 | 0,5 |
| 14 | Malalties de la Pell | 1775 | 0,4 |
| 15 | Congènites | 815 | 0,2 |
| 16 | Perinatals | 584 | 0,1 |
| 17 | Embaràs, part i puerperi | 6 | 0,0 |
| | Total | 418703 | 100,0 |

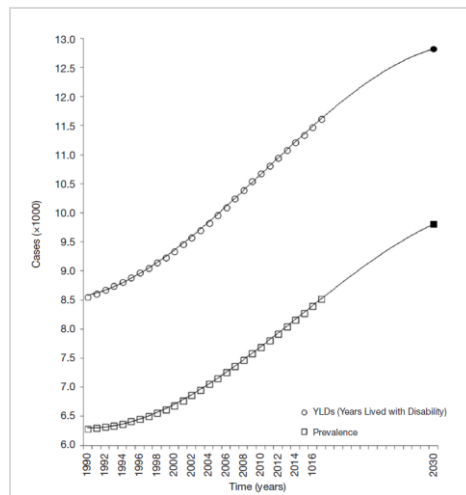
Dins de les malalties cardiovasculars, la incidència i prevalença de la insuficiència cardíaca (IC) està esdevenint una de les principals causes de morbiditat i mortalitat global, amb una gran repercussió a nivell individual, social i econòmic. En el moment actual, s'estima que prop de 64,3 milions de persones estan afectes d'IC a nivell mundial. Els registres nacionals de diferents països estimen que aproximadament entre 1-5% de la població general adulta dels països desenvolupats pateixen d'IC (Figura 1) (3). A més, en algunes regions, s'estima que la prevalença de pacients amb IC pot incrementar en més del 50% al 2030 (Figura 2) (4).

Figura 1. Prevalença d'IC en els estudis poblacions a nivell mundial, per regions.



Adaptat de Groenewegen et al. (3), amb permís.

Figura 2. Evolució dels últims 28 anys i escenari actual de l'epidemiologia en IC



Adaptat de Lippi et al. (4), amb permís.

En aquest sentit, la IC es preveu com una de les principals causes de sobrecàrrega econòmica i sanitària a nivell mundial per als pròxims anys (5,6). A més, tot i els grans avenços en el diagnòstic i tractament de la IC en les últimes dècades, amb una important milloria de la supervivència per IC a 5 anys, la mortalitat global segueix essent massa elevada, superant a la majoria dels càncers coneguts (7,8). A nivell Europeu, el registre ESC-HF-LT (European Society of Cardiology Heart Failure Long Term Registry) descriu que la població amb IC presenta, encara avui en dia, un risc de 8% de mortalitat anual i un risc de 10-16% d'ingrés per IC a l'any (9).

Per aquest motiu, l'estudi de la fisiopatologia de la malaltia, així com la investigació per a trobar nous marcadors per al seu diagnòstic i estratificació pronòstica, és de vital importància. En aquest sentit, s'està treballant en l'estudi de nous biomarcadors derivats de l'anàlisi molecular avançat que reflecteixin diferents vies fisiopatològiques de la malaltia per ajudar a una millor estratificació pronòstica. Entre ells, semblen d'interès els derivats de l'estudi avançat del perfil lipoproteic i l'estudi de la inflamació sistèmica.

1.2. Estat actual del colesterol en la insuficiència cardíaca

A diferència de la malaltia cardiovascular arterioscleròtica, on les guies de pràctica clínica estableixen quins han de ser els objectius per a les concentracions de colesterol associat a lipoproteïnes de baixa densitat (*low density lipoprotein*, LDL) (C-LDL) de cara a evitar futurs esdeveniments cardiovasculars (10–14), en el camp de la IC, hi ha hagut resultats contradictoris respecte el valor pronòstic de la concentració de colesterol en malalts amb IC, els nivells de colesterol objectiu en aquesta població i la teràpia hipolipemiant a seguir.

1.2.1. Colesterol total i colesterol LDL en IC. La paradoxa del colesterol

Tot i que Bielecka-Dabrowa et al. van publicar l'any 2019 una metanàlisi on apuntava que el tractament amb estatines en la població amb IC s'associava a una reducció d'esdeveniments cardiovasculars futurs, independentment dels nivells de funció ventricular i de l'etiologia de la IC (15), els estudis aleatoritzats amb estatines dirigits a avaluar el seu efecte sobre la mortalitat cardiovascular en pacients amb IC (GISSI-HF, CORONA i UNIVERSE trials) han resultat negatius (16–18). De fet, a diferència del que s'observa en la patologia cardiovascular arterioscleròtica, nivells baixos de colesterol total i C-LDL s'ha associat a pitjor pronòstic en IC, un factor conegut com la paradoxa del colesterol (19–21). Sakatani et al. varen observar que aquest comportament semblava associar-se sobretot en el grup d'IC de causa no isquèmica (21). Sembla plausible que, estats més avançats d'IC on els pacients evolucionen a cert grau de desnutrició i caquèxia, s'associïn a concentracions de colesterol més baixes i a pitjor pronòstic global. Com a conseqüència dels resultats d'aquests estudis, en el moment actual les guies de pràctica clínica no recomanen el tractament amb hipolipemiants de forma

sistemàtica en els pacients amb IC, excepte en el grup d'etiologia isquèmica, on s'accepta extrapolar les indicacions recomanades per a la malaltia arterioscleròtica (22).

1.2.2. Colesterol HDL en IC

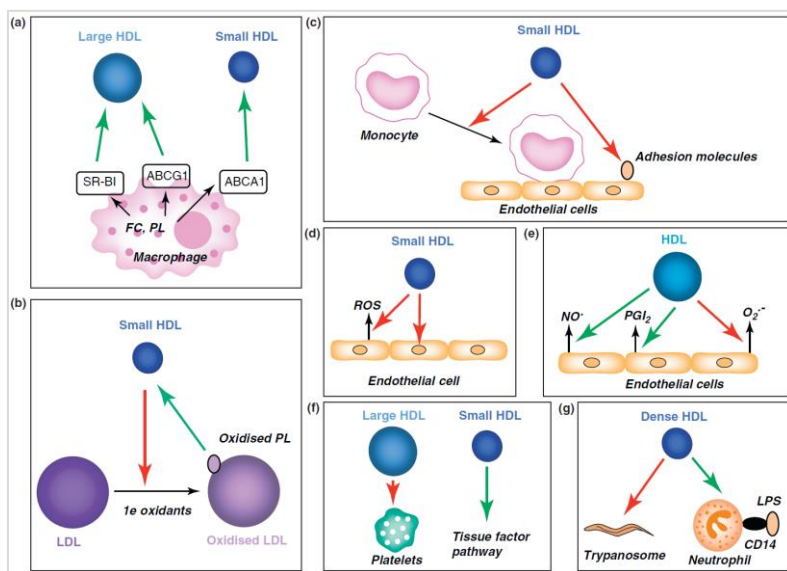
En relació a les concentracions de colesterol HDL (C-HDL) en IC s'ha descrit que, globalment, són un bon predictor per la incidència d'IC. L'estudi Framingham Heart Study va demostrar que concentracions baixes de C-HDL s'associaven a un major risc d'incidència d'IC (HR 0.77; $p < 0.001$) en una població de 6860 participants sense patologia cardiovascular prèvia seguida a 26 anys, fins i tot ajustat per la presència d'infart de miocardi o altres covariables clíniques (23). A més, concentracions baixes de C-HDL i apo A-I, la principal apolipoproteïna de les HDL, s'ha associat a un pronòstic desfavorable en pacients amb IC independentment de la seva etiologia (24). De totes formes, els estudis dirigits a millorar les concentracions de C-HDL amb niacina o esters de colesterol no han observat milloria del risc d'esdeveniments cardiovasculars en el seguiment (25,26).

1.2.3. Estudi de les partícules HDL en IC

Per aquestes raons, en les últimes dècades ha sorgit l'interès en aprofundir en l'anàlisi molecular avançat que ens ajudi a estratificar millor els malalts amb patologia cardiovascular, més enllà de les concentracions de colesterol total, C-HDL o C-LDL. La majoria de treballs s'han centrat en l'estudi de la concentració de partícules (P) HDL (P-HDL) ja que aquestes, més enllà de ser meres transportadores de colesterol, tenen una composició complexa i grans interaccions amb l'endoteli vascular. El contingut de colesterol en les partícules HDL no necessàriament informa de la funció de les partícules HDL. De fet, cada partícula HDL pot ser dividida en varies subpoblacions (petita, mitjana i gran) i cada una d'elles té un paper destacat en diferents processos

fisiopatològics. Així, l'HDL participa en processos de transport de colesterol, però també en processos antioxidatius, antiinflamatoris, cito-protectors, vasodilatadors, antitrombòtics i fins i tot en la modulació de processos infecciosos (Figura 3) (27–30).

Figura 3. Principals activitats biològiques de les lipoproteïnes HDL

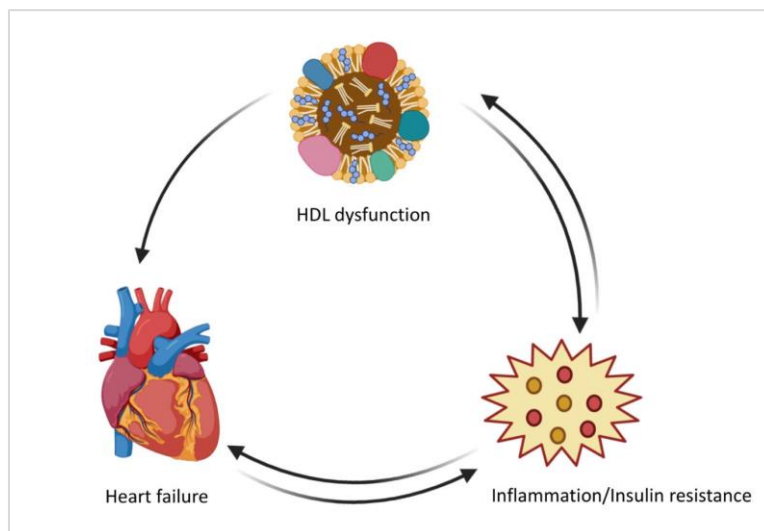


Principals activitats biològiques de les lipoproteïnes HDL. a) transport de colesterol; b) activitat anti-oxidativa; c) activitat anti-inflamatòria; d) activitat protectora cel·lular; e) activitat vasodilatadora; f) activitat anti-trombòtica; g) activitat anti-infecciosa. Adaptat de Camont et al. (27), amb permís.

Per aquest motiu, s'ha postulat que l'estudi de la qualitat de les partícules HDL, més que la quantitat de C-HDL, pot ser un factor determinant per estratificar el risc de futurs esdeveniments cardiovasculars. En l'esfera de la malaltia arterioscleròtica, existeix abundant literatura demostrant el millor paper pronòstic de les HDL amb els esdeveniments cardiovasculars, en comparació a les concentracions de colesterol, triglicèrids, C-LDL o C-HDL (31,32,41,33–40). En l'esfera de la IC, l'evidència científica és encara escassa. La disfunció de les HDL sembla influir tant en l'inici com en la progressió de la

IC. Aquesta hipòtesi es basa en l'estreta relació que existeix entre la inflamació, la resistència a la insulina i la IC. En ambdós processos fisiopatològics es pot originar tant una variació en el nombre de partícules de les subfraccions d'HDL, com una disfunció global de les HDL. Així doncs, pot ser que existeixi una causalitat cíclica entre la disfunció de les partícules HDL i la IC (Figura 4) (29).

Figura 4. Hipòtesi de causalitat circular en la disfunció de les partícules HDL en relació a la inflamació i la resistència a la insulina en el context de la IC



Adaptat de Mishra et al. (29), amb permís.

En aquest sentit, Schrutka et al. varen observar que la reducció en la capacitat oxidativa de les HDL s'associava a un increment de l'esdeveniment clínic combinat de mortalitat cardiovascular o necessitat de trasplantament cardíac a 2.8 anys de seguiment, en una cohort de malalts amb IC crònica (42). Chirinos et al. varen observar que els nivells de apo M, que facilita la interacció física entre les HDL i l'esfingosina-1-fostat i que s'ha demostrat que té efectes cardioprotectors i antiinflamatoris en models animals, estaven inversament relacionats amb l'esdeveniment combinat de mort cardiovascular, necessitat de dispositiu d'assistència ventricular o necessitat

de trasplantament cardíac en una subpoblació de l'estudi Penn-HF-Study (43). Emmens et al. han demostrat que existeix una reducció en la capacitat antiinflamatòria i de transport de colesterol de les HDL en pacients en IC crònica seguits a 9 mesos, amb una relació inversa entre la capacitat de transport de colesterol i la mortalitat cardiovascular (44). A més, estudis experimentals recents realitzats en ratolins mostren que els tractament amb HDL recombinants poden prevenir l'aparició o revertir la presència d'IC, mentre que HDL disfuncionants poden empitjorar el procés d'IC (45–48). Tot i que encara no disposem d'estudis de teràpia amb HDL en IC en humans, l'evidència científica torna a posar de manifest la importància de la HDL en IC. De totes maneres, l'estudi de l'activitat oxidativa i antiinflamatòria de les HDL és complexa i costosa (44).

Per aquests motius, alguns grups estant centrant esforços en l'estudi directe de la heterogeneïtat de les HDL en la pràctica clínica, incloent les diferències en la seva composició lipídica, mida, forma i càrrega. En el moment actual, es disposa encara de poca evidència científica en aquest sentit en el camp de la IC. El grup de Zagreb liderat per Potočnjak i Degoricija ha publicat que les concentracions sèriques de partícules HDL i de la seva subfracció més densa i de mida més petita (HDL petites), presenten una correlació inversa i significativa amb la mortalitat a 3 mesos per qualsevol causa en una cohort limitada de 152 pacients seleccionats ingressats per IC aguda (49,50). El grup de la Universitat de Duke, liderat per Hunter, observen diferències en la concentració de les subfraccions de HDL petites, mitjanes i grans, concentració total de partícules i mida mitjana de les P-HDL entre els grups d'IC amb fracció d'ejecció deprimida, IC amb fracció d'ejecció preservada i pacients sense IC. Aquests grups s'extrauen d'una cohort de 6528 pacients provinents d'un registre seleccionat de pacients derivats a un laboratori d'hemodinàmica per a la realització d'un cateterisme cardíac (51). Hunter et

al. observen que els pacients amb IC presenten una menor concentració de P-HDL totals, menor concentració de partícules HDL petites i que, globalment, les HDL son de mida més gran en els pacients amb IC respecte als que no presenten IC. A més, aquestes diferències s'accentuen en els grup d'IC amb fracció d'ejecció deprimida quan es compara amb el grup d'IC amb fracció d'ejecció preservada. Finalment, correlacionen aquestes diferències amb el risc de mortalitat per qualsevol causa o risc de presentar l'esdeveniment clínic combinat de mort, infart de miocardi o necessitat de revascularització coronària en el seguiment a 30 dies.

Per tant, existeix evidència que apunta que l'estudi avançat de les HDL pot ser rellevant també en el camp de la IC, tot i que els resultats d'aquests grups cal interpretar-los amb cautela, ja que es deriven de cohorts de pacients molt seleccionats. En aquest sentit, no existeix evidència de l'estudi de les alteracions del perfil lipoproteic global, i de les HDL en particular, en una població no seleccionada de pacients amb IC crònica.

1.3. Anàlisi molecular avançat per espectroscòpia de ressonància nuclear magnètica d'hidrogen

L'estudi de les lipoproteïnes s'ha realitzat per diferents mètodes. Inicialment es basaven en assaigs d'homogeneïtat basats en detergents, microscòpia de transmissió electrònica, electroforesi o test de cromatografia (52). En les dos últimes dècades, la tecnologia d'espectroscòpia per RMN- H^1 s'ha anat imposat en l'estudi del perfil lipoproteic avançat (53–56).

1.3.1. Especificacions tècniques de l'espectroscòpia de RMN- H^1

Petites mostres de sèrum (100-200 μ l) són introduïdes en un equip de ressonància nuclear magnètica d'altres prestacions i alt camp magnètic, habitualment de més de 10 Tesla (Figura 5). De forma resumida, quan un

teixit se sotmet a un camp magnètic, les seves molècules comencen a rotar a una freqüència concreta directament proporcional a la intensitat del camp magnètic a les què estan sotmeses. De tota manera les molècules ressonen a freqüències lleugerament diferents depenent de la mida i característiques de les mateixes. Així, a partir de tècniques automatitzades de post-procés on s'apliquen petites variacions dels camps magnètics amb diferents gradients, és possible diferenciar els diferents metabòlits existents en la mostra a estudi.

Figura 5. Equip d'espectroscòpia per ressonància nuclear magnètica



Equip d'espectroscòpia per ressonància nuclear magnètica d'altres prestacions de 14.1 Tesla. Imatge cedida per l'Institut de Química Orgànica i Bioquímica de Praga.

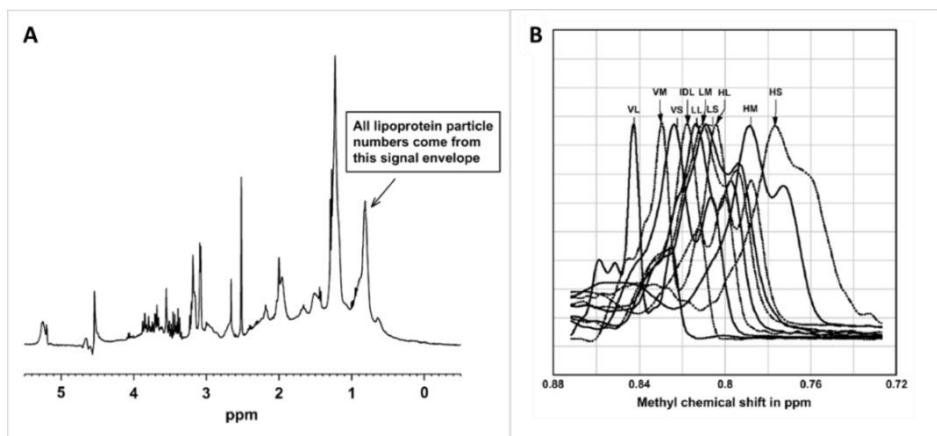
1.3.2. Senyal espectroscòpica i anàlisi del perfil lipoproteic per espectroscòpia de RMN-H¹

Com les molècules a estudi rotaran a una freqüència diferent depenent de la intensitat del camp magnètic a les que estaran sotmeses, per a poder determinar cada molècula, no s'analiza la velocitat de rotació en si, sinó que s'analarà la seva rotació com a un percentatge respecte a una referència

estàndard coneguda. Es tracta del concepte de parts per milió (ppm). Això permetrà que les corbes d'espectroscòpia obtingudes siguin comparables entre diferents equips, i tothom pugui analitzar el mateix sector de l'espectre per la valoració dels mateixos metabòlits ja que, independentment de la intensitat del camp magnètic usat, la zona de la corba de l'espectroscòpia que ocuparà aquell metabòlit en ppm serà sempre la mateixa.

Un cop la mostra de plasma se situï dins de la ressonància magnètica i se li apliqui radiació electromagnètica en forma de polsos de radiofreqüència, haurem excitat els seus protons. Al relaxar-se per tornar al seu punt d'equilibri, retornaran senyal electromagnètica que donarà informació respecte a la intensitat de senyal per temps. Com hem comentat, depenent de la característica de cada molècula, aquesta serà diferent. La desconvolució matemàtica d'aquesta senyal produirà un espectre de senyal d'intensitat respecte a la freqüència de referència, en ppm (57). Així, haurem obtingut un registre d'espectroscòpia, corresponent a les múltiples senyals generades pels metabòlits constituents d'aquella mostra. Cada grup de metabòlits generarà una part específica d'aquest espectre en funció de les seves característiques. Per a l'estudi de les lipoproteïnes, el sector de l'espectre a estudiar compren una petita franja situada entre 1.3 i 0.7 ppm (Figura 6A). Aquest procés inicial d'obtenció de l'espectre d'una mostra dura menys d'un minut, i com veurem més endavant, permetrà no només l'estudi de les lipoproteïnes, sinó també d'altres metabòlits o molècules que poden estar en relació amb els processos fisiopatològic o pronòstic de la IC.

Figura 6. Espectre de senyal inicial obtingut d'una mostra de plasma per espectroscòpia en un equip de RMN-H¹

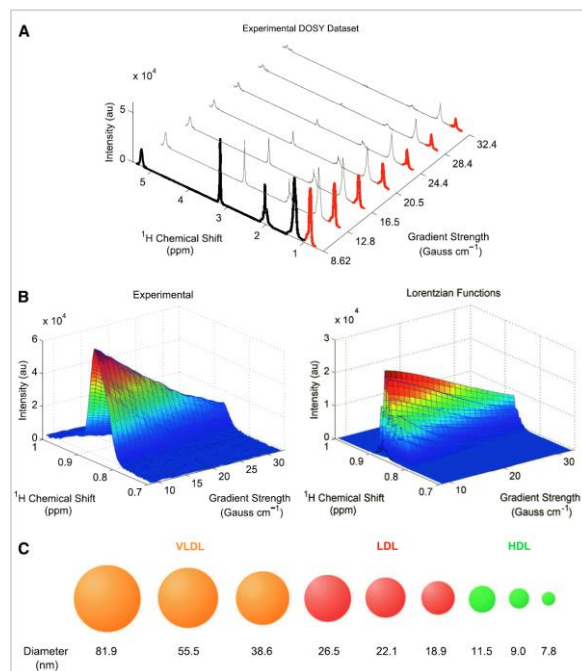


Espectre de senyal inicial obtingut d'una mostra de plasma per espectroscòpia en un equip de RMN-H¹ (A). Desconvolució de la senyal a nivell del pic d'estudi de les lipoproteïnes per separar els pics de les lipoproteïnes i subclasses (LipoProfile® test) (B). Adaptat de Jeyarajah et al. (54), amb permís.

La diferenciació de les diferents lipoproteïnes (VLDL, LDL i HDL) i les seves subfraccions dins de l'espectre de RMN-H¹ es fa a partir de la descomposició de la senyal generada pels grups metil dels lípids que transporten, per un procés de desconvolució amb un conjunt de funcions analítiques associades als lípids constituents de cada subfracció, que ressonen a freqüències lleugerament diferents en funció de les característiques de les lipoproteïnes que els transporten. La senyal obtinguda es compara amb una llibreria d'espectres de les subfraccions aïllades coneguda, i així s'obté la concentració per a cada lipoproteïna i subfracció (petita, mitjana i gran) (Figura 6B) (54). Aquest mètode, tot i estar validat i testat en múltiples estudis, té un petit inconvenient, i és que el gran solapament de senyals obtinguts de la desconvolució de la senyal espectroscòpica dificulta la separació entre les diferents lipoproteïnes i subclasses, com es pot veure en la figura 6B. Per aquest motiu, la diferenciació de les lipoproteïnes i subclasses usant espectroscòpia de RMN-H¹ ha evolucionat cap a l'aplicació d'un segon gradient magnètic sobre la senyal de l'espectre inicial, mètode

conegut com a espectroscòpia ordenada per difusió bidimensional (Figura 7). D'igual manera que en el primer mètode, s'obté un primer espectre de senyal de metabòlits. Posteriorment, s'aplica un gradient magnètic que aconseguix separar els pics de les diferents lipoproteïnes gràcies a la diferent velocitat de precessió que tindran en funció de les característiques moleculars de cada una d'elles. Així, les lipoproteïnes més petites tenen una freqüència de rotació més baixa que les més grans. Els pics obtinguts en l'eix Z del gràfic (Figura 7A, en vermell) es correlacionaran amb la mida de partícula coneguda per a saber la concentració de cada una d'elles en aquella mostra específica (56).

Figura 7. Perfil lipoproteic basat en espectroscòpia ordenada per difusió bidimensional



Resum gràfic de la tècnica d'estudi del perfil lipoproteic basat en espectroscòpia ordenada per difusió bidimensional (Liposcale®). Obtenció del perfil lipoproteic amb subclasses petites, mitjanes i grans per a cada subgrup de lipoproteïna (VLDL, LDL i HDL). Adaptat de Mallol et al (56), amb permís.

L'anàlisi del perfil lipoproteic avançat mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹ està validat científicament i s'ha usat en centenars d'estudis previs, aportant valor pronòstic afegit als factors de risc cardiovasculars clàssics tant en l'esfera de les malalties cardiovasculars arterioscleròtiques (infart, malaltia coronària, arteriosclerosi, ictus...) com en la diabetis o la síndrome metabòlica (31–33,36,40,41,57,58). Amb la seva aplicació, és possible quantificar i caracteritzar les lipoproteïnes circulants (HDL, LDL o VLDL), les seves subfraccions (petites, mitjanes i grans), analitzar la seva mida i caracteritzar el contingut en colesterol de les mateixes.

En el camp de la IC, l'estudi lipoproteic avançat per espectroscòpia de RMN-H¹ ha estat usat només per Hunter et al. i per Potočnjak et al., en una cohort de malalts derivats a cateterisme cardíac i en una petita cohort d'IC aguda, respectivament (50,51). No existeix evidència científica respecte a l'alteració del perfil lipoproteic avançat mesurat per espectroscòpia de RMN-H¹ en pacients no seleccionats amb IC crònica.

1.3.3. Anàlisi molecular avançat del perfil de glicoproteïnes plasmàtiques associades a la inflamació mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹

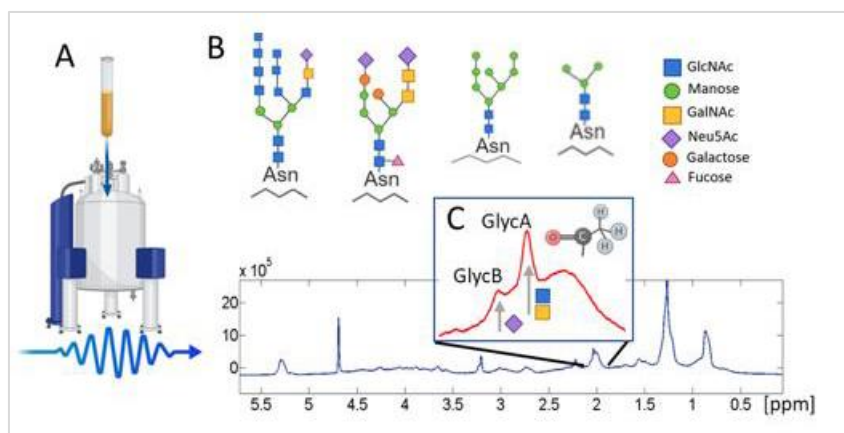
Un dels avantatges dels mètodes d'anàlisi per espectroscòpia de RMN-H¹, a part de la seva rapidesa, és que de la mateixa mostra de plasma d'on s'extrau l'estudi del perfil lipoproteic avançat es poden extraure altres metabòlits o molècules. Com s'ha comentat prèviament, tota la informació que s'extrau s'obté a base de l'anàlisi no destructiva d'un biofluid a partir de l'estudi de la resposta molecular a un camp magnètic extern, sense haver d'aplicar reactants a la mostra. Això fa que la mostra resti inalterada per a la valoració d'altres metabòlits d'interès.

Uns dels metabòlits d'interès afegits a determinar per espectroscòpia de RMN-H¹, són els pics de glicoproteïna (Glic) A i B. A diferència del pic de

senyal associat als grups metil que s'usa per a caracteritzar les lipoproteïnes, els pics associats als grup acetils de Glic-A i Glic-B es situen a 2.15 i 1.9 ppm de la senyal espectroscòpica.

La concentració sèrica de les glicoproteïnes augmenta de forma paral·lela amb la inflamació. La espectroscòpia de RMN- H^1 té la capacitat de detectar els pics de senyal derivats dels grups N-acetilglucosamina i N-acetilgalactosamina (pic de Glic-A) i d'àcid N-acetilneuramínic o àcid siàlic (pic de Glic-B), terminals de glicosilació que apareixen en la majoria de les proteïnes inflammatòries del sèrum com la alfa-1-glicoproteïna, la alfa-1-antitripsina, alfa-1-antiquimotripsina, haptoglobina i la transferrina. Al detectar enllaços específics de glicosilació de les proteïnes, té l'avantatge d'estar estudiant diferents vies inflammatòries de forma conjunta en una única mesura (Figura 8) (59).

Figura 8. Anàlisi dels pics de l'espectre corresponents a Glic-A i Glic-B



Anàlisi dels pics de l'espectre corresponents a Glic-A i Glic-B, que tradueixen terminals de glicosilació de proteïnes amb grups N-acetilglucosamina i N-acetilgalactosamina (pic de Glic-A) i d'àcid N-acetilneuramínic o àcid siàlic (pic de Glic-B). Adaptat de Fuertes-Martín et al. (59), amb permís.

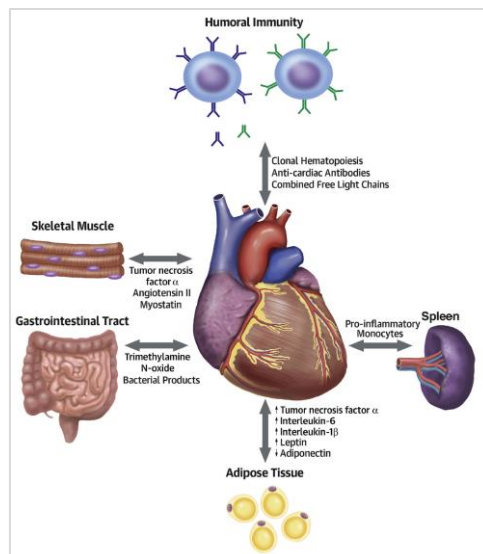
Existeix evidència sobre el valor pronòstic de l'estudi de l'estat inflamatori mitjançant el perfilat de la glicosilació per espectroscòpia de RMN-H¹ en malaltia no cardiovascular com els tumors i càncer, obesitat, diabetis, síndrome metabòlica, infecció per virus de la immunodeficiència humana, processos inflamatoris crònics sistèmics (artritis reumatoide, esclerosi sistèmica, psoriasi...) i vasculitis (59–63). En el camp de la malaltia cardiovascular, s'ha observat una forta relació entre la concentració sèrica de glicoproteïnes amb l'infart de miocardi, l'íctus o la hemorràgia intracranial, i la concentració de Glic-A amb la malaltia coronària i mortalitat per qualsevol causa en cohorts seleccionades de pacients (39,64,65). En el camp de la IC, només existeix evidència entre la concentració de Glic-A i la incidència d'IC. En l'article publicat per Jang et al., es segueixen a 6507 participants sense patologia cardiovascular o IC prèvia del registre Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), i s'avaluava l'aparició d'IC a llarg termini, amb una mitja de seguiment de 14 anys (66). Els pacients amb concentracions més altes de Glic-A tenien un risc més elevat de presentar IC en el seguiment, sobretot a expenses d'IC en el context de funció ventricular conservada. No existeix evidència, però, sobre l'alteració ni significació pronòstica de les Glic en el camp de la IC ja establerta.

1.4. Inflamació en la insuficiència cardíaca

La inflamació pot ser tant una causa com una conseqüència de la IC, però clarament juga un paper central en la patogènesi i progressió de la malaltia. La relació entre la IC i la inflamació és complexa, probablement bidireccional, i implica no només el cor, sinó tota una sèrie d'òrgans perifèrics i sistemes. L'estrès hemodinàmic generat per la IC provoca l'alliberament d'una sèrie de citocines pro-inflamatòries que perjudiquen l'estructura i la funció cardíaca i indueixen el catabolisme de l'esquelet muscular, mentre que la isquèmia de la mucosa intestinal generada per congestió i/o baixa perfusió tissular altera

la seva permeabilitat i permet la translocació d'endotoxines, components microbians i metabòlits a la circulació sistèmica que poden danyar el miòcit i agreugen el procés d'IC. Altres efectors clau de la inflamació inclouen components de la resposta immune innata i humoral i cèl·lules pro-inflamatòries i adipocines que sorgeixen de la melsa i del teixit adipós. Comorbiditats habitualment associades a la IC com la diabetis, obesitat o la insuficiència renal crònica generen un estat d'inflamació crònica lleu que perpetua aquest cercle fisiopatològic (67). L'activació del sistema immune, la inflamació endotelial i els mediadors inflamatoris provinents del tracte gastrointestinal, melsa i teixit adipós tenen efectes deleteris en l'estructura i funció cardíaca (Figura 9) (68). És ben conegut que la inflamació està estretament relacionada amb el remodelat ventricular esquerre (69,70), pot influir en el procés de fibrosi miocardiàc (71,72), i té un paper directe en la disfunció dels cardiomiòcits (29,73).

Figura 9. Afectació multiorgànica en IC



Afectació multiorgànica en IC. La relació entre la inflamació i la IC és complexa, probablement bidireccional, i afecta a múltiples òrgans i sistemes. Adaptat de Murphy et al. (68), amb permís.

Clàssicament, la recerca en IC ha estat dominada per l'estudi de l'activació del sistema neurohormonal i el sistema simpàtic. De totes formes, el bloqueig d'aquests sistemes ha demostrat, sobretot, milloria dels esdeveniments en pacients amb IC amb fracció d'ejecció reduïda, però no en IC amb fracció d'ejecció preservada. En canvi, ambdues poblacions d'IC (amb fracció d'ejecció deprimida i preservada) semblen tenir en comú una elevació de citoquines pro-inflamatòries en sèrum i esdeveniments clínics adversos, cosa que centra de nou el focus de l'estudi de la inflamació en IC (74). Diferents estudis en pacients i animals han demostrat que existeix una elevació de múltiples citoquines pro-inflamatòries com la interleukina 6 (IL-6), el factor de necrosi tumoral alfa (*tumor necrosis factor*, TNF- α) o la galectina 3 durant la progressió de la IC (75). Tot i que la inflamació juga un paper clau en el procés de la IC, el mecanisme d'activació de la mateixa sembla tenir un origen diferent. Per un costat, els pacients amb IC i funció ventricular reduïda, l'insult cardíac inicial, habitualment isquèmia, danya els miòcits, activant tota una cascada inflamatòria que acaba amb el dany miocardiàc irreversible i el remodelat ventricular. Per contra, en els pacients amb IC i funció ventricular conservada, es considera que existeix un estat pro-inflamatori crònic, derivat per la conjunció de les múltiples comorbiditats que típicament afecten a aquest tipus de pacients (hipertensió arterial, obesitat, diabetis...), que a més són típicament de major edat i amb una proporció més alta de sexe femení. L'estat pro-inflamatori general derivaria en una inflamació endotelial i a una reducció de la formació de l'òxid nítric.

De totes maneres, ambdós processos (IC amb fracció d'ejecció reduïda i preservada) acaben en un estat inflamatori general que, potencialment, pot ser un bon marcador de cara a la estratificació pronòstica en IC independentment de la causa de la mateixa, i que pugui servir com a potencial eina de seguiment i monitorització dels pacients amb IC.

En aquest sentit, l'estudi de la inflamació sistèmica mitjançant la detecció de concentracions elevades de proteïnes glicosilades associades a processos inflamatoris en sèrum podria ser d'utilitat. Com s'ha detallat en l'apartat 1.3.3, les glicoproteïnes són un conjunt de proteïnes que presenten un grups terminals de glicosilació conseqüència de la inflamació sistèmica. Així, la detecció de les Glic té l'avantatge teòric de permetre l'estudi de la inflamació sistèmica, mentre que altres marcadors d'inflamació com TNF- α , IL-6 o la proteïna C reactiva (PCR) poden estar elevades només en una de les vies inflamatòries. Com hem comentat prèviament, les Glic poden ser detectades i quantificades mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹. Comparat amb l'anàlisi de marcadors inflamatoris con la PCR, l'estudi de les Glic per espectroscòpia de RMN-H¹ presenta menor variabilitat intraindividual i major precisió analítica (59,76). De totes formes, fins al moment actual, no existeix literatura sobre el paper de l'estat inflamatori estudiat per espectroscòpia de RMN-H¹ en IC crònica ni l'evidència del seu valor pronòstic.

2. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI

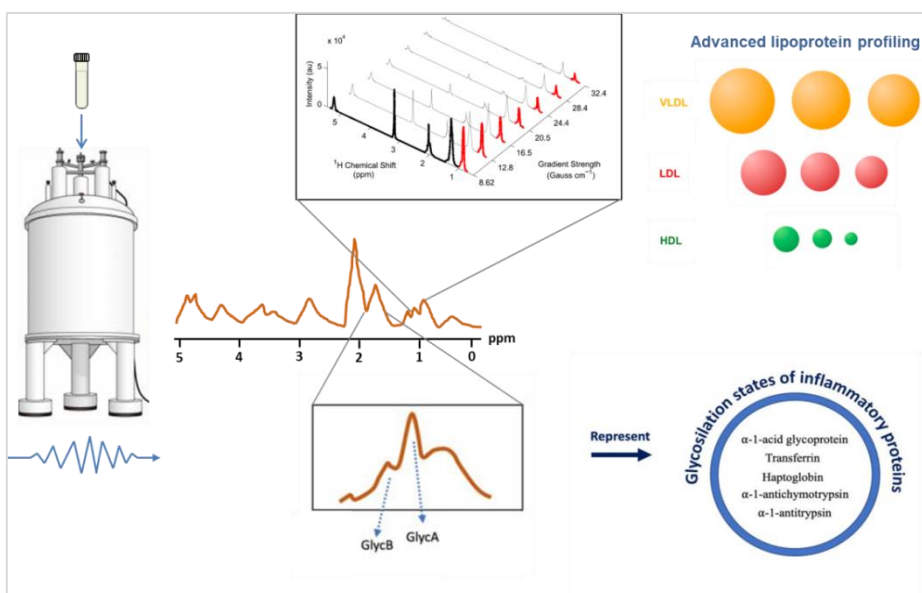
La justificació per realitzar aquesta tesi doctoral ve donada pel fet que es requereix d'una major comprensió dels diferents mecanismes fisiopatològics implicats en el desenvolupament i progressió de la IC, una malaltia amb una alta prevalença, amb una estimació clara d'increment dels casos en els pròxims anys, que és una causa de mortalitat encara gens menyspreable i amb una taxa de reingressos elevada, el que globalment suposa un cost individual i social molt elevat. Aprofundir en l'estudi de nous biomarcadors que reflecteixin diferents vies fisiopatològiques de la IC, permetria una correcta identificació i estratificació pronòstica dels pacients i, en un futur, l'estudi de possibles noves dianes terapèutiques.

L'estudi de nous biomarcadors a partir de tècniques avançades que permeten la caracterització de moltes molècules simultàniament es coneix com a anàlisi metabolòmica. Aquesta via constitueix un camp de recerca en expansió en la medicina cardiovascular, ja que permet la caracterització de xarxes metabòliques tant en condicions normals com patològiques i de manera quantitativa i qualitativa. Fent ús d'aquesta tecnologia, es considera possible l'estudi de les alteracions de les molècules implicades en els processos fisiopatològics de la IC. L'espectroscòpia de RMN- H^1 , juntament amb l'espectrometria de masses, és una de les dues plataformes principals per a l'estudi metabolòmic. L'espectroscòpia de RMN- H^1 permet la caracterització no només de molts metabòlits de diferents naturalesa, sinó també de complexos moleculars com són les lipoproteïnes i les glicoproteïnes sense necessitat de manipulació de la mostra. En aquest sentit, i tal com s'ha comentat en l'apartat introductori, l'estudi del perfil lipoproteic avançat i sobretot del component de les partícules HDL, així com

l'estat inflamatori sistèmic associat a la IC, sembla tenir una justificació fisiopatològica establerta.

La caracterització molecular avançada amb espectroscòpia de RMN-H¹ permet de forma ràpida, testada i en paral·lel, l'estudi del perfil lipoproteic avançat i també l'estudi de la inflamació sistèmica a partir de la detecció de patrons de glicosilació (Figura 10) en una única mostra de plasma.

Figura 10. Esquema de l'anàlisi molecular avançat mitjançant espectroscòpia de RMN-H1



Esquema de l'anàlisi molecular avançat mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹ centrat en el perfil lipoproteic avançat amb espectroscòpia bidimensional i en l'estudi de l'estat inflamatori sistèmic mitjançant nivells de Glic, de forma paral·lela i simultània, en una única mostra de plasma.

En el moment actual existeix molt poca evidència de l'estudi del perfil lipoproteic avançat i de l'estat inflamatori mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹ en el camp de la IC.

Per aquests motius, volem investigar les alteracions que puguin existir en el perfil lipoproteic avançat, en l'estudi de les partícules HDL i en l'estudi del

perfil inflamatori sistèmic per espectroscòpia de RMN-H¹ en una cohort no seleccionada de pacients amb IC crònica, i avaluar la seva implicació pronòstica.

3. HIPÒTESI

3.1. Hipòtesi d'estudi

En la IC crònica, existeixen variacions significatives del perfil lipoproteic i de l'estat inflamatori que poden ser detectades mitjançant l'anàlisi molecular avançat per espectroscòpia de RMN- H^1 . Dites troballes poden ser factors pronòstics independents per a mortalitat i/o esdeveniments cardiovasculars futurs en la població amb IC crònica.

4. OBJECTIUS

4.1. Objectiu principal

Identificar alteracions del perfil lipoproteic avançat mitjançant tècnica d'espectroscòpia de RMN-H¹ en una cohort de pacients amb IC crònica seguits de forma prospectiva en una unitat multidisciplinària d'IC d'un hospital de tercer nivell, avaluar si existeixen diferències significatives quan es compara amb el d'una cohort sense IC, i determinar si les mateixes poden aportar valor pronòstic rellevant en el seguiment clínic dels malalts amb IC, més enllà dels factors de risc clàssics i biomarcadors coneguts en aquest camp.

4.2. Objectiu secundari

Descriure l'estat inflamatori a partir del perfilat molecular avançat per RMN-H1 de la concentració de glicoproteïnes en una cohort de pacients amb IC crònica, i estudiar la seva associació amb els esdeveniments cardiovasculars a llarg termini.

5. COMPENDI DE PUBLICACIONS

5.1. Introducció

La present tesi doctoral per compendi d'articles intenta respondre als objectius de la mateixa, que són identificar les alteracions del perfil lipoproteic avançat i la inflamació sistèmica en la població amb IC crònica mitjançant espectroscòpia de RMN- H^1 i avaluar si permeten millorar l'estratificació pronòstica més enllà de factors de risc clàssics i biomarcadors coneguts en aquest el camp.

Es compon de dos articles originals principals i d'una tercera publicació disponible a l'apartat annexes de la present tesi.

5.2. Primer article

1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls

Teis A, Castelblanco E, Cediell G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, Guardiola M, Franch J, Bermúdez-López M, Codina P, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Oct 26:S1885-5857(21)00285-1. English, Spanish.

doi: 10.1016/j.rec.2021.09.008. PMID: 34716123.

1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls

Teis A, Castelblanco E, Cediell G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, Guardiola M, Franch J, Bermúdez-López M, Codina P, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Oct 26:S1885-5857(21)00285-1. English, Spanish.

doi: 10.1016/j.rec.2021.09.008. PMID: 34716123

1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls

Teis A, Castelblanco E, Cediell G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, Guardiola M, Franch J, Bermúdez-López M, Codina P, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Oct 26:S1885-5857(21)00285-1. English, Spanish.

doi: 10.1016/j.rec.2021.09.008. PMID: 34716123

1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls

Teis A, Castelblanco E, Cediell G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, Guardiola M, Franch J, Bermúdez-López M, Codina P, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Oct 26:S1885-5857(21)00285-1. English, Spanish.

doi: 10.1016/j.rec.2021.09.008. PMID: 34716123

1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls

Teis A, Castelblanco E, Cediell G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, Guardiola M, Franch J, Bermúdez-López M, Codina P, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Oct 26:S1885-5857(21)00285-1. English, Spanish.

doi: 10.1016/j.rec.2021.09.008. PMID: 34716123

1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls

Teis A, Castelblanco E, Cediell G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, Guardiola M, Franch J, Bermúdez-López M, Codina P, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Oct 26:S1885-5857(21)00285-1. English, Spanish.

doi: 10.1016/j.rec.2021.09.008. PMID: 34716123

1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls

Teis A, Castelblanco E, Cediell G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, Guardiola M, Franch J, Bermúdez-López M, Codina P, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Oct 26:S1885-5857(21)00285-1. English, Spanish.

doi: 10.1016/j.rec.2021.09.008. PMID: 34716123

1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls

Teis A, Castelblanco E, Cediell G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, Guardiola M, Franch J, Bermúdez-López M, Codina P, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Oct 26:S1885-5857(21)00285-1. English, Spanish.

doi: 10.1016/j.rec.2021.09.008. PMID: 34716123

1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls

Teis A, Castelblanco E, Cediell G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, Guardiola M, Franch J, Bermúdez-López M, Codina P, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Oct 26:S1885-5857(21)00285-1. English, Spanish.

doi: 10.1016/j.rec.2021.09.008. PMID: 34716123

1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls

Teis A, Castelblanco E, Cediell G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, Guardiola M, Franch J, Bermúdez-López M, Codina P, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Oct 26:S1885-5857(21)00285-1. English, Spanish.

doi: 10.1016/j.rec.2021.09.008. PMID: 34716123

1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls

Teis A, Castelblanco E, Cediell G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, Guardiola M, Franch J, Bermúdez-López M, Codina P, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Oct 26:S1885-5857(21)00285-1. English, Spanish.

doi: 10.1016/j.rec.2021.09.008. PMID: 34716123

5.3. Segon article

Particle size and cholesterol content of circulating HDL correlate with cardiovascular death in chronic heart failure

Teis A, Cediell G, Amigó N, Julve J, Aranyó J, Andrés-Cordón J, Puig-Jove C, Castelblanco E, Gual-Capllonch F, Ferrer-Sistach E, Vallejo N, Juncà G, López-Ayerbe J, De Antonio M, Domingo M, Santiago-Vacas E, Codina P, Mauricio D, Lupón J, Alonso N, Bayés-Genís A.

Sci Rep. 2021 Dec 4;11(1):3141.

doi: 10.1038/s41598-021-82861-6. PMID: 33542459; PMCID: PMC7862293.



OPEN

Particle size and cholesterol content of circulating HDL correlate with cardiovascular death in chronic heart failure

Albert Teis^{1,2}✉, G. Cediell¹, N. Amigó^{3,4,5}, J. Julve^{5,6}, J. Aranyó¹, J. Andrés-Cordón¹, C. Puig-Jové⁷, E. Castelblanco^{5,8,9}, F. Gual-Capllonch¹, E. Ferrer-Sistach¹, N. Vallejo¹, G. Juncà¹, J. López-Ayerbe¹, M. De Antonio⁹, M. Domingo⁹, E. Santiago-Vacas⁹, P. Codina⁹, D. Mauricio^{2,5,6,8,10}, J. Lupón⁹, Nuria Alonso^{2,5,11}✉ & A. Bayes-Genis^{1,2,12}

Evidence regarding any association of HDL-particle (HDL-P) derangements and HDL-cholesterol content with cardiovascular (CV) death in chronic heart failure (HF) is lacking. To investigate the prognostic value of HDL-P size (HDL-Sz) and the number of cholesterol molecules per HDL-P for CV death in HF patients. Outpatient chronic HF patients were enrolled. Baseline HDL-P number, subfractions and HDL-Sz were measured using 1H-NMR spectroscopy. The HDL-C/P ratio was calculated as HDL-cholesterol over HDL-P. Endpoint was CV death, with non-CV death as the competing event. 422 patients were included and followed-up during a median of 4.1 (0–8) years. CV death occurred in 120 (30.5%) patients. Mean HDL-Sz was higher in CV dead as compared with survivors (8.39 nm vs. 8.31 nm, $p < 0.001$). This change in size was due to a reduction in the percentage of small HDL-P (54.6% vs. 60% for CV-death vs. alive; $p < 0.001$). HDL-C/P ratio was higher in the CV-death group (51.0 vs. 48.3, $p < 0.001$). HDL-Sz and HDL-C/P ratio were significantly associated with CV death after multivariable regression analysis (HR 1.22 [95% CI 1.01–1.47], $p = 0.041$ and HR 1.04 [95% CI 1.01–1.07], $p = 0.008$ respectively). HDL-Sz and HDL-C/P ratio are independent predictors of CV death in chronic HF patients.

Epidemiological and clinical studies have consistently demonstrated that lower levels of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (HDL-C) are independently associated with coronary heart disease (CHD)^{1,2}. However, attempts to reduce cardiovascular (CV) risk by increasing circulating levels of HDL-C have been unsuccessful^{3–5}. As a consequence, HDL cardioprotective functions rather than HDL-C quantity has been a new focus of interest.

In the last decade, several studies evaluated the relationship of HDL particles (HDL-P) and their subfractions to CV risk. The pool of circulating HDL is comprised of a heterogeneous mixture of lipoprotein particles and it has been pointed out that small, dense, protein-rich HDLs appear to display potent atheroprotective properties across the HDL subpopulation spectrum, which can be attributed to specific clusters of proteins and lipids⁶. Several authors demonstrated that HDL-P levels have a better correlation with coronary heart disease, coronary heart

¹Heart Institute, Cardiology Department, Germans Trias University Hospital, Carretera de Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. ²Department of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain. ³Biosfer Teslab, SL, Reus, Spain. ⁴Metabolomics Platform, Rovira i Virgili University (URV), Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain. ⁵Center for Biomedical Research on Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. ⁶Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Institut d'Investigació Biomèdica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain. ⁷Endocrinology and Nutrition Department, Germans Trias University Hospital, Badalona, Barcelona, Spain. ⁸Endocrinology and Nutrition Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. ⁹Heart Institute, Heart Failure Unit, Germans Trias University Hospital, Badalona, Barcelona, Spain. ¹⁰Lleida Biomedical Research Institute's Dr. Pifarré Foundation (IRBLleida), University of Lleida, Lleida, Spain. ¹¹Endocrinology and Nutrition Department, Heart Failure Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. ¹²Centre for Biomedical Research on cardiovascular Diseases (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. ✉email: a_teis@yahoo.es; nalonso.germantrias@gencat.cat

disease related mortality, coronary artery disease events, and atherosclerosis progression than do the classical lipid profile components such as total cholesterol, triglycerides, or low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and HDL-C alone^{7–16}. When focusing on HDL subfractions, mainly reduced levels of small HDL-P were associated with CV outcomes^{9,17–21}. However, only a few studies have been published analyzing HDL-P and its subfractions in heart failure (HF) patients. A low concentration of small HDL-P has been associated with 3-month all-cause mortality in acute HF patients^{22,23}. A recently published report describe an inverse gradation of small HDL-P levels across no-HF, HF with preserved, and HF with reduced ejection fraction patients and its correlation with all-cause mortality and coronary artery disease events in a catheterization lab-based population²⁴.

Moreover, the cholesterol content per particle has also emerged as a potential CV marker. As estimated by the ratio of HDL-C to HDL-P (HDL-C/P ratio), it was associated with increased progression of carotid atherosclerosis in a community-based population¹⁶.

Despite these studies, to date no data has been reported regarding the association of HDL-P concentration, HDL size, HDL-P subfraction distribution, or the HDL-C/P ratio with CV death in chronic HF. Here we investigate the prognostic value of HDL-P, mean normalized HDL size (HDL-Sz), and the HDL-C/P ratio for CV death in patients with ambulatory chronic HF.

Material and methods

Study population and outcomes. Ambulatory patients referred to a structured multidisciplinary HF unit of a tertiary university hospital, with an available baseline blood sample, were included from May 2006 to April 2014. Patients were considered for the study regardless of HF etiology. All patients were seen regularly in follow-up visits at the HF unit. The clinical evaluation and treatment of patients were directed by the responsible physician according to a unified protocol, medical criteria, and current clinical practice guidelines²⁵. Baseline blood samples were obtained between 09:00 h and 12:00 h and were stored at -80°C without previous freeze-thaw cycles. Clinical echocardiograms were also performed at baseline by imaging expert cardiologists in dedicated cardiac echocardiographers (Philips iE33; Philips, The Netherlands) as part of routine clinical practice. Assessments of left ventricular dimensions and function were performed as recommended in guidelines^{26,27}. Follow-up visits included a minimum of 1 visit with a nurse every 3 months and 1 visit with a physician every 6 months. The vital status and cause of death (if present) were checked every 3 months. If a patient did not come to a scheduled visit, telephone contact with the patient or patient's relatives was attempted. If contact was not possible and death was not certified by clinical records from other hospital wards, the emergency department, or general practitioners, vital status was checked from registries of the Spanish Health Systems. Cause of death was adjudicated by the physicians once all available records were reviewed.

The primary endpoint of the study was CV death, defined as mortality due to HF, myocardial infarction, sudden cardiac death, stroke, or secondary to a cardiovascular procedure. Death by unknown cause was an exclusion criteria for the study.

During the baseline visit, patients provided written informed consent for the study. The Local Ethics Committee of Hospital Germans Trias approved the study (code: EO 10-076). The study was performed in compliance with the law protecting personal data, in accordance with the international guidelines on clinical investigation of the World Medical Association's Declaration of Helsinki²⁸.

Lipoprotein analysis by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Serum concentrations of triglyceride, cholesterol, HDL-C, the three subclasses (large, medium and small) of HDL particle concentration, and HDL-Sz were assessed at baseline using a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. A 250- μL aliquot of serum from each patient was shipped on dry ice to Biosfer Teslab (Reus, Spain) for lipoprotein analysis using the Liposcale Test. Cut off values for large, medium and small HDL were 9–13 nm, 8.2–9 nm and <8.2 nm, respectively²⁹. The variation coefficients for the number of particle ranged 2% and 4%, and for particle sizes were lower than 0.3%. The total particle count and percentage of total HDL-P constituted by each subfraction were also assessed. The HDL-C/P ratio was calculated as an estimate of cholesterol content of the HDL particles¹⁶. To calculate the ratio, units of HDL-C were transformed to $\mu\text{mol/L}$.

Statistical analysis. Categorical variables are expressed as the absolute number and percentages. Continuous variables are expressed as means \pm SD or medians (quartiles Q1–Q3) for normal and non-normal distributions, respectively. Data distributions were assessed with normal Q–Q plots. Differences between groups were determined using the chi-squared test, Student's *t* test, Mann–Whitney *U* test, Kruskal–Wallis test, and means comparison (ANOVA), as appropriate. To evaluate the association of candidate variables with CV death, univariable and multivariable Cox regression analyses were performed with CV death as the dependent variable. Multivariable analyses using a stepwise selection method (backward elimination, removing all variables with a *p* value > 0.05) were performed and included the significant covariates from the univariable analysis and other relevant clinical variables (age, sex, body mass index, diabetes, arterial hypertension, vasculopathy, ischemic etiology, New York Heart Association [NYHA] functional class III–IV, estimated glomerular filtration rate [eGFR], hemoglobin, N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide [NT-ProBNP], LDL particles, and treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors [ACEi], angiotensin receptor blockers [ARB], beta blockers, statins, and implantable cardioverter-defibrillators [ICD]). A competing risk strategy using the Fine and Gray method was adopted, considering non-CV death as a competing event. All lipid variables were standardized and, accordingly, the resulting hazard ratios reflect a 1-SD change in the given parameter. Survival curves were generated from the full model using tertiles of HDL-Sz and the HDL-C/P ratio. Given the known association of HDL-P with inflammatory status, additional sensitivity analysis was performed, including in the initial model

the glycoprotein (Gly) A, Gly-B, and Gly-F levels, which are three validated, composite $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy-derived markers of systemic inflammation^{30–33}. Considering that the metabolic profile could change during disease progression, a secondary analysis was performed, according to NYHA functional class. Finally, considering the high prevalence of ischemic etiology in our cohort, the interaction between HDL-Sz and the HDL-C/P ratio with ischemic etiology was assessed, and found not significant in any case ($p=0.741$ and $p=0.809$, respectively). Moreover, the interaction between HDL-Sz and the HDL-C/P ratio with HF and preserved or reduced ejection fraction was assessed, being not significant in any case ($p=0.818$ and $p=0.911$, respectively).

Statistical analyses were performed using STATA V.13.0 (College Station, Texas, USA). A two-sided $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Clinical characteristics. A total of 422 patients were included. The baseline characteristics of the subjects are listed in Table 1. The main causes of HF included ischemic heart disease (48.1%), dilated cardiomyopathy (15.9%), and hypertensive cardiomyopathy (10.2%) (Table 2). As compared with survivors patients, CV death patients were older (73.6 vs. 61.4 years; $p < 0.001$), with higher prevalence of hypertension, (76.7% vs. 59%; $p = 0.001$), peripheral vasculopathy (25% vs. 9%; $p < 0.001$), ischemic heart disease (65% vs. 36.5%; $p = 0.001$), and atrial fibrillation (32.5% vs. 16.6%; $p = 0.003$). They also presented with worse baseline NYHA functional class (NYHA III–IV 33.3% vs. 13.1%; $p < 0.001$), eGFR (45.9 ± 25.5 vs. 75.3 ± 36.0 mL/min/1.73 m²; $p < 0.001$) and higher NT-proBNP levels (3949 [1765–7228] vs. 1103 [442–2544] pg/mL; $p < 0.001$). No differences in left ventricular ejection fraction were observed among groups. Interestingly, CV death patients received a lower proportion of beta blockers (88.3% vs. 95%; $p = 0.020$), ACEi or ARB (76.7% vs. 91.9%; $p < 0.001$), or mineralocorticoid receptor antagonists (59.2% vs. 70.3%; $p = 0.037$), but required more loop diuretics (97.5% vs. 82.9%; $p < 0.001$). Statins were used slightly more in the living population (74.2% vs. 82.8%; $p = 0.030$). Moreover, less ICD therapy was used in the CV death patients (10.0% vs. 24.7%; $p < 0.001$).

NMR spectroscopy lipoprotein profiling. Serum concentrations of total triglycerides, total cholesterol, HDL-Sz, HDL subfraction particle numbers, and the calculated HDL-C/P ratio are listed in Table 1. Total cholesterol and LDL cholesterol were lower in the CV death group in comparison with the living patients (184.9 ± 30.5 vs. 201.3 ± 40.8 and 103.4 ± 23.2 vs. 115.3 ± 29.8 respectively; both $p = 0.001$). No differences in HDL-C levels or in the number of HDL-P across groups were observed, but HDL-Sz was bigger in the CV death group than in the living patients (8.39 ± 0.17 nm vs. 8.31 ± 0.11 nm, $p < 0.001$). This change in size was mainly produced by a decrease in the percentage of small HDL-P (54.6% and 60% for CV death and living patients, respectively; $p < 0.001$), with a consequent proportional variation in the percentage of medium HDL-P (Fig. 1). Additionally, the HDL-C/P ratio, an estimator of the degree of cholesterol content of the HDL particles, was higher in CV death patients (51.0 ± 6.9 vs. 48.3 ± 4.6 for CV death and survivors respectively; $p < 0.001$).

Correlations of HDL-Sz and the HDL-C/P ratio with HDL-C and levels of Gly-A, Gly-B, and Gly-F were assessed. We found weak but statistically significant correlations of HDL-C with HDL-Sz ($r^2 = -0.28$; $p < 0.01$) and the HDL-C/P ratio ($r^2 = 0.24$; $p < 0.01$). The correlation of study variables with markers of systemic inflammation revealed a weak but statistically significant inverse correlation of HDL-Sz with Gly-A ($r^2 = -0.28$, $p < 0.01$), Gly-B ($r^2 = -0.08$, $p = 0.09$), and Gly-F ($r^2 = -0.35$, $p < 0.01$). For the HDL-C/P ratio, a modest inverse correlation was found with Gly-A ($r^2 = -0.64$, $p < 0.01$) and Gly-F ($r^2 = -0.67$, $p < 0.01$), and a weak inverse correlation with Gly-B ($r^2 = -0.26$, $p = 0.07$).

Association of HDL-Sz and HDL-C/P ratio with cardiovascular death. During a median follow-up of 4.1 (0–8) years, the primary endpoint occurred in 120 patients (30.5%). Main causes of CV death were HF (59.2%), sudden cardiac death (18.3%), myocardial infarction (9.2%), and stroke (1.7%). Other causes of death corresponded to 11.6% of cases.

As shown in Table 3, a multivariable competing-risk regression analysis demonstrated that both HDL-Sz and the HDL-C/P ratio were independent predictors of the occurrence of CV death during follow-up (HR 1.21, 95% CI 1.01–1.47; $p = 0.041$ and HR 1.04, 95% CI 1.01–1.07; $p = 0.008$, respectively). Considering the reported biological interaction between HDL function and inflammatory status, we performed an additional sensitivity analysis, adding Gly-A, Gly-B, and Gly-F to the initial model, with consistent results (HR 1.22, 95% CI 1.01–1.47; $p = 0.041$ and HR 1.04, 95% CI 1.01–1.47; $p = 0.008$; for HDL-Sz and the HDL-C/P ratio, respectively). Adjusted survival curves were generated using tertiles of HDL-Sz and the HDL-C/P ratio, showing increased risk of CV death over time for the higher tertiles of both variables (Fig. 2).

The dispersion of HDL-Sz and HDL-C/P ratio values was also represented, and the total cohort was divided into four equally sized groups accounting for HDL-Sz and HDL-C/P median values (8.32 nm and 49.13, respectively) (Supplementary material, Fig. S1). Cases with increased HDL-Sz and highly cholesterol-loaded HDL-P were at higher risk of CV death (HR 1.94, 95% CI 1.28–2.96; $p = 0.002$) (Fig. 3).

Finally, we performed an additional regression analysis according to NYHA functional class evidencing that the association of the variables of interest with the outcome of the study remains only significant in the subgroup of patients with NYHA functional class III–IV and approaching a level of significance for HDL-Sz in patients with NYHA functional class I–II (Supplementary material, Table S1).

Discussion

In this study, circulating particle concentrations of HDL and its subfractions were quantified using $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy in a real-life chronic out-patient clinic HF cohort with exquisite long-term clinical follow-up of the patients. We observed significant derangements in mean HDL-Sz and the HDL-C/P ratio in those with CV

| | Overall n = 422 | Non-survivors | | Survivors n = 222 | P |
|---------------------------------------------------|--------------------|---------------------|------------------------|----------------------|---------|
| | | CV death n = 120 | Non-CV death n = 80 | | |
| Age, years | 67.2 ± 13.4 | 73.6 ± 10.1 | 73.7 ± 9.9 | 61.4 ± 13.4 | < 0.001 |
| Male | 312 (72.7) | 86 (71.7) | 60 (75) | 161 (72.5) | 0.869 |
| Hypertension | 284 (67.3) | 92 (76.7) | 61 (76.3) | 131 (59) | 0.001 |
| Diabetes | 191 (45.3) | 61 (50.8) | 41 (51.2) | 89 (40) | 0.080 |
| Hypercholesterolemia | 275 (65.2) | 79 (65.8) | 56 (70) | 140 (63) | 0.525 |
| COPD | 66 (15.6) | 23 (19.2) | 17 (21.3) | 26 (11.7) | 0.060 |
| Vasculopathy | 66 (15.6) | 30 (25.0) | 16 (20) | 20 (9) | < 0.001 |
| NYHA Class III–IV | 91 (21.6) | 40 (33.3) | 22 (27.5) | 29 (13.1) | < 0.001 |
| BMI | 27.38 ± 4.8 | 26.88 ± 5.00 | 27.11 ± 4.42 | 27.73 ± 4.83 | 0.250 |
| HR, bpm | 69.8 ± 14.8 | 72.8 ± 14.7 | 69.6 ± 15.0 | 68.2 ± 14.7 | 0.025 |
| Atrial fibrillation | 96 (22.7) | 39 (32.5) | 20 (25) | 37 (16.6) | 0.003 |
| LBBB | 53 (12.6) | 17 (14.2) | 6 (7.5) | 30 (13.5) | 0.312 |
| LVEF, % | 35.6 ± 14.2 | 36.1 ± 15.5 | 37.5 ± 14.7 | 34.6 ± 13.2 | 0.270 |
| LVEDd, mm | 59.9 ± 9.0 | 59.3 ± 9.6 | 58.7 ± 8.5 | 60.5 ± 8.9 | 0.227 |
| Blood tests | | | | | |
| Hb, g/dL | 12.7 ± 1.8 | 12.1 ± 1.7 | 12.2 ± 1.5 | 13.2 ± 1.8 | < 0.001 |
| Glucose, mg/dL* | 120.15 ± 3.0 | 118.05 ± 5.7 | 126.11 ± 5.4 | 119.1 ± 4.4 | 0.490 |
| Sodium, mmol/L | 137.9 ± 3.5 | 137.7 ± 3.94 | 138.1 ± 3.1 | 138.0 ± 3.4 | 0.706 |
| Potassium, mmol/L | 4.24 ± 0.03 | 4.28 ± 0.05 | 4.21 ± 0.06 | 4.23 ± 0.03 | 0.587 |
| eGFR, mL/min/1.73m ² | 62.3 ± 34.8 | 45.9 ± 25.5 | 50.9 ± 29.1 | 75.3 ± 36.0 | < 0.001 |
| NT-proBNP, pg/mL [median (Q1–Q3)] | 1811 (735–4414) | 3949 (1765–7228) | 2921 (1027–5074) | 1103 (442–2544) | < 0.001 |
| Treatment at baseline | | | | | |
| Betablockers | 389 (92.2) | 106 (88.3) | 72 (90) | 211 (95) | 0.020 |
| ACEi/ARB | 360 (85.3) | 92 (76.7) | 64 (80) | 204 (91.9) | < 0.001 |
| MRA | 279 (66.1) | 71 (59.2) | 52 (65) | 156 (70.3) | 0.037 |
| Loop diuretic | 373 (88.4) | 117 (97.5) | 72 (90) | 184 (82.9) | < 0.001 |
| Statins | 329 (78) | 89 (74.2) | 56 (70) | 184 (82.8) | 0.030 |
| ICD | 70 (16.6) | 10 (10.0) | 3 (3.8) | 55 (24.8) | < 0.001 |
| CRT | 53 (12.6) | 13 (10.8) | 5 (6.3) | 35 (15.8) | 0.071 |
| ¹H-NMR lipid biomarkers | | | | | |
| Total TG, mg/dL | 129.0 ± 54.4 | 116.9 ± 47.8 | 131.4 ± 49.4 | 134.7 ± 58.6 | 0.014 |
| Total cholesterol, mg/dL | 195.2 ± 38.0 | 184.9 ± 30.5 | 193.8 ± 37.0 | 201.3 ± 40.8 | 0.001 |
| LDL-C, mg/dL | 110.6 ± 27.9 | 103.4 ± 23.2 | 108.7 ± 26.9 | 115.3 ± 29.8 | 0.001 |
| HDL-C, mg/dL | 48.6 ± 10.4 | 49.2 ± 9.9 | 47.3 ± 9.8 | 48.7 ± 10.9 | 0.436 |
| HDL-Sz, nm | 8.34 ± 0.14 | 8.39 ± 0.17 | 8.36 ± 0.15 | 8.31 ± 0.11 | < 0.001 |
| HDL particle number, μmol/L (% over total) | | | | | |
| Total | 25.7 ± 5.4 (100%) | 25.2 ± 5.1 (100%) | 25.1 ± 5.3 (100%) | 26.2 ± 5.7 (100%) | 0.133 |
| Large | 0.3 ± 0.05 (1.2%) | 0.3 ± 0.1 (1.2%) | 0.3 ± 0.1 (1.2%) | 0.3 ± 0.1 (1.2%) | 0.743 |
| Medium | 10.2 ± 2.0 (41.0%) | 10.7 ± 1.9 (44.2%) | 10.3 ± 1.9 (42.4%) | 9.9 ± 2.0 (38.8%) | 0.002 |
| Small | 15.2 ± 4.9 (57.7%) | 14.2 ± 5.0 (54.6%) | 14.5 ± 4.9 (56.4%) | 16.0 ± 4.7 (60.0%) | 0.002 |
| HDL-C/P ratio | 49.2 ± 5.9 | 51.0 ± 6.9 | 49.2 ± 6.6 | 48.3 ± 4.6 | < 0.001 |

Table 1. Baseline characteristics of patients. Results expressed as mean ± SD for quantitative variables and n (%) for categorical unless otherwise indicated. COPD chronic obstructive pulmonary disease, BMI body mass index, BSA body surface area by Mosteller formula, HR heart rate, AF atrial fibrillation, LBBB left bundle branch block, LVEF left ventricular ejection fraction, LVEDd left ventricular end-diastolic diameter, Hb hemoglobin, eGFR estimated glomerular filtration rate calculated by Cockcroft–Gault formula, ACEi Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor, ARB Angiotensin II receptor blockers, MRA mineralcorticoid receptors antagonists, ICD Implantable Cardiac Defibrillator, CRT Cardiac Resynchronization, NMR nuclear magnetic resonance, TG triglycerides, HDL-Sz mean normalized HDL particle size, LDL-C LDL cholesterol, HDL-C HDL cholesterol. *Basal Glucose levels only available in 336 patients (in 101 CV death, 66 non-CV death and in 169 survivors).

| | Total n = 422 | Death | | Alive n = 222 | P value |
|---------------------|------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------|
| | | CV death n = 120 | Non-CV death n = 80 | | |
| Ischemic | 203 (48.1) | 78 (65.0) | 44 (55) | 81 (36.5) | <0.001 |
| DCM | 67 (15.9) | 11 (9.2) | 9 (11.3) | 47 (21.2) | |
| Hypertensive | 43 (10.2) | 10 (8.3) | 10 (12.5) | 23 (10.4) | |
| Alcoholic | 22 (5.2) | 0 | 3 (3.8) | 19 (8.5) | |
| Drugs/chemotherapy | 14 (3.3) | 1 (0.8) | 3 (3.8) | 10 (4.5) | |
| Valve disease | 33 (7.8) | 14 (11.7) | 6 (7.5) | 13 (5.8) | |
| Other | 21 (5.0) | 3 (2.5) | 5 (6.3) | 13 (5.8) | |
| HCM | 8 (1.9) | 2 (1.7) | 0 | 6 (2.7) | |
| Non-compaction | 5 (1.2) | 0 | 0 | 5 (2.2) | |
| Amyloid | 3 (0.7) | 1 (0.8) | 0 | 2 (0.9) | |
| Peripartum | 2 (0.5) | 0 | 0 | 2 (0.9) | |
| Tachycardiomyopathy | 1 (0.2) | 0 | 0 | 1 (0.4) | |

Table 2. Etiology of heart failure. Results expressed as n (%). DCM dilated cardiomyopathy, HCM hypertrophic cardiomyopathy.

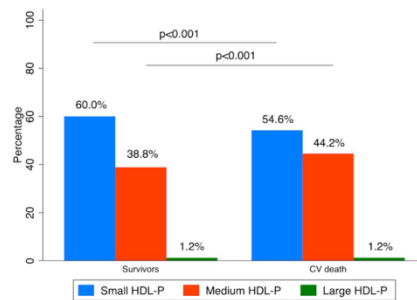


Figure 1. Distribution of HDL particles according to their size in survivors and patients who suffered cardiovascular death. HDL-P HDL particle, CV cardiovascular.

| | HDL-Sz | | HDL-C/P ratio | |
|---------------------------------|-------------------|---------|-------------------|---------|
| | HR (95% CI) | P value | HR (95% CI) | P value |
| Unadjusted | 1.36 (1.16–1.58) | <0.001 | 1.06 (1.03–1.09) | <0.001 |
| Multivariable adjustment | | | | |
| Model 1 | 1.21 (1.01–1.47)* | 0.041 | 1.04 (1.01–1.07)* | 0.008 |
| Model 2 | 1.22 (1.01–1.47)* | 0.041 | 1.04 (1.01–1.07)* | 0.008 |

Table 3. Univariable and multivariable Cox Regression Analysis of the associations between HDL-Sz and HDL-C/P ratio with cardiovascular death. Hazard ratios for HDL-Sz reflect 1 SD change in a given measure. **Model 1** Adjusted for age, sex, BMI, diabetes, arterial hypertension, vasculopathy, ischemic etiology, NYHA functional class III–IV, eGFR, Hemoglobin, NT-ProBNP, LDL-P and treatment with ACEi/ARB, Betablockers, statins and ICD. **Model 2** Adjusted for Model 1 plus glycoprotein (Gly)-A, Gly-B and Gly-F. *Other independent predictors of the outcomes in these models besides HDL-Sz or HDL-C/P were age, ischaemic etiology and NT-proBNP.

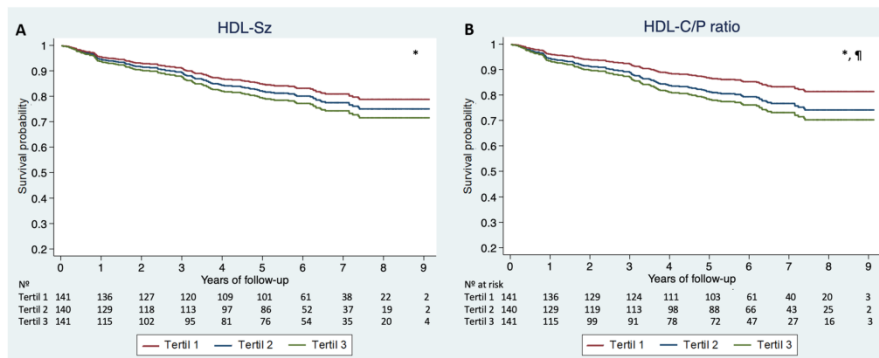


Figure 2. Survival curves showing the probability over time to observe a cardiovascular death across Tertiles of HDL-Sz and HDL-C/P ratio. Survival curves showing the probability over time to observe a cardiovascular death across Tertiles of normalized mean HDL-P size (HDL-Sz) and HDL-C/P ratio, adjusted for age, sex, BMI, diabetes, arterial hypertension, vasculopathy, ischemic etiology, NYHA functional class III–IV, eGFR, Hemoglobin, NT-ProBNP and treatment with ACEi/ARB, Betablockers, statins and LDL-P and ICD. Statistical significance ($p < 0.05$) denoted as follows: *significant difference in CV death between the highest and lowest tertiles; **significant difference in CV death between the highest and middle tertiles. HDL-C/P HDL cholesterol over HDL particle ratio, HDL-Sz normalized mean HDL size.

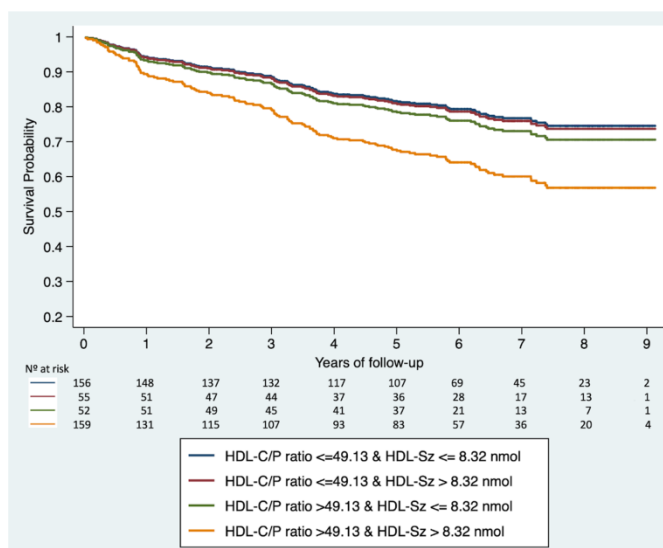


Figure 3. Survival curves showing the probability over time to observe a cardiovascular death according to the HDL-C/P ratio and normalized mean HDL-P size (HDL-Sz). HDL-C/P ratio HDL cholesterol over HDL particle ratio, HDL-Sz normalized mean HDL particle size.

death as compared with survivors after comprehensive multivariable adjustment. Changes in mean HDL-Sz were mainly due to a decrease in the proportion of small HDL-P rather than an increase in large HDL-P. Moreover, the degree of cholesterol content of the HDL, represented by the HDL-C/P ratio, was increased in those CV death patients. We observed that HDL-Sz and elevated levels of cholesterol-overloaded HDL, understood as the HDL cholesterol content per particle (HDL-C/P ratio), were independently associated with the increased risk of CV death in HF patients. Overall, these findings suggest that alterations in the distribution among HDL subfractions and the degree of its cholesterol content are important markers, beyond total cholesterol or HDL-C levels, for CV death in out-patient clinic chronic HF patients.

To date, evidence on association of HDL-P and its subfractions in HF patients is scarce, with no data from real-life chronic out-patient HF population. Potočnjak et al. and Degoricija et al. identified inverse associations of total HDL-P and levels of small HDL-P with very short (3-month) survival in patients hospitalized with acute HF^{22,23}. Hunter et al. found an inverse gradient association of HDL-P count and small HDL-P with all-cause mortality and coronary artery disease events in no-HF, HF with preserved and HF with reduced ejection fraction patients in a cath-lab based population²⁴. As in those reports, we also found that the size of HDL (HDL-Sz) and percentage of small HDL-P were crucial and associated with adverse events, increasing the importance of this marker in the HF population. However, we did not observe any difference in total HDL-P count between CV death and survivors, contrary to the other groups' results. One explanation is that our cohort differs from both of their's, being more representative of real-life chronic HF, with lower overall total HDL-P count across the entire cohort, regardless of its future prognosis. Although the comparison must be cautious because different ¹H-NMR spectroscopy tests were used, the total HDL-P count in our cohort is also lower as compared with the HF with reduced ejection fraction subgroup of Hunter et al.'s population (25.7 ± 5.4 vs. 27.2 ± 6.2, for our entire cohort vs. Hunter et al.'s cohort). Both groups showed no differences in total cholesterol or HDL-C between alive and dead patients, emphasizing the importance of HDL subfraction analysis over total cholesterol or HDL-C in HF. In our study, no significant differences in serum HDL-C were observed between survivors and CV death patients; however, total cholesterol concentrations were lower in dead patients. One explanation is that our cohort corresponds to a real-life chronic HF population, and CV death patients could present with lower total cholesterol levels due to more severe and evolved HF process. The cholesterol paradox in HF has been reported previously and has been related to cachexia^{34,35}. In fact, those with CV death were older, presented with worse NYHA class, higher NT-proBNP levels, more tachycardia, more incidence of atrial fibrillation and required more loop diuretics. As a consequence of their worse clinical status, less beta blocker, ACEi, ARB, or mineralcorticoid receptor antagonist treatment was given. In keeping with this, statins were used slightly less in the CV death population as compared with the survivors. However, statin treatment was included in all the multivariate models, and the association of HDL-Sz and the HDL-C/P ratio with CV death remained significant.

The HDL-C/P ratio as a surrogate of cholesterol content of HDL-P was previously reported by Qi et al.¹⁶ and later explored by Amigó et al.³⁶. The average cholesterol content per particle reflects the HDL particle distribution, being higher in larger HDL particles, as while the size increases linearly, the cholesterol content increases with a cubic relationship. Qi et al. observed that cholesterol-overloaded HDL-P was independently associated with the progression of carotid atherosclerosis in a disease-free population. To our knowledge, the HDL-C/P ratio has not previously been explored as a marker of adverse cardiovascular events in HF patients. Interestingly, as demonstrated in our study, the HDL-C/P ratio is an independent predictor for CV death regardless of the HDL-Sz or HDL-P count in HF. This might suggest that derangements in cholesterol transport of HDL are also critical in the prognosis of chronic HF patients and that this parameter might be used as a biomarker to stratify CV death risk in this population. An anomalous clearance of HDL-C may be one of the explanations for these findings, resulting in a final increase in HDL-C/P ratio despite total HDL-C levels. Given the evidence that medium and large subfractions of HDL-P are not reduced, the overall cholesterol efflux appears not to be significantly affected in chronic HF patients. However, the final pathophysiological mechanism that could explain these findings should be explored in further studies. Finally, we also hypothesized that the decrease in small HDL-P might suggest a decline in the cardioprotective activity of HDL, which is mainly mediated by small-sized HDL^{6,37}. However, how these molecular effects can be translated at the clinical level should be confirmed in future investigations.

Strengths and limitations. The strengths of our study are that it is representative of real-life chronic HF patients, with an exquisite follow-up. Moreover, the relationship of HDL-Sz and HDL-C/P to CV death was not only assessed in a comprehensive multivariate model, but also confirmed after adjustment for additional sensitivity analysis to rule out any confounding effect of HDL-P and its subfractions with any inflammatory status relevant to HF pathobiology.

This study also has some limitations. A selection bias could be present, as patients were included only if a baseline blood sample was available. Although it identifies associations of HDL-Sz and the HDL-C/P ratio with CV death, it does not prove a causal role of these derangements with adverse outcomes. However, the results align with emerging evidence suggesting an association of mainly small HDL-P with events in HF.

Another limitation is that it is a single-center population, and additional clinical investigations regarding the association of HDL-P with CV death in HF should be performed. Although several adjusted multivariate models were used, unmeasured confounders may have had an impact on the results.

Finally, apolipoprotein A levels or other standard inflammatory parameters beyond Glycoprotein A, B and F were not measured. Any interaction of those with the results is unknown.

Conclusions

In a chronic out-patient-clinic HF population, significant derangements in mean HDL-P size and HDL-C/P ratio were associated with CV death. Changes in mean HDL-Sz were mainly due to a decrease in the proportion of small HDL-P subfraction. Those with higher HDL-Sz were in higher risk for CV death. Moreover, the degree of cholesterol loading of the HDL, represented by the HDL-C/P ratio, was increased in those with CV death. This ratio has not been explored as a marker of adverse cardiovascular events in HF patients to date. These associations were robust, considering the rigorous multivariable adjustment. These data may help refine risk assessment and provide new insights into the complex interaction of HDL and HF pathophysiology. Further investigation is needed to elucidate the mechanisms underlying the observed associations and a better understanding of the role of HDL subfractions and cholesterol content of these particles in chronic HF.

Received: 29 September 2020; Accepted: 25 January 2021

Published online: 04 February 2021

References

1. The Emerging Risk Factors Collaboration*. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* **302**, 1993 (2009).
2. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. & Dawber, T. R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. *Am. J. Med.* **62**, 707–714 (1977).
3. Barter, P. J. *et al.* Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2109–2122 (2007).
4. Boden, W. E. *et al.* Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2255–2267 (2011).
5. Schwartz, G. G. *et al.* Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2089–2099 (2012).
6. Camont, L., Chapman, M. J. & Kontush, A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol. Med.* **17**, 594–603 (2011).
7. Otvos, J. D. *et al.* Low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclasses predict coronary events and are favorably changed by Gemfibrozil therapy in the veterans affairs high-density lipoprotein intervention trial. *Circulation* **113**, 1556–1563 (2006).
8. Kuller, L. H., Grandits, G., Cohen, J. D., Neaton, J. D. & Prineas, R. Lipoprotein particles, insulin, adiponectin, C-reactive protein and risk of coronary heart disease among men with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* **195**, 122–128 (2007).
9. McGarrah, R. W. *et al.* High-density lipoprotein subclass measurements improve mortality risk prediction, discrimination and reclassification in a cardiac catheterization cohort. *Atherosclerosis* **246**, 229–235 (2016).
10. El Harchaoui, K. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Ann. Intern. Med.* **150**, 84 (2009).
11. Parish, S. *et al.* Lipids and lipoproteins and risk of different vascular events in the MRC/BHF heart protection study. *Circulation* **125**, 2469–2478 (2012).
12. Mackey, R. H. *et al.* High-density lipoprotein cholesterol and particle concentrations, carotid atherosclerosis, and coronary events: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 508–516 (2012).
13. Mora, S., Glynn, R. J. & Ridker, P. M. High-density lipoprotein cholesterol, size, particle number, and residual vascular risk after potent statin therapy. *Circulation* **128**, 1189–1197 (2013).
14. Otvos, J. D. *et al.* Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. *J. Clin. Lipidol.* **5**, 105–113 (2011).
15. Holmes, M. V. *et al.* Lipids, lipoproteins, and metabolites and risk of myocardial infarction and stroke. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 620–632 (2018).
16. Qi, Y. *et al.* Cholesterol-overloaded HDL particles are independently associated with progression of carotid atherosclerosis in a cardiovascular disease-free population. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, 355–363 (2015).
17. Martin, S. S. *et al.* HDL cholesterol subclasses, myocardial infarction, and mortality in secondary prevention: The lipoprotein investigators collaborative. *Eur. Heart J.* **36**, 22–30 (2015).
18. Albers, J. J., Slee, A., Fleg, J. L., O'Brien, K. D. & Marcovina, S. M. Relationship of baseline HDL subclasses, small dense LDL and LDL triglyceride to cardiovascular events in the AIM-HIGH clinical trial. *Atherosclerosis* **251**, 454–459 (2016).
19. Kim, D. S. *et al.* HDL-3 is a superior predictor of carotid artery disease in a case-control cohort of 1725 participants. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, 20 (2014).
20. Kim, D. S. *et al.* Concentration of smaller high-density lipoprotein particle (HDL-P) is inversely correlated with carotid intima media thickening after confounder adjustment: The multi ethnic study of atherosclerosis (MESA). *J. Am. Heart Assoc.* **5**, 20 (2016).
21. Tiozzo, E. *et al.* High-density lipoprotein subfractions and carotid plaque: The Northern Manhattan Study. *Atherosclerosis* **237**, 163–168 (2014).
22. Potočnjak, I. *et al.* Serum concentration of HDL particles predicts mortality in acute heart failure patients. *Sci. Rep.* **7**, 46642 (2017).
23. Degoricija, V. *et al.* HDL subclasses and mortality in acute heart failure patients. *Clin. Chim. Acta* **490**, 81–87 (2019).
24. Hunter, W. G. *et al.* High-density lipoprotein particle subfractions in heart failure with preserved or reduced ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **73**, 177–186 (2019).
25. Ponikowski, P. *et al.* 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J.* **37**, 2129–2200 (2016).
26. Gottdiener, J. S. *et al.* American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **17**, 1086–1119 (2004).
27. Lang, R. M. *et al.* Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: An update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* **16**, 233–271 (2015).
28. Association, W. M. World medical association declaration of Helsinki. *JAMA* **310**, 2191 (2013).
29. Malloy, R. *et al.* Liposcale: A novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy. *J. Lipid Res.* **56**, 737–746 (2015).
30. Gornik, O. & Lane, G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis. Mark.* **25**, 267–278 (2008).
31. Fuertes-Martin, R. *et al.* Glycoprotein A and B height-to-width ratios as obesity-independent novel biomarkers of low-grade chronic inflammation in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *J. Proteome Res.* **18**, 4038–4045 (2019).
32. Akinkuolie, A. O., Buring, J. E., Ridker, P. M. & Mora, S. A novel protein glycan biomarker and future cardiovascular disease events. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, 20 (2014).
33. McGarrah, R. W. *et al.* A novel protein glycan-derived inflammation biomarker independently predicts cardiovascular disease and modifies the association of HDL subclasses with mortality. *Clin. Chem.* **63**, 288–296 (2017).

34. Velavan, P., Huan Loh, P., Clark, A. & Cleland, J. G. F. The cholesterol paradox in heart failure. *Congest. Hear. Fail.* **13**, 336–341 (2007).
35. Rauchhaus, M. *et al.* The relationship between cholesterol and survival in patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**, 1933–1940 (2003).
36. Amigó, N. *et al.* Lipoprotein hydrophobic core lipids are partially extruded to surface in smaller HDL: “Herniated” HDL, a common feature in diabetes. *Sci. Rep.* **18**(6), 19249. <https://doi.org/10.1038/srep19249> (2016).
37. Toth, P. P. *et al.* High-density lipoproteins: A consensus statement from the National Lipid Association. *J. Clin. Lipidol.* **7**, 484–525 (2013).

Acknowledgements

We wish to acknowledge the nurse team that actively participated in the collection of the biobank.

Author contributions

A.T., G.C., J.J., D.M., N.A., A.B.-G. contributed to the conception and design of the work. A.T., N.A., J.A., J.A., C.P.-J., E.C., F.G.-C., E.F.-S., N.V., G.J., J.L.-A., M.D.A., M.D., E.S.-V., P.C., J.L. contributed in the acquisition of the data for the work. A.T. and G.C. performed the analysis and interpretation of the data. Moreover, all authors participated actively in the draft of the manuscript and revisited it critically, approved and agreed with the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by Grants from Fundació La MARATÓ de TV3 (201502 and 201516 to AB-G, 201602-30-31 to NA and JJ), Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2014-59892 to AB-G), AdvanceCat (2014-2020 to AB-G), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)—Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI17-00232 to JJ, PI17-01362 to NA, PI15-00625 to DM, and RED2018-102799-T to JJ), and by CIBER on Cardiovascular Diseases (CIBERCV, CB16/11/00403) and CIBER for Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM, CB15/00071 and CB07/08/0016) are an initiative from ISCIII, Spain with co-funding from the European Regional Development Fund (ERDF). JJ is supported by funds provided by ISCIII (Grant CP1118/00004, Miguel Servet II program).

Competing interests

N. Amigó is stock owner of Biosfer Teslab and has a patent of the lipoprotein profiling described in the present manuscript. The rest of authors have nothing to disclose. The Funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82861-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.T. or N.A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

6. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

Els articles que componen aquesta tesi intenten respondre als objectius de la mateixa, que és identificar les alteracions del perfil lipoproteic avançat i la inflamació sistèmica en la població amb IC crònica mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹ i avaluar si permeten millorar l'estratificació pronòstica més enllà de factors de risc clàssics i biomarcadors coneguts en aquest el camp.

A la vista dels nostres resultats, podem dir que en la població amb IC crònica, l'estudi molecular avançat mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹ permet detectar alteracions tant del perfil lipoproteic avançat com en l'estat inflamatori sistèmic i que, a més, proporcionen valor pronòstic afegit.

De cara a facilitar l'anàlisi dels resultats, es realitza un breu resum dels mateixos agrupats en les dues grans línies de recerca de la present tesi.

6.1. Diferències i utilitat pronòstica de l'estudi del perfil lipoproteic avançat per espectroscòpia de RMN-H¹ en la IC crònica

En el primer article, estudiem les diferències existents en el perfil lipoproteic avançat en IC crònica respecte a una població sense IC. Per aquest motiu, es compara una cohort de 429 pacients amb IC crònica amb 428 individus sense patologia cardiovascular prèvia extrets de la cohort poblacional de l'estudi *Di@bet.es*(77) ajustats per variables com el sexe, l'edat, l'IMC, la presència de diabetis i la teràpia hipolipemiant amb estatines (Taula 1 del primer article). El perfil lipoproteic estudiat per espectroscòpia de RMN-H¹ per a cada cohort està detallat a la taula 2 de la primera publicació. Els pacients

amb IC crònica presenten concentracions més baixes de colesterol total. La mida mitjana de les partícules VLDL, LDL i HDL són significativament més grans en la població amb IC crònica. Els pacients amb IC crònica presenten concentracions més baixes de partícula LDL i HDL, principalment per una menor concentració de la subfracció HDL petita (reducció relativa del 8.5%) en aquesta segona. El nivell de sobrecàrrega de colesterol de les partícules HDL estimada pel quocient HDL-C/P està marcadament elevat en els pacients amb IC quan es compara amb la població sense IC. Les diferències observades són independents de l'origen de la IC, tot i que es troben més acusades en el grup d'IC de causa isquèmica (Taula 1 de Material Suplementari Article 1; apartat Annexes).

Totes les alteracions observades en el compartiment de les partícules HDL (reducció en la concentració total de partícules HDL, reducció de la subfracció petita de l'HDL, mida global de partícula HDL més gran i nivell de sobrecàrrega de colesterol de les partícules HDL més alt) persisteixen tot i l'ajustament per classe funcional de la NYHA o l'IMC. Dites alteracions presenten una gradació cap a empitjorament si comparem els subjectes sense IC, pacients amb IC i classe funcional I-II de la NYHA i pacients amb classe funcional més evolucionada (III-IV) (Taula 3 del primer article). De la mateixa manera, hem observat que tant la concentració total de partícules HDL com de la subfracció petita de la HDL presenten una correlació positiva significativa amb els valors de la fracció d'ejecció ventricular esquerra [$\rho=0.18$ (IC 95% 0.08-0.27), $p<0.001$ i $\rho=0.14$ (IC 95% 0.04-0.23), $p<0.01$, respectivament], i una correlació negativa amb els nivells dels biomarcadors d'estrès miocardiàc (NT-proBNP) [$\rho=-0.21$ (IC 95% -0.31; -0.12), $p<0.001$ i $\rho=-0.34$ (IC 95% -0.42; -0.25), $p<0.001$, respectivament] i d'inflamació, fibrosi i remodelat ventricular (ST2) [$\rho=-0.19$ (IC 95% -0.30;-0.07), $p<0.01$ i $\rho=-0.28$ (IC 95% -0.39;-0.18), $p<0.001$, respectivament], suggerint que les alteracions

observades en el compartiment de les partícules HDL no són únicament un marcador de la presència d'IC, sinó que semblen un marcador de la progressió de la malaltia (Taula 4 del primer article).

En el segon article, estudiem la utilitat pronòstica de les alteracions observades en el compartiment de les partícules HDL en la població amb IC crònica. L'objectiu principal és valorar l'associació de la concentració de partícules HDL, de la seva subfracció petita, de la mida de la partícula HDL i el nivell de sobrecàrrega de colesterol de les partícules HDL estimada pel quocient HDL-C/P, amb la mortalitat cardiovascular, usant la mort no cardiovascular com a esdeveniment competitiu. En el seguiment de 422 pacients amb IC crònica, a un seguiment mig de 4.1 anys (0-8 anys), es va observar l'esdeveniment mort cardiovascular en 120 pacients (28.4% del casos). Les característiques basals i el perfil lipoproteic analitzat per espectroscòpia de RMN- H^1 de cada grup es detalla a la taula 1 del segon article. Comparat amb els supervivents, els pacients que presenten mort CV no presentaven diferències significatives en la concentració total de partícules HDL, però si presentaven partícules HDL de mida més gran (8.39 ± 0.17 vs 8.31 ± 0.11 nm, $p < 0.001$) degut a una reducció en el percentatge de la subfracció petita de les HDL (54.6 vs 60%, $p < 0.001$) (Figura 1 del segon article). A més, el quocient HDL-C/P, com a estimador del nivell de sobrecàrrega de colesterol de les partícules HDL, es trobava significativament elevat en els pacients amb IC que presentaven mort CV (51 ± 6.9 vs 48.3 ± 4.6 , $p < 0.001$). L'anàlisi multivariant de COX mostra que, tant la mida mitjana de la partícula HDL, com el quocient HDL-C/P, són predictors independents per a mortalitat cardiovascular en el seguiment [HR 1.21 (IC 95% 1.01-1.47); $p = 0.041$ i HR 1.04 (IC 95% 1.10-1.07); $p = 0.008$, respectivament] juntament amb l'edat, l'etiologia isquèmica i els nivells de NT-proBNP, en models multivariants altament ajustats per variables com

l'edat, sexe, IMC, presència de diabetis, hipertensió arterial, vasculopatia, etiologia isquèmica de la IC, classe funcional de la NYHA avançada (III-IV), nivells de FG, d'hemoglobina, NT-ProBNP, P-LDL i tractament amb IECA/ARA-II, betabloquejants, estatines o DAI (Figura 2 i Taula 3 del segon article). Es va dividir la cohort de pacients amb IC crònica en 4 grups de la mateixa mida, fent servir com a punts de tall les medianes de la mida de partícula HDL i del quocient HDL-C/P (8.32nm i 49.13, respectivament) (Figura 1 de Material Suplementari Article 2, apartat Annexes). Es va observar que els pacients amb partícules HDL de mida més gran i més carregades de colesterol eren els individus amb major risc de presentar l'esdeveniment mort CV en el seguiment [HR 1.94 (IC 95% 1.28-2.96); p=0.002] (Figura 3 del segon article). Donada l'associació de les partícules HDL amb l'estat inflamatori, es va repetir l'anàlisi estadística de regressió de COX afegint als models multivariants les concentracions sèriques de Glic-A i Glic-B, mantenint-se les associacions observades entre la mida de les partícules HDL i el quocient HDL-C/P amb la mort CV.

En resum, les diferències en el perfil lipoproteic avançat estudiat per espectroscòpia de RMN-H¹ en els pacients amb IC crònica se centren principalment en el compartiment de les partícules HDL, on observem que els pacients amb IC presenten menor nombre de partícules HDL, que aquestes són de mida més gran a expenses d'una pèrdua del percentatge de la subfracció petita de HDL i que globalment es troben més carregades de colesterol. Dites alteracions no semblen ser únicament un marcador de la presència d'IC, sinó tenir una relació amb el procés de la patologia, ja que les diferències s'accentuen en els casos amb estats més evolucionats de la malaltia. La mida global de les partícules HDL i el quocient HDL-C/P, com a estimació del nivell de sobrecàrrega de colesterol de dites partícules, es correlaciona amb la mortalitat cardiovascular en el seguiment,

independentment de variables clíniques i biomarcadors coneguts en el camp de la IC.

6.2. Utilitat pronòstica de l'estudi de l'estat inflamatori sistèmic per espectroscòpia de RMN-¹H en la IC crònica

En el tercer article, disponible a l'apartat Annexes de la present tesi doctoral, volem valorar l'estat inflamatori sistèmic mitjançant les concentracions sèriques de Glic-A i Glic-B i explorar la seva capacitat predictora per a l'esdeveniment combinat de mort o ingrés per IC. Es va avaluar també la seva associació amb la mort i l'ingrés per IC com a esdeveniments separats secundaris, i la seva associació amb els ingressos recurrents per IC. Es va usar la mortalitat total com a esdeveniment competitiu per a l'anàlisi de l'esdeveniment secundari de reingrés per IC.

S'avalua la capacitat predictora de Glic-A i Glic-B per a l'esdeveniment combinat en la cohort de 429 malalts amb IC crònica, amb un seguiment mig de 6.6 (3-8.7) anys.

Observem que la concentració de Glic-A presenta una correlació significativa amb l'edat ($\rho = -0.12$, $p=0.030$) i Glic-B presenta una correlació positiva amb nivells de ST2 ($\rho = 0.14$, $p=0.011$).

Degut a una interacció significativa entre les concentracions de Glic-A i Glic-B amb la etiologia isquèmica ($p<0.01$), se separa l'anàlisi en dos subgrups atenent a la etiologia isquèmica o no de la IC. Les característiques basals dels malalts i les concentracions sèriques de Glic-A i Glic-B es detallen a la taula 3.

Taula 2. Característiques basals de la població a estudi del tercer article.

| Taula 2. Característiques basals de la població a estudi | | | | |
|----------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------|------------------|--------|
| Variable | Tota la cohort (n=429) | Etiologia isquèmica | | p |
| | | No (n=224) | Si (n=205) | |
| Edat (anys) | 67.2 ± 13.7 | 64.3 ± 14.6 | 70.3 ± 11.1 | <0.001 |
| Sexe dona | 117 (27.3%) | 77 (34.4%) | 40 (19.5%) | 0.001 |
| IMC (kg/m ²) | 27.3 ± 4.8 | 27.3 ± 5.0 | 27.3 ± 4.6 | 0.940 |
| Fumador actiu | 65 (15.2%) | 37 (16.5%) | 28 (13.7%) | 0.409 |
| Hipertensió arterial | 288 (67.1%) | 140 (62.5%) | 148 (72.2%) | 0.033 |
| Diabetes mellitus | 194 (45.2%) | 86 (38.4%) | 108 (52.7%) | 0.003 |
| Dislipèmia | 279 (65.0%) | 121 (54.0%) | 158 (77.1%) | <0.001 |
| MPOC | 67 (15.6%) | 36 (16.1%) | 31 (15.1%) | 0.787 |
| Infart de miocardi | 152 (35.4%) | 7 (3.1%) | 145 (70.7%) | <0.001 |
| CF de la NYHA III-IV | 93 (21.7%) | 44 (19.6%) | 49 (23.9%) | 0.285 |
| Duració IC (mesos) | 7 (2-39) | 7 (2-36) | 6 (1-39) | 0.532 |
| Hemoglobina (g/dL) | 12.7 ± 1.8 | 12.9 ± 2.0 | 12.6 ± 1.6 | 0.052 |
| FG (mL/min/1.73m ²) | 62.0 ± 34.9 | 68.0 ± 37.7 | 55.5 ± 30.2 | <0.001 |
| NT-ProBNP (pg/mL) | 1859 (738-4456) | 1452 (499-3444) | 2440 (1075-5404) | <0.001 |
| ST2 (pg/ml)* | 41.3 (30.0-58.9) | 40.3 (27.5-57.0) | 42.0 (31.5-62.2) | 0.065 |
| hs-TnT (pg/ml)† | 30.9 (18.2-47.8) | 25.2 (14.7-41.8) | 35.3 (23.6-52.7) | <0.001 |
| Dades ecocardiogràfiques | | | | |
| Fracció d'ejecció (%) | 35.5 ± 14.1 | 38.3 ± 16.5 | 32.5 ± 10.1 | <0.001 |
| FE>50% | 66 (15.4%) | 56 (25.0%) | 10 (4.9%) | <0.001 |
| Insuficiència mitral >2 | 51 (11.9%) | 28 (12.5%) | 23 (11.2%) | 0.682 |
| Espectroscòpia per RMN-H1 | | | | |
| Glic-A (µmol/L) | 781.8 ± 174.4 | 795.4 ± 193.0 | 766.8 ± 150.5 | 0.090 |
| Gic-B (µmol/L) | 275.7 ± 56.6 | 274.8 ± 60.8 | 276.7 ± 51.7 | 0.729 |
| Tractament basal | | | | |
| Betabloquejants | 395 (92.1%) | 196 (87.5%) | 199 (97.1%) | <0.001 |
| IECA/ARA-II | 365 (85.1%) | 193 (89.2%) | 172 (83.9%) | 0.512 |
| ARM | 282 (65.7%) | 142 (63.4%) | 140 (68.3%) | 0.285 |
| Estatines | 335 (78.1%) | 148 (66.1%) | 187 (91.2%) | <0.001 |
| Antiagregants | 250 (58.3%) | 83 (37.1%) | 167 (81.5%) | <0.001 |
| TRC | 54 (12.6%) | 30 (13.4%) | 24 (11.7%) | 0.599 |
| DAI | 71 (16.6%) | 32 (14.3%) | 39 (19.0%) | 0.187 |

Dades disponibles en 171 i 152 subjectes(*) i en 124 i 114 subjectes (†) amb IC d'etiologia no isquèmica i isquèmica respectivament.

ARM: antagonistes del receptor mineralocorticoid. CF: classe funcional. FG: filtrat glomerular.

IC: insuficiència cardíaca. IMC: índex de massa corporal. MPOC: malaltia pulmonar obstructiva crònica. TRC: teràpia de resincronització cardíaca

6.2.1. Resum dels resultats de l'anàlisi de l'estat inflamatori en el subgrup d'etiologia no isquèmica

En la subpoblació d'IC crònica de causa no isquèmica, l'esdeveniment combinat va ocórrer en 134 pacients (59.8% dels casos) [101 morts (45.1%) i 81 reingressos per IC (36.2%)]. En aquest grup, Glic-B es va associar de forma significativa amb l'esdeveniment combinat (mort o ingrés per IC) i amb l'esdeveniment secundari d'ingrés per IC. Aquesta associació es va mantenir en l'anàlisi multivariant després de l'ajustament per edat i sexe [HR 1.62 (IC 95% 1.18-2.23), $p=0.003$ i HR 1.79 (IC 95% 1.26-2.53), $p<0.001$; respectivament], i també en models clínicament ajustats per edat, sexe, IMC, hipertensió arterial, diabetis, FG, duració de la IC, classe funcional de la NYHA avançada (III-IV), nivells de fracció d'ejecció, NT-proBNP, tractament amb antiagregants i estatines [HR 2.13 (IC 95% 1.46-3.13), $p<0.001$ i HR 2.25 (IC 95% 1.54-3.30), $p<0.001$; respectivament] (Taula 3).

En la subpoblació d'IC crònica de causa no isquèmica, els nivells de Glic-A només es van associar a un increment de risc per a l'esdeveniment combinat de mort o ingrés per IC després de l'ajust multivariant (HR 1.19 95% CI 1.06-1.33, $p=0.004$) (Taula 3).

Donada la correlació positiva de Glic-B amb ST2 (Figura 11), un clar marcador d'inflamació, fibrosi i remodelat ventricular, es va realitzar una anàlisi de sensibilitat afegint aquesta variable en l'anàlisi multivariant en els pacients

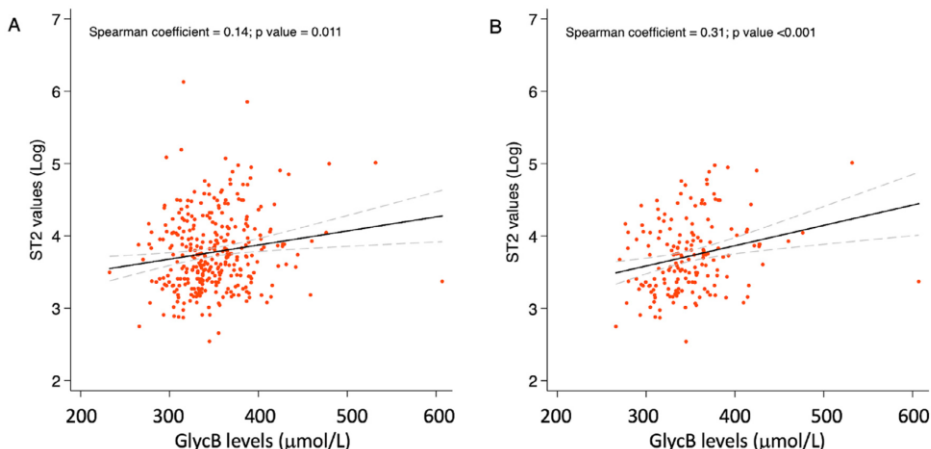
en què disposàvem de ST2 (76% dels casos), no observant-se canvis en l'associació entre Glic-B i els esdeveniments (Taula 4).

Taula 3. Quocient de risc amb interval de confiança del 95% per als esdeveniments clínics associats amb Glic-A i Glic-B en el grup de IC d'etiologia no isquèmica.

| Taula 3. Quocient de risc per als esdeveniments clínics associats amb Glic-A i Glic-B en el grup de IC d'etiologia no isquèmica | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------|------------------|---------|
| | Glic-A | | Glic-B | |
| | HR (IC 95%) | valor p | HR (IC 95%) | valor p |
| Esdeveniment combinat | | | | |
| No ajustat | 1.10 (0.98-1.22) | 0.109 | 1.53 (1.07-2.19) | 0.020 |
| Model 1 | 1.11 (1.01-1.23) | 0.037 | 1.62 (1.18-2.23) | 0.003 |
| Model 2 | 1.19 (1.06-1.33) | 0.004 | 2.13 (1.46-3.13) | <0.001 |
| Mortalitat | | | | |
| No ajustat | 1.00 (0.87-1.15) | 0.967 | 1.03 (0.66-1.59) | 0.912 |
| Model 1 | 1.03 (0.91-1.16) | 0.627 | 1.19 (0.80-1.76) | 0.389 |
| Model 2 | 1.09 (0.94-1.25) | 0.251 | 1.39 (0.86-2.23) | 0.181 |
| Ingrés per IC | | | | |
| No ajustat | 1.09 (0.96-1.22) | 0.218 | 1.90 (1.38-2.61) | <0.001 |
| Model 1 | 1.06 (0.96-1.18) | 0.250 | 1.79 (1.26-2.53) | 0.001 |
| Model 2 | 1.09 (0.95-1.25) | 0.241 | 2.25 (1.54-3.30) | <0.001 |

Model 1 ajustat per edat i sexe. Model 2 ajustat pel model 1 més: índex de massa corporal, hipertensió, diabetes mellitus, filtrat glomerular, duració de la IC, ús d'estatines, antiagregants, classe funcional de la NYHA III-IV, fracció d'ejecció ventricular esquerra i nivells de NTproBNP.

Figura 11. Anàlisi de l'associació entre nivells de Glic-B i ST-2



Anàlisi de l'associació entre nivells de Glic-B i ST-2 mitjançant correlació de Spearman tant per a la cohort global com per al subgrup d'IC d'etiologia no isquèmica.

Taula 4. Quocient de risc amb interval de confiança del 95% per als esdeveniments clínics associats amb Glic-A i Glic-B en el grup de IC d'etiologia no isquèmica amb valors de ST2 disponibles.

| Taula 4. Quocient de risc per als esdeveniments clínics associats amb Glic-A i Glic-B en el grup de IC d'etiologia no isquèmica amb valors de ST2 disponibles | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------|------------------|---------|
| | Glic-A | | Glic-B | |
| | HR (IC 95%) | valor p | HR (IC 95%) | valor p |
| Esdeveniment combinat | 1.19 (1.03-1.36) | 0.015 | 2.65 (1.74-4.03) | <0.001 |
| Mortalitat | 1.06 (0.89-1.27) | 0.506 | 1.87 (1.11-3.17) | 0.020 |
| Ingrés per IC | 1.12 (0.95-1.32) | 0.191 | 2.51 (1.64-3.83) | <0.001 |

Model ajustat per edat i sexe, índex de massa corporal, hipertensió, diabetes mellitus, filtrat glomerular, duració de la IC, ús d'estatines, antiagregants, classe funcional de la NYHA III-IV, fracció d'ejecció ventricular esquerra i nivells de NTproBNP.

A més, en aquest subgrup de població d'IC crònica de causa no isquèmica, només l'addició de Glic-B als models clínics amb valors de NT-proBNP va mostrar una milloria en la predicció dels esdeveniments, amb un increment

significatiu de l'índex estadístic C de Harrell, de 0.752 a 0.773 ($p=0.042$). L'addició de ST2 o Glic-A a aquests models no va aportar milloria en la discriminació dels esdeveniments futurs (Taula 5).

Taula 5. Rendiment dels models per a l'esdeveniment combinat en el subgrup d'IC d'etiologia no isquèmica.

| Taula 5. Rendiment dels models per a l'esdeveniment combinat en el subgrup d'IC d'etiologia no isquèmica | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------|---------|
| | Índex estadístic C de Harrell | IC 95% | valor p |
| Model clínic + NT-proBNP (referència) | 0.752 | (0.705-0.799) | |
| + ST2 | 0.767 | (0.719-0.815) | 0.157 |
| + Glic-A | 0.763 | (0.717-0.809) | 0.106 |
| + Glic-B | 0.773 | (0.728-0.818) | 0.042 |

El model clínic inclou les variables: edat i sexe, índex de massa corporal, hipertensió, diabetes mellitus, filtrat glomerular, duració de la IC, ús d'estatines, antiagregants, classe funcional de la NYHA III-IV i fracció d'ejecció ventricular esquerra.

En la subpoblació d'IC crònica de causa no isquèmica, es va registrar un total de 159 hospitalitzacions per IC en 81 malalts. D'aquests, 22 pacients (27.2%) varen ingressar en tres o més ocasions, i 4 (4.19%) en 5 o més ocasions al llarg del seguiment clínic. Només les concentracions de Glic-B varen mostrar una associació positiva amb el risc d'ingrés recurrent per IC en diferents models multivariants ajustat per diferents variables clíniques com edat i sexe [HR 2.01 (IC 95% 1.09-3.71), $p=0.025$] i també en models clínicament ajustats per edat, sexe, IMC, hipertensió arterial, diabetis, FG, duració de la IC, classe funcional de la NYHA avançada (III-IV), nivells de fracció d'ejecció, NT-proBNP, tractament amb antiagregants i estatines [HR 2.15 (IC 95% 1.26-3.66), $p=0.005$] (Taula 6), amb un clar increment de risc de re-hospitalització

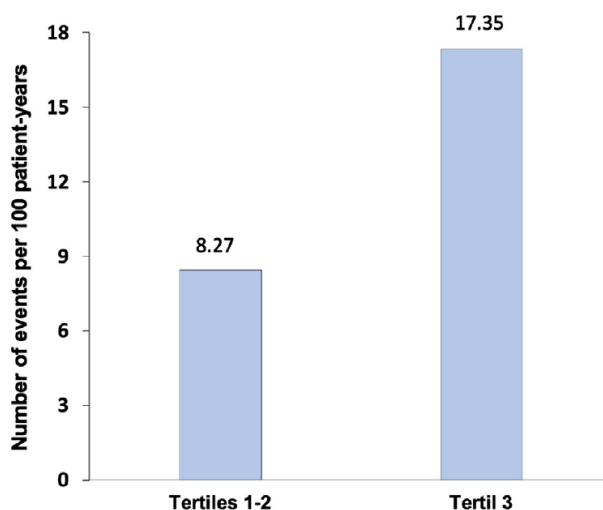
per IC en aquells pacients amb nivells més elevats de Glic-B (Figura 12). Les concentracions de GlicA no va mostrar associació significativa amb el risc d'ingrés recurrent per IC.

Taula 6. Associació entre nivells de Glic-A i Glic-B amb el risc d'ingrés hospitalari recurrent per IC en el subgrup d'etiologia no isquèmica.

| Taula 6. Associació entre les concentracions de Glic-A i Glic-B amb el risc d'ingrés hospitalari recurrent per IC en el subgrup d'etiologia no isquèmica | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------|------------------|---------|
| | Glic-A | | Glic-B | |
| | IRR (IC 95%) | valor p | IRR (IC 95%) | valor p |
| No ajustat | 0.98 (0.83-1.17) | 0.864 | 1.79 (0.94-3.40) | 0.076 |
| Model 1 | 1.06 (0.87-1.29) | 0.543 | 2.01 (1.09-3.71) | 0.025 |
| Model 2 | 1.10 (0.94-1.30) | 0.242 | 2.15 (1.26-3.66) | 0.005 |

Models de regressió negativa binomial. IRR: *incidence rater ratio* (relació de taxa d'incidència). Model 1 ajustat per edat i sexe. Model 2 ajustat pel model 1 més: índex de massa corporal, hipertensió, diabetes mellitus, filtrat glomerular, duració de la IC, ús d'estatines, antiagregants, classe funcional de la NYHA III-IV, fracció d'ejecció ventricular esquerra i nivells de NTproBNP.

Figura 12. Incidència d'ingressos recurrents per IC segons els terçils de Glic-B en el subgrup de pacients d'etiologia no isquèmica



6.2.2. Resum dels resultat de l'anàlisi de l'estat inflamatori en el subgrup d'etiologia isquèmica

En el subgrup d'IC crònica de causa isquèmica, l'esdeveniment combinat va ocórrer en 166 pacients (80.9% dels casos) [147 morts (71.7%) i 97 reingressos per IC (47.3%)]. En aquesta subpoblació de pacients, ni els nivells de concentració de Glic-A ni els de Glic-B es varen associar amb l'esdeveniment combinat principal ni amb cap dels esdeveniments secundaris estudiats (Taula 7).

Taula 7. Quocient de risc amb interval de confiança del 95% per als esdeveniments clínics associats amb Glic-A i Glic-B en el grup de IC d'etiologia isquèmica.

| Taula 7. Quocient de risc per als esdeveniments clínics associats amb Glic-A i Glic-B en el grup de IC d'etiologia isquèmica | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------|------------------|---------|
| | Glic-A | | Glic-B | |
| | HR (IC 95%) | valor p | HR (IC 95%) | valor p |
| Esdeveniment combinat | | | | |
| Univariable | 0.92 (0.79-1.06) | 0.240 | 0.87 (0.57-1.32) | 0.506 |
| Model 1 | 0.96 (0.83-1.10) | 0.532 | 0.98 (0.64-1.49) | 0.928 |
| Model 2 | 1.03 (0.88-1.21) | 0.705 | 0.86 (0.55-1.36) | 0.527 |
| Mortalitat | | | | |
| Univariable | 0.97 (0.84-1.13) | 0.731 | 1.06 (0.68-1.66) | 0.802 |
| Model 1 | 1.03 (0.88-1.20) | 0.718 | 1.22 (0.78-1.90) | 0.386 |
| Model 2 | 1.10 (0.93-1.29) | 0.269 | 1.11 (0.70-1.77) | 0.654 |
| Ingrés per IC | | | | |
| Univariable | 0.85 (0.70-1.04) | 0.123 | 0.74 (0.41-1.33) | 0.314 |
| Model 1 | 0.88 (0.71-1.08) | 0.206 | 0.80 (0.44-1.46) | 0.468 |
| Model 2 | 0.97 (0.77-1.21) | 0.765 | 0.68 (0.36-1.31) | 0.252 |

Model 1 ajustat per edat i sexe. Model 2 ajustat pel model 1 més: índex de massa corporal, hipertensió, diabetes mellitus, filtrat glomerular, duració de la IC, ús d'estatines, antiagregants, classe funcional de la NYHA III-IV, fracció d'ejecció ventricular esquerra i nivells de NTproBNP.

Tampoc es va observar cap associació entre Glic-A ni Glic-B amb el risc de reingrés per IC en aquest subgrup d'etiologia isquèmica (Taula 8).

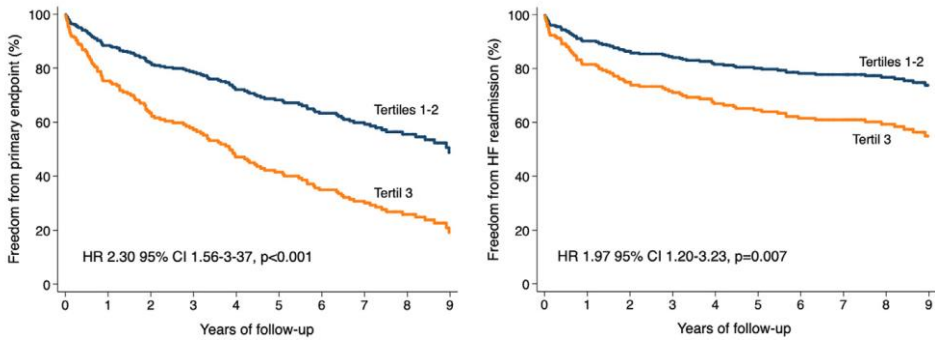
Taula 8. Associació entre nivells de Glic-A i Glic-B amb el risc d'ingrés hospitalari recurrent per IC en el subgrup d'etiologia isquèmica.

| Taula 8. Associació entre les concentracions de Glic-A i Glic-B amb el risc d'ingrés hospitalari recurrent per IC en el subgrup d'etiologia isquèmica | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------|------------------|---------|
| | Glic-A | | Glic-B | |
| | IRR (IC 95%) | valor p | IRR (IC 95%) | valor p |
| No ajustat | 0.95 (0.74-1.21) | 0.656 | 1.84 (0.86-3.94) | 0.118 |
| Model 1 | 1.06 (0.84-1.34) | 0.619 | 1.79 (0.87-3.67) | 0.111 |
| Model 2 | 1.11 (0.88-1.39) | 0.373 | 1.35 (0.69-2.62) | 0.381 |

Models de regressió negativa binomial. IRR: *incidence rater ratio* (relació de taxa d'incidència). Model 1 ajustat per edat i sexe. Model 2 ajustat pel model 1 més: índex de massa corporal, hipertensió, diabetes mellitus, filtrat glomerular, duració de la IC, ús d'estatines, antiagregants, classe funcional de la NYHA III-IV, fracció d'ejecció ventricular esquerra i nivells de NTproBNP.

En resum, la concentració sèrica de Glic-B presenta una associació estadísticament significativa amb l'esdeveniment combinat de mort i ingrés per IC en el grup d'IC crònica d'etiologia no isquèmica. A més, l'addició de Glic-B millora la capacitat de predicció d'aparició d'esdeveniments a models clínics que inclouen biomarcadors coneguts com NT-proBNP en aquest subgrup de pacients. Finalment, Glic-B s'associa de forma significativa amb el risc d'ingrés recurrent per IC en la cohort de pacient amb IC crònica de causa no isquèmica (Figura 13). En el nostre estudi, la concentració de Glic-A només s'associa amb l'esdeveniment combinat de mort o ingrés per IC en aquest subgrup de pacients. Finalment, ni Glic-A ni Glic-B presenten cap associació amb els esdeveniments en els pacients amb IC crònica de causa isquèmica.

Figura 13. Significació clínica de la concentració de Glic-B en la insuficiència cardíaca crònica de causa no isquèmica



Significació clínica de la concentració de Glic-B en la insuficiència cardíaca crònica de causa no isquèmica, tant per a l'esdeveniment combinat de de mort i ingrés per IC (A) com per al risc de re-ingrés per IC (B). Adaptat de Cediel et al.(78), amb permis.

7. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ DELS RESULTATS OBTINGUTS

La present tesi doctoral intenta donar resposta als objectius plantejats. Donat que s'argumenta en dues línies diferenciades, es considera convenient agrupar la discussió dels resultats obtinguts en dos apartats.

7.1. Diferències i utilitat pronòstica de l'estudi del perfil lipoproteic avançant per espectroscòpia de RMN-H¹ en la IC crònica

En el primer article, publiquem una descripció detallada del perfil lipoproteic avançat estudiat mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹ bidimensional en una cohort representativa de la població amb IC crònica atesa en una unitat d'IC en un hospital de tercer nivell, i es compara amb l'obtingut en una població sense IC aparellada amb la primera per edat, sexe, l'IMC, presència de diabetis i tractament amb teràpia hipolipemiant amb estatines. Com hem comentat a l'apartat de resultats, observem que els malalts amb IC crònica presenten clares diferències del perfil lipoproteic. En primer lloc, presenten concentracions més baixes de colesterol total, principalment per un descens en les concentracions de C-LDL i C-HDL. Els pacients amb IC crònica presenten una mida de les 3 classes principals de lipoproteïnes (VLDL, LDL i HDL) més gran que els pacients sense IC i presenten una menor concentració de partícules LDL i HDL, aquesta última deguda, principalment, a una pèrdua del nombre de partícules de la subfracció petita de HDL. A més, els pacients amb IC presenten uns quocients HDL-C/P més elevats, traduint unes HDL més sobrecarregades de colesterol que els controls. Finalment, observem

que aquestes alteracions globalment es mantenen per a diferents nivells de classe funcional de la NYHA, i tenen una tendència a empitjorar a mesura que empitjora la classe funcional. En el segon article, ens centrem en valorar les alteracions observades en el compartiment de les partícules HDL i avaluar la seva associació amb la mortalitat cardiovascular més enllà de variables clíniques i biomarcadors coneguts en IC, demostrant una associació positiva entre la mida de les HDL i en nivell de sobrecàrrega de colesterol de les mateixes amb la mort cardiovascular en el seguiment a llarg termini.

Les concentracions sèriques de colesterol total, C-LDL i P-LDL eren inferiors a la cohort amb IC crònica comparat amb el grup control sense IC. Una possible explicació és que el colesterol total i el C-LDL poden haver disminuït a causa de la IC crònica avançada. La disminució progressiva de les concentracions de colesterol total observada a mesura que empitjora la classe funcional de la NYHA pot alinear-se amb aquesta hipòtesi. A més, concentracions baixes de colesterol total i C-LDL s'han associat anteriorment amb un pitjor pronòstic i una mortalitat global més elevada en pacients amb IC, independentment de la seva etiologia (21). Aquesta explicació, coneguda com la "paradoxa del colesterol", encara que plausible, s'associa habitualment a estats de desnutrició i caquèxia (19,20). De fet, en el segon treball observem que els pacients amb IC que acaben presentant mort cardiovascular tenen concentracions més baixes de colesterol total i C-LDL i són d'edat més avançada, presenten pitjor classe funcional NYHA, nivells més alts de NT-proBNP, més taquicàrdia, més incidència de fibril·lació auricular i requereixen de més diürètics de nansa, traduint estats clínics d'IC més evolucionats. De totes maneres, quan comparem el perfil lipoproteic de la cohort d'IC amb els controls aparellats, observem que les diferències entre les concentracions de colesterol entre els pacients amb IC i els controls es va centrar en el subgrup de malalts amb sobrepès o obesitat, però no en aquells

amb IMC baixos (IMC<25) (Taula 2 de Material Suplementari Article 1, apartat Annexes). Alternativament, estudis in vitro han suggerit que les citocines circulants existents en IC, que actuen com a agents causants de l'augment de la mortalitat, poden disminuir les concentracions de partícules de lipoproteïnes i colesterol mitjançant la disminució de la producció de la lipoproteïna a nivell hepàtic i a un augment de l'activitat del receptor de LDL, amb la conseqüent reducció en nombre de P-LDL. Si fos així, el nombre de partícules LDL podria ser considerat com a un predictor independent de la mortalitat i no només com a un marcador de l'estat nutricional (79,80).

La concentració més baixa de P-LDL i P-HDL observada en la nostra població amb IC, aquesta última deguda principalment a una marcada reducció de la subfracció petita de HDL, ha estat també reportada per Potočnjak et al. i Hunter et al (49–51). Tot i que aquests dos grups usen mètodes diferents per analitzar el nombre de partícules HDL, ambdós acaben observant una associació entre la reducció del nombre de la subfracció petita de HDL amb la mortalitat a 3 mesos i mortalitat global, respectivament. De totes maneres, les cohorts d'estudi d'aquests autors són clarament diferents a la nostra; la primera es tracta d'una mostra petita de pacients ingressats per IC aguda, i la segona es tracta d'una població seleccionada, provinent d'un registre del laboratori d'hemodinàmica cardíaca, el que suposa un biaix de selecció dels malalts. De fet, el 60% de la cohort de Hunter et al. eren de causa isquèmica, amb una proporció que augmentava fins el 66% en els casos amb IC i fracció d'ejecció més reduïda. En la nostra cohort, la cardiopatia isquèmica és només la causa del 48% dels casos d'IC (Taula 2 del segon article), essent per tant més representativa de l'espectre poblacional d'IC crònica.

En el segon article de la tesi, nosaltres també hem publicat aquesta associació entre la reducció de la subfracció petita de les HDL amb la mortalitat cardiovascular, tot i que de forma indirecta. Nosaltres hem

observat que la mida final de la partícula HDL, que en definitiva es calcula a partir de la mitjana ponderada de la mida coneguda de cada subclasse per el nombre de partícules respectiu, està elevada en IC crònica. Això es deu a una reducció en el percentatge de la subfracció petita de HDL, que en el nostre cas és pròxima al 9%. A diferència de Hunter et al i Potočnjak et al, no hem observat cap diferència en el recompte total de P-HDL entre els pacients amb IC supervivents i els que presenten mort cardiovascular en el seguiment. Una explicació és que la nostra cohort d'IC difereix de les dues prèvies, essent més representativa de la IC crònica de la vida real, amb un recompte global de P-HDL total més baix en tota la cohort d'IC, independentment del seu pronòstic futur. En aquest sentit, i tot i que la comparació ha de ser valorada amb cautela perquè es van utilitzar diferents metodologies basades en espectroscòpia de RMN-H¹, el recompte de P-HDL a la nostra cohort és fins i tot menor que en el subgrup d'IC amb fracció d'ejecció reduïda de la població de Hunter et al. (25.7 ± 5.4 vs. 27.2 ± 6.2 $\mu\text{mol/L}$, per a tota la nostra cohort enfront de la cohort de Hunter et al.). A la nostra població d'IC, no es va evidenciar diferències en el C-HDL entre pacients vius i morts, destacant la importància de l'anàlisi de subfraccions HDL sobre el colesterol HDL per al maneig de pacients amb IC.

De forma interessant, hem observat un augment de les diferències del perfil lipoproteic entre malalts amb IC i controls a mesura que empitjora la classe funcional de la NYHA. També hem observat una correlació positiva significativa de la concentració total de partícules HDL i subfracció HDL petita, amb la fracció d'ejecció del ventricle esquerre. Aquestes troballes, juntament amb una correlació negativa d'aquestes diferències amb els nivells de NT-proBNP i ST2, suggereixen una probable associació no només amb la presència d'IC, sinó també amb la severitat de la malaltia. Aquesta observació s'alinea amb observacions prèvies i centra el focus d'atenció en la

importància de la determinació de la concentració de les partícules HDL en la IC (50,81). Resta per aclarir si aquests trastorns en la distribució de les partícules HDL són simplement un marcador en IC o són rellevants en el procés fisiopatològic de la IC. Cal tenir en compte que les HDL poden exercir efectes beneficiosos sobre la funció general del miocardi. Els estudis experimentals han demostrat que les partícules HDL, més enllà de ser partícules transportadores de colesterol, poden protegir contra la isquèmia i reduir el remodelat miocardiàc. A més, la subfracció petita de les HDL pot exercir propietats antiinflamatòries a les cèl·lules endotelials i inhibir l'apoptosi induïda per les LDL oxidades (27).

Pel que fa a la mida de les lipoproteïnes, hem observat que els pacients amb IC crònica presenten un augment de la mida de les 3 classes principals (VLDL, LDL i HDL) en comparació amb els controls sense IC. Els triglicèrids solen provocar canvis en el diàmetre de les lipoproteïnes, però les dues cohorts presenten concentracions de triglicèrids plasmàtics força similars, cosa que suggereix que la mida més gran de les partícules pugui ser una característica específica de la IC. La mida global de les partícules s'ha associat prèviament amb el risc cardiovascular arterioescleròtic (82), però es descriu per un mecanisme mediat principalment per HDL més grans i LDL més petites i denses (82,83), cosa que no coincideix amb les nostres observacions. A la nostra cohort amb IC crònica, la mida més gran de les partícules LDL i HDL era secundària a una clara reducció de les subfraccions petites de LDL i HDL, respectivament, quan es comparava amb els subjectes sense IC. Pel que fa a la mida de les HDL, aquesta s'ha associat positivament amb el risc CV global (83) i la mortalitat per totes les causes (51) i, com s'ha comentat prèviament, en el nostre segon article s'ha pogut demostrar també aquesta associació amb la mort CV en el subgrup d'IC crònica. De la mateixa manera que vàrem trobar per a la concentració total de partícules HDL i de la seva subfracció

petita, hem observat una gradació positiva entre la mida mitjana de les partícules VLDL, LDL i HDL amb classe funcional NYHA. Hunter et al. (51) van informar d'una associació positiva similar de la mida mitjana de les partícules HDL amb grau de disfunció ventricular esquerra, observant que les HDL tenien una mida més petita en els pacients sense IC, més gran en els pacients amb IC i fracció d'ejecció deprimida, mentre que aquells amb IC i fracció d'ejecció preservada presentaven mida de HDL en el rang intermedi. A més, en el nostre primer estudi hem observat una associació positiva entre la mida mitjana de la partícula HDL amb biomarcadors cardíacs, emfatitzant una probable relació de la mida de la partícula HDL tant amb la presència com amb la gravetat de la IC.

Estudis previs han explorat la relació HDL-C/P com a estimació de grau de sobrecàrrega de colesterol de les partícules HDL (21,40,84). L'evidència demostra que la sobrecàrrega de colesterol de les HDL s'ha associat amb la progressió de l'arteriosclerosi carotídia en una població lliure de malaltia, però no hi ha evidència de la seva relació amb el pronòstic en el camp de la IC. En el nostre primer article, observem que els pacients amb IC crònica presenten quocient HDL-C/P més elevats en comparació amb els controls. De la mateixa manera que per la concentració total de partícules HDL, subfracció petita i mida mitjana de les HDL, el quocient HDL-C/P sembla tenir una relació tant amb la presència com amb la severitat de la IC. En el segon article hem demostrat una associació positiva entre aquest quocient HDL-C/P amb la mortalitat cardiovascular en el seguiment. La sobrecàrrega de colesterol de les HDL en la IC és de causa desconeguda. Si pot ser secundària a una alteració en el remodelat de les HDL, una alteració en el transport/sortida de colesterol de les HDL o bé a una eliminació anòmla de HDL grans, ha de ser analitzat. S'ha d'investigar el mecanisme fisiopatològic detallat d'aquesta troballa en IC. L'evidència pel que fa a la influència del

contingut de colesterol de la partícula HDL i el C-HDL amb el risc cardiovascular en el seguiment a llarg termini és controvertida, i podria explicar-se pels complexos mecanismes fisiopatològics implicats en el seu metabolisme (85).

En resum, aquestes troballes suggereixen, principalment, que les alteracions en la concentració de les partícules HDL, la mida, la composició de les HDL i el seu grau de sobrecàrrega en colesterol són marcadors importants per a la mort cardiovascular en pacients amb IC crònica més enllà de les concentracions de colesterol, variables clíniques i biomarcadors coneguts en IC. Fins ara, l'evidència sobre l'associació de P-HDL i les seves subfraccions en pacients amb IC era escassa, i sense dades en població no seleccionada amb IC crònica. La qüestió de si totes les diferències observades en el nostre estudi a la població d'IC tenen un veritable impacte en els resultats cardiovasculars a llarg termini mereixerà més atenció en investigacions futures.

7.2. Utilitat pronòstica de l'estudi de l'estat inflamatori sistèmic per espectroscòpia de RMN-¹H en la IC crònica

Els resultats del tercer article han estat publicats en una revista d'impacte internacional, disponible en l'apartat Annexes de la present tesi(78). En aquest tercer article avaluem l'estat inflamatori sistèmic en pacients amb IC crònica mesurant les concentracions sèriques de Glic-A i Glic-B mitjançant espectroscòpia de RMN-¹H. Tots dos biomarcadors reflecteixen els estats de glicosilació de diverses proteïnes inflamatòries al sèrum. Degut a la forta interacció entre els nivells de glicoproteïnes i la etiologia isquèmica de la IC, es realitza una anàlisi per separat entre IC de causa isquèmica i no isquèmica.

En la IC d'etiologia no isquèmica, hem observat que les concentracions creixents de Glic-A i Glic-B s'associen significativament amb un augment del risc de l'esdeveniment combinat de mort o ingrés per IC en el seguiment. A més, Glic-B presenta una associació positiva amb el risc de primer ingrés o ingrés recurrent per IC. No es va trobar cap implicació pronòstica significativa per al cap dels dos biomarcadors en pacients amb IC d'etiologia isquèmica. En tota la cohort i concretament en pacients amb IC no isquèmica, Glic-B va mostrar una correlació significativa amb ST2, un conegut marcador d'inflamació, fibrosi i remodelació en IC; tanmateix, Glic-A i Glic-B no estaven directament relacionats amb la gravetat de la malaltia mesurada mitjançant el paràmetre classe funcional NYHA. Aquests resultats reforcen la hipòtesi que l'estat inflamatori està directament implicat en la patogènesi i el pronòstic de la insuficiència cardíaca crònica, almenys en la IC d'etiologia no isquèmica.

El nostre estudi situa una vegada més el focus en el paper fonamental que té l'estat proinflamatori sistèmic en la patogènesi i progressió de la IC (68,86). La inflamació i l'activació del sistema immunitari té el potencial d'estimular la fibrosi cardíaca i el remodelat ventricular (67,87), un fenomen essencial subjacent a les anomalies estructurals i funcionals de la IC. L'associació dels marcadors inflamatoris amb IC s'ha identificat prèviament (68,88), alguns fortament associats amb la IC amb fracció d'ejecció conservada (89) i una varietat d'ells s'han provat posteriorment com a objectius potencials prometedors per al tractament de la IC, encara que amb resultats poc conclouents. Sota aquest camp d'investigació en evolució, i malgrat la seva caracterització relativament recent, la mesura de Glic-A i Glic-B mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹ com a marcadors inflamatoris permet l'avaluació d'una via alternativa en la cascada inflamatòria multifactorial (59).

El paper de Glic-A i Glic-B com a marcadors pronòstics s'està reconeixent cada cop més en diferents entorns clínics en l'àmbit cardiovascular com la malaltia arterioscleròtica(64) i la síndrome metabòlica(65) o altres escenaris com la diabetis(60), el càncer(61) o les malalties inflamatòries cròniques(62,63). En el nostre estudi hem trobat una correlació moderada de Glic-B amb ST2 (un marcador d'inflamació ben conegut) en el subgrup de pacients amb IC de causa no isquèmica. De la mateixa manera, la correlació de Glic-A i Glic-B amb diversos marcadors d'inflamació s'ha demostrat prèviament(90,91). Tot i que no existeixen valors de normalitat publicats per a nivells de Glic-A ni Glic-B en població sana per a poder comparar amb els observats a la nostra cohort, els nivells de Glic-A observats en els nostres malalts amb IC crònica (mitjana de $781.8 \pm 174.4 \mu\text{mol/L}$) són clarament superior als publicats per Jang et al. en una cohort de pacients sense patologia CV coneguda (mitjana de $375 \mu\text{mol/L}$), suggerint l'existència d'un estat inflamatori generalitzat en tota la cohort d'IC crònica(66). L'avantatge de mesurar les Glic plasmàtiques a partir de la caracterització de l'àrea dels senyals de Glic-A i Glic-B mitjançant espectroscòpia de RMN- H^1 sobre altres biomarcadors d'inflamació sèrics coneguts és, per un costat, la seva capacitat de representar un conjunt de biomarcadors d'inflamació sistèmica mentre que d'altres com la proteïna C reactiva s'associen a les vies inflamatòries mediades per citoquines com la IL-6 i TNF- α (92). Per l'altra, la mesura de Glic mitjançant espectroscòpia de RMN- H^1 , presenta una menor variabilitat intraindividual i una major precisió analítica(76).

En el context de la IC, prèviament només s'ha estudiat la relació entre Glic-A i l'aparició d'IC en població sana, tal i com es descriu a l'estudi de Jang et al, on es va fer un seguiment de 6507 participants de l'estudi MESA sense malaltia cardiovascular o IC prèvia (66). Van evidenciar que la concentració de Glic-A estava associada amb l'aparició d'IC, sobretot en els pacients amb

IC amb fracció d'ejecció preservada. Des d'una perspectiva diferent i sense precedents, els nostres resultats proporcionen noves evidències sòlides que enforteixen el valor predictiu de Glic-A i, sobretot, Glic-B en la IC de causa no isquèmica, no només d'una manera tradicional avaluant el risc d'ingrés per IC, sinó també establint la seva associació amb el risc d'ingressos recurrents per IC, com a reflex, en opinió nostra, d'una imatge més "realista" de la càrrega de malaltia.

A la nostra cohort, els pacients amb IC no isquèmica van presentar una fracció d'ejecció del ventricle esquerre més alta comparat amb els de causa isquèmica, i almenys una quarta part d'aquest grup corresponen a IC amb fracció d'ejecció preservada. Aquesta diferència és notable tenint en compte les investigacions prèvies que exposen que les elevacions de diversos marcadors inflamatoris són de major magnitud en IC amb fracció d'ejecció conservada que en IC amb fracció d'ejecció reduïda (93–95). Aquesta evidència ha servit prèviament de base per generar la hipòtesi que aquesta associació més elevada es deu a una major càrrega de comorbiditats en la població amb IC i fracció d'ejecció preservada (67). No obstant això, el nostre estudi no recolza aquesta hipòtesi, donada l'absència de diferències en els nivells de Glic-A o Glic-B entre pacients amb IC isquèmica o no isquèmica i la major prevalença de comorbiditats en pacients amb IC d'etiologia isquèmica, amb valors de fracció d'ejecció més baixos. Per tant, no sembla oportú assumir aquest postulat, tenint en compte també que actualment encara no entenem com múltiples factors de risc individuals com la hipertensió, la diabetis o l'obesitat contribueixen individualment al medi inflamatori. El que si sembla necessari és reconèixer que els mecanismes fisiopatològics implicats en la inflamació cardíaca a causa de l'insult no isquèmic poden diferir de la resposta immune desencadenada per la isquèmia miocardiàca, tal com exposa també Carrillo-Salinas et al.(96). Aquest grup, derivat dels

resultats obtinguts en models experimentals, exposa que el lloc d'activació de les cèl·lules immunitàries en l'entorn no isquèmic correspon als ganglis limfàtics mediastítics, i d'una manera diferent, en l'entorn isquèmic, els neutròfils i els monòcits es recluten de la medul·la òssia i la melsa. A més, les cèl·lules immunitàries i les citocines implicades en ambdós processos són força diferents. En aquest sentit, la inflamació induïda per la hipertensió o la sobrecàrrega de pressió cardíaca que existeix habitualment en l'entorn no isquèmic sembla estar dominada principalment per les cèl·lules T CD4+ i interferó- γ (96). Això podria explicar, en part, les diferències observades entre l'associació dels nivells de Glic-A i Glic-B amb el pronòstic dependent de la etiologia de la IC. Sota aquest postulat i a la llum dels nostres resultats que mostren una implicació pronòstica consistent de la inflamació en pacients amb IC crònica no isquèmica, futures investigacions haurien de contemplar aquesta qüestió diferencial a l'hora d'establir possibles objectius terapèutics en aquest entorn clínic.

7.3. Limitacions

Tot i que els resultats dels articles presentats són un reflex de les observacions realitzades en un escenari clínic habitual de pacients amb IC crònica, amb un seguiment clínic molt acurat i amb una anàlisi extensa del perfil molecular avançat de les lipoproteïnes i glicoproteïnes per espectroscòpia de RMN- H^1 , aquests tenen unes limitacions que cal detallar.

En primer lloc, tot i que la inclusió i seguiment clínic dels malalts s'ha realitzat de forma prospectiva, la metodologia d'anàlisi s'ha realitzat des d'un punt de vista observacional i retrospectiu. Podem, per tant, detallar les associacions de les alteracions de les HDL i les concentracions de Glic amb els esdeveniments, però no podem provar la causalitat de les nostres observacions ni podem generar conclusions definitives dels nostres resultats.

Els resultats obtinguts són derivats d'una cohort extensa i representativa de pacients amb IC crònica atesos de forma habitual en una UIC d'un hospital de tercer nivell, però amb inclusió unicèntrica, per la qual cosa els resultats podrien no ser extrapolables a altres poblacions amb IC o en altres contextos socio-econòmics.

La selecció de malalts es va realitzar segons uns criteris d'inclusió ben detallats. No es pot excloure un biaix de selecció de la cohort d'IC al establir els criteris de selecció.

Degut al llarg període d'inclusió dels pacients, no podem excloure la influència dels canvis en el diagnòstic i tractament de la IC i de la dislipèmia que hagin pogut ocórrer en aquest període.

En els tres treballs, es pot haver produir un biaix en la selecció de variables d'ajustament. En el primer, la cohort de subjectes sense IC s'ha seleccionat amb un procés d'ajustament per variables com l'edat, sexe, IMC, diabetis i tractament amb estatines. Les diferències observades en el perfil lipoproteic entre la cohort amb IC i la població sense IC podrien ser diferents en funció de les variables usades per a la selecció de la cohort de control. En el segon i tercer treball, els resultats de les regressions de COX amb models multivariant podrien diferir en funció de les variables de selecció usades. De totes formes, s'ha triat models multivariants extensos, usant les variables estadísticament significatives en l'anàlisi univariant, afegint variables clíniques i/o analítiques rellevants des del punt de vista clínic.

8. CONCLUSIONS

Revisant els resultats obtinguts, podem concloure que:

1. L'estudi molecular avançat mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹ en la població amb IC crònica ha permès detectar alteracions significatives tant en el perfil lipoproteic avançat com en l'estat inflamatori sistèmic, aportant informació pronòstica rellevant en aquesta cohort de pacients, més enllà de factors de risc clàssics i biomarcadors coneguts en aquest camp.
2. Les diferències en el perfil lipoproteic avançat estudiat per espectroscòpia de RMN-H¹ en els pacients amb IC crònica se centren principalment en el compartiment de les HDL, on observem que els pacients amb IC crònica presenten menor concentració de partícules HDL, que aquestes són de mida més gran a expenses d'una pèrdua del percentatge de la subfracció petita de HDL i que, globalment, es troben més carregades de colesterol. Dites alteracions no semblen ser únicament un marcador de la presència d'IC, sinó tenir una relació amb el procés de la patologia, ja que les diferències s'accentuen en els casos més evolucionats de la malaltia.
3. La mida global de les partícules HDL i el quocient HDL-C/P, com a estimació del nivell de sobrecàrrega de colesterol de dites partícules, es correlaciona amb la mortalitat cardiovascular, independentment de variables clíniques i biomarcadors coneguts en el camp de la IC.
4. En els pacients amb IC crònica d'etiologia no isquèmica, l'estudi de l'estat inflamatori valorat a partir de espectroscòpia de RMN-H¹ mostra que la concentració sèrica de Glic-A i Glic-B s'associa a un increment del risc de presentar l'esdeveniment combinat de mort i

ingrés per IC en el seguiment. A més, Glic-B presenta una associació positiva amb el risc de primer ingrés i per a ingrés recurrent per IC. Finalment, Glic-B millora els models de predicció d'esdeveniments futurs al afegir-se a models clínics que inclouen biomarcadors com el NT-proBNP. La concentració sèrica de Glic-A i Glic-B no aporta informació pronòstica en els pacients amb IC crònica d'origen isquèmic.

9. LÍNIES DE FUTUR

Els resultats de la recerca realitzada, expressada en la present tesi doctoral, poden ser una porta a futures línies d'investigació que serveixin per a millorar el coneixement en la fisiopatologia i estratificació pronòstica dels malalts amb IC. En aquest sentit, ens anima a seguir treballant de forma protocol·litzada i ens planteja nous reptes i objectius a estudi. Algunes d'aquestes línies d'investigació podrien ser:

1. Des del punt de vista clínic, avaluar si les alteracions del perfil lipoproteic i les concentracions sèriques de Glic observades es modifiquen a mesura que el procés d'IC evoluciona amb el temps.
2. Determinar si la concentració de partícula HDL, la mida de les HDL (HDL-Sz), el quocient HDL-C/P i el perfil de les glicoproteïnes es modifiquen amb els fàrmacs usats actualment en la IC crònica, per així avaluar si podrien ser usats com a potencial marcador de bona adhesió i/o resposta terapèutica.
3. Determinar la correlació entre les alteracions observades en el nombre de partícules, mida i composició de les HDL mitjançant espectroscòpia de RMN-H¹, amb la seva capacitat antioxidativa, antiinflamatòria o de transport de colesterol en un model experimental amb IC.
4. Avaluar l'associació entre les alteracions sèriques del perfil lipoproteic avançat mitjançant RMN-H¹ i el dipòsit de greix a nivell miocàrdic, com a potencial eina d'anàlisi en la via de la lipotoxicitat.
5. Els presents articles obren també el camp a la tècnica espectroscòpia de RMN-H¹ com a 'nova' eina per a l'estudi d'altres metabòlits d'interès en IC.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov;392(10159):1736–88.
2. Instituto Nacional de Estadística . Defunciones según la Causa de Muerte [Internet]. 2019. Available from: <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=6609>
3. Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, Hoes AW. Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2020 Aug;22(8):1342–56.
4. Lippi G, Sanchis-Gomar F. Global epidemiology and future trends of heart failure. *AME Med J*. 2020 Jun;5:15–15.
5. Cook C, Cole G, Asaria P, Jabbour R, Francis DP. The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol*. 2014 Feb;171(3):368–76.
6. Tomasoni D, Adamo M, Anker MS, Haehling S, Coats AJS, Metra M. Heart failure in the last year: progress and perspective. *ESC Hear Fail*. 2020 Dec 5;7(6):3505–30.
7. Mamas MA, Sperrin M, Watson MC, Coutts A, Wilde K, Burton C, et al. Do patients have worse outcomes in heart failure than in cancer? A primary care-based cohort study with 10-year follow-up in Scotland. *Eur J Heart Fail*. 2017;19:1095–104.

8. Jones NR, Roalfe AK, Adoki I, Hobbs FDR, Taylor CJ. Survival of patients with chronic heart failure in the community: a systematic review and meta-analysis Methods and results. *Eur J Heart Fail.* 2019;21:1306–25.
9. Crespo-Leiro MG, Anker SD, Maggioni AP, Coats AJ, Filippatos G, Ruschitzka F, et al. European Society of Cardiology Heart Failure Long-Term Registry (ESC-HF-LT): 1-year follow-up outcomes and differences across regions. *Eur J Heart Fail.* 2016 Jun 20;18(6):613–25.
10. Amor AJ, Serra-Mir M, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Fitó M, et al. Prediction of Cardiovascular Disease by the Framingham-REGICOR Equation in the High-Risk PREDIMED Cohort : Impact of the Mediterranean Diet Across Different Risk Strata. *JAHA.* 2017;6(3):1–14.
11. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation.* 2019 Sep 10;140(11).
12. Kleindorfer DO, Towfighi A, Chaturvedi S, Cockcroft KM, Gutierrez J, Lombardi-Hill D, et al. 2021 Guideline for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2021 Jul;52(7).
13. Collet J-P, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment

- elevation. *Eur Heart J*. 2021 Apr 7;42(14):1289–367.
14. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020 Jan 14;41(3):407–77.
 15. Bielecka-Dabrowa A, Bytyçi I, Von Haehling S, Anker S, Jozwiak J, Rysz J, et al. Association of statin use and clinical outcomes in heart failure patients: a systematic review and meta-analysis. *Lipids Health Dis*. 2019 Dec 31;18(1):188.
 16. Tavazzi L, Maggioni A, Marchioli R, Barlera S, Franzosi M, Latini R, et al. Effect of rosuvastatin in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised , double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008;372(9645):1231–9.
 17. Kjekshus J, Apetrei E, Barrios V, Böhm M, Cleland JGF, Cornel JH, et al. Rosuvastatin in Older Patients with Systolic Heart Failure. *N Engl J Med*. 2007 Nov 29;357(22):2248–61.
 18. Krum H, Ashton E, Reid C, Kalff V, Rogers J, Amarena J, et al. Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study of High-Dose HMG CoA Reductase Inhibitor Therapy on Ventricular Remodeling, Pro-Inflammatory Cytokines and Neurohormonal Parameters in Patients With Chronic Systolic Heart Failure. *J Card Fail*. 2007 Feb;13(1):1–7.
 19. Velavan P, Huan Loh P, Clark A, Cleland JGF. The Cholesterol Paradox in Heart Failure. *Congest Hear Fail*. 2007 Nov;13(6):336–41.
 20. Rauchhaus M, Clark AL, Doehner W, Davos C, Bolger A, Sharma R, et al. The relationship between cholesterol and survival in patients with

- chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Dec;42(11):1933–40.
21. Sakatani T, Shirayama T, Suzaki Y, Yamamoto T, Mani H, Kawasaki T, et al. The Association Between Cholesterol and Mortality in Heart Failure Comparison Between Patients With and Without Coronary Artery Disease. *Int Heart J*. 2005;46(4):619–29.
 22. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021 Sep 21;42(36):3599–726.
 23. Velagaleti RS, Massaro J, Vasan RS, Robins SJ, Kannel WB, Levy D. Relations of Lipid Concentrations to Heart Failure Incidence. *Circulation*. 2009 Dec 8;120(23):2345–51.
 24. Mehra MR, Uber PA, Lavie CJ, Milani R V., Park MH, Ventura HO. High-density Lipoprotein Cholesterol Levels and Prognosis in Advanced Heart Failure. *J Hear Lung Transplant*. 2009 Sep;28(9):876–80.
 25. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al. Effects of Dalcetrapib in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2012 Nov 29;367(22):2089–99.
 26. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*. 2012 Aug;380(9841):572–80.
 27. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*. 2011 Oct;17(10):594–603.
 28. Toth PP, Barter PJ, Rosenson RS, Boden WE, Chapman MJ, Cuchel M,

- et al. High-density lipoproteins: A consensus statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol*. 2013 Sep;7(5):484–525.
29. Mishra M, Geest B De. High - Density Lipoprotein - Targeted Therapies for Heart Failure. *Biomedicines*. 2020;8(12):620.
 30. Jackson AO, Meng J, Tang H, Yin K. High-density lipoprotein-mediated cardioprotection in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2021 Jul 27;26(4):767–80.
 31. Otvos JD, Collins D, Freedman DS, Shalurova I, Schaefer EJ, McNamara JR, et al. Low-Density Lipoprotein and High-Density Lipoprotein Particle Subclasses Predict Coronary Events and Are Favorably Changed by Gemfibrozil Therapy in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Circulation*. 2006 Mar 28;113(12):1556–63.
 32. Kuller LH, Grandits G, Cohen JD, Neaton JD, Prineas R. Lipoprotein particles, insulin, adiponectin, C-reactive protein and risk of coronary heart disease among men with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2007 Nov;195(1):122–8.
 33. McGarrah RW, Craig DM, Haynes C, Dowdy ZE, Shah SH, Kraus WE. High-density lipoprotein subclass measurements improve mortality risk prediction, discrimination and reclassification in a cardiac catheterization cohort. *Atherosclerosis*. 2016 Mar;246:229–35.
 34. El Harchaoui K. High-Density Lipoprotein Particle Size and Concentration and Coronary Risk. *Ann Intern Med*. 2009 Jan 20;150(2):84.
 35. Parish S, Offer A, Clarke R, Hopewell JC, Hill MR, Otvos JD, et al. Lipids

- and Lipoproteins and Risk of Different Vascular Events in the MRC/BHF Heart Protection Study. *Circulation*. 2012 May 22;125(20):2469–78.
36. Mackey RH, Greenland P, Goff DC, Lloyd-Jones D, Sibley CT, Mora S. High-Density Lipoprotein Cholesterol and Particle Concentrations, Carotid Atherosclerosis, and Coronary Events: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol*. 2012 Aug;60(6):508–16.
37. Mora S, Glynn RJ, Ridker PM. High-Density Lipoprotein Cholesterol, Size, Particle Number, and Residual Vascular Risk After Potent Statin Therapy. *Circulation*. 2013 Sep 10;128(11):1189–97.
38. Otvos JD, Mora S, Shalurova I, Greenland P, Mackey RH, Goff DC. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. *J Clin Lipidol*. 2011 Mar;5(2):105–13.
39. Holmes MV., Millwood IY, Kartsonaki C, Hill MR, Bennett DA, Boxall R, et al. Lipids, Lipoproteins, and Metabolites and Risk of Myocardial Infarction and Stroke. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Feb;71(6):620–32.
40. Qi Y, Fan J, Liu J, Wang W, Wang M, Sun J, et al. Cholesterol-Overloaded HDL Particles Are Independently Associated With Progression of Carotid Atherosclerosis in a Cardiovascular Disease-Free Population. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Feb;65(4):355–63.
41. Albers JJ, Slee A, Fleg JL, O'Brien KD, Marcovina SM. Relationship of baseline HDL subclasses, small dense LDL and LDL triglyceride to cardiovascular events in the AIM-HIGH clinical trial. *Atherosclerosis*. 2016 Aug;251:454–9.
42. Schrutka L, Distelmaier K, Hohensinner P, Sulzgruber P, Lang IM,

- Maurer G, et al. Impaired High-Density Lipoprotein Anti-Oxidative Function Is Associated With Outcome in Patients With Chronic Heart Failure. *J Am Heart Assoc.* 2016 Dec 19;5(12).
43. Chirinos JA, Zhao L, Jia Y, Frej C, Adamo L, Mann D, et al. Reduced Apolipoprotein M and Adverse Outcomes Across the Spectrum of Human Heart Failure. *Circulation.* 2020 May 5;141(18):1463–76.
44. Emmens JE, Jia C, Ng LL, van Veldhuisen DJ, Dickstein K, Anker SD, et al. Impaired High-Density Lipoprotein Function in Patients With Heart Failure. *J Am Heart Assoc.* 2021 May 4;10(9):e019123.
45. Mishra M, Muthuramu I, Aboumsallem J, Kempen H, De Geest B. Reconstituted HDL (Milano) Treatment Efficaciously Reverses Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in Mice. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 30;19(11):3399.
46. Amin R, Muthuramu I, Aboumsallem J, Mishra M, Jacobs F. Selective HDL-Raising Human Apo A-I Gene Therapy Counteracts Cardiac Hypertrophy, Reduces Myocardial Fibrosis, and Improves Cardiac Function in Mice with Chronic Pressure Overload. *Int J Mol Sci.* 2017 Sep 20;18(9):2012.
47. Aboumsallem JP, Mishra M, Amin R, Muthuramu I, Kempen H, De Geest B. Successful treatment of established heart failure in mice with recombinant HDL (Milano). *Br J Pharmacol.* 2018 Nov;175(21):4167–82.
48. Aboumsallem J, Muthuramu I, Mishra M, Kempen H, De Geest B. Effective Treatment of Diabetic Cardiomyopathy and Heart Failure with Reconstituted HDL (Milano) in Mice. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 13;20(6):1273.

49. Degoricija V, Potočnjak I, Gastrager M, Pregartner G, Berghold A, Scharnagl H, et al. HDL subclasses and mortality in acute heart failure patients. *Clin Chim Acta*. 2019 Mar;490:81–7.
50. Potočnjak I, Degoricija V, Trbušić M, Pregartner G, Berghold A, Marsche G, et al. Serum Concentration of HDL Particles Predicts Mortality in Acute Heart Failure Patients. *Sci Rep*. 2017 May 18;7(1):46642.
51. Hunter WG, McGarrah RW, Kelly JP, Khouri MG, Craig DM, Haynes C, et al. High-Density Lipoprotein Particle Subfractions in Heart Failure With Preserved or Reduced Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(2):177–86.
52. Iwasaki Y, Matsuyama H, Nakashima N. Improved Specificity of a New Homogeneous Assay for LDL-Cholesterol in Serum with Abnormal Lipoproteins. *Clin Chem*. 2006 May 1;52(5):886–8.
53. Stein JH, McBride PE. Should advanced lipoprotein testing be used in clinical practice? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006 Dec;3(12):640–1.
54. Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD. Lipoprotein Particle Analysis by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Clin Lab Med*. 2006 Dec;26(4):847–70.
55. Soininen P, Kangas AJ, Würtz P, Tukiainen T, Tynkkynen T, Laatikainen R, et al. High-throughput serum NMR metabonomics for cost-effective holistic studies on systemic metabolism. *Analyst*. 2009;134(9):1781.
56. Mallol R, Amigó N, Rodríguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, et al.

- Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1 H NMR spectroscopy. *J Lipid Res.* 2015 Mar;56(3):737–46.
57. Rankin NJ, Preiss D, Welsh P, Burgess KEV, Nelson SM, Lawlor DA, et al. The emergence of proton nuclear magnetic resonance metabolomics in the cardiovascular arena as viewed from a clinical perspective. *Atherosclerosis.* 2014 Nov;237(1):287–300.
58. Puig-Jové C, Castelblanco E, Falguera M, Hernández M, Soldevila B, Julián MT, et al. Advanced lipoprotein profile in individuals with normal and impaired glucose metabolism. *Rev Española Cardiol (English Ed.)* 2022 Jan;75(1):22–30.
59. Fuertes-Martín R, Correig X, Vallvé J-C, Amigó N. Human Serum/Plasma Glycoprotein Analysis by 1H-NMR, an Emerging Method of Inflammatory Assessment. *J Clin Med.* 2020 Jan 27;9(2).
60. Zierfuss B, Höbaus C, Herz CT, Pesau G, Mrak D, Koppensteiner R, et al. GlycA for long-term outcome in T2DM secondary prevention. *Diabetes Res Clin Pract.* 2021 Jan;171:108583.
61. Suman S, Sharma RK, Kumar V, Sinha N, Shukla Y. Metabolic fingerprinting in breast cancer stages through 1H NMR spectroscopy-based metabolomic analysis of plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 Oct;160:38–45.
62. Dierckx T, Chiche L, Daniel L, Lauwerys B, Van Weyenbergh J, Jourde-Chiche N. Serum GlycA Level Is Elevated in Active Systemic Lupus Erythematosus and Correlates to Disease Activity and Lupus Nephritis Severity. *J Clin Med.* 2020 Mar 31;9(4):970.
63. Dierckx T, Verstockt B, Vermeire S, van Weyenbergh J. GlycA, a

- Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Measure for Protein Glycosylation, is a Viable Biomarker for Disease Activity in IBD. *J Crohn's Colitis*. 2019 Mar 26;13(3):389–94.
64. McGarrah RW, Kelly JP, Craig DM, Haynes C, Jessee RC, Huffman KM, et al. A Novel Protein Glycan–Derived Inflammation Biomarker Independently Predicts Cardiovascular Disease and Modifies the Association of HDL Subclasses with Mortality. *Clin Chem*. 2017 Jan 1;63(1):288–96.
65. Otvos JD, Guyton JR, Connelly MA, Akapame S, Bittner V, Kopecky SL, et al. Relations of GlycA and lipoprotein particle subspecies with cardiovascular events and mortality: A post hoc analysis of the AIM-HIGH trial. *J Clin Lipidol*. 2018 Mar;12(2):348-355.e2.
66. Jang S, Ogunmoroti O, Ndumele CE, Zhao D, Rao VN, Fashanu OE, et al. Association of the Novel Inflammatory Marker GlycA and Incident Heart Failure and Its Subtypes of Preserved and Reduced Ejection Fraction. *Circ Hear Fail*. 2020 Aug;13(8).
67. Paulus WJ, Tschöpe C. A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jul;62(4):263–71.
68. Murphy SP, Kakkar R, McCarthy CP, Januzzi JL. Inflammation in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Mar;75(11):1324–40.
69. Westman PC, Lipinski MJ, Luger D, Waksman R, Bonow RO, Wu E, et al. Inflammation as a Driver of Adverse Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2016 May;67(17):2050–60.
70. Nakayama T, Sugano Y, Yokokawa T, Nagai T, Matsuyama T, Ohta-Ogo

- K, et al. Clinical impact of the presence of macrophages in endomyocardial biopsies of patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2017 Apr;19(4):490–8.
71. Van Linthout S, Miteva K, Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc Res.* 2014 May 1;102(2):258–69.
72. Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpfissinger T-F, Feichtinger J, Zelger B, et al. The Immunology of Fibrosis. *Annu Rev Immunol.* 2013 Mar 21;31(1):107–35.
73. Waddingham MT, Sonobe T, Tsuchimochi H, Edgley AJ, Sukumaran V, Chen YC, et al. Diastolic dysfunction is initiated by cardiomyocyte impairment ahead of endothelial dysfunction due to increased oxidative stress and inflammation in an experimental prediabetes model. *J Mol Cell Cardiol.* 2019 Dec;137:119–31.
74. Dick SA, Epelman S. Chronic Heart Failure and Inflammation What Do We Really Know ? *Circ Res.* 2016;119(1):159–76.
75. Mann DL. Innate Immunity and the Failing Heart. *Circ Res.* 2015 Mar 27;116(7):1254–68.
76. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Morgan SR, Nash AFP. A ¹H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J Pharm Biomed Anal.* 2003 Dec;33(5):1103–15.
77. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia.* 2012 Jan 11;55(1):88–93.

78. Cediel G, Teis A, Codina P, Julve J, Domingo M, Santiago-Vacas E, et al. GlycA and GlycB as Inflammatory Markers in Chronic Heart Failure. *Am J Cardiol.* 2022 Aug;
79. Fraunberger P, Schaefer S, Werdan K, Walli AK, Seidel D. Reduction of Circulating Cholesterol and Apolipoprotein Levels during Sepsis. *Clin Chem Lab Med.* 1999 Jan 1;37(3).
80. Charach G. LDL- Cholesterol and Outcome Prediction in Patients with Congestive Heart Failure. *J Cardiol Curr Res.* 2014 May 20;1(2).
81. Duparc T, Ruidavets J-B, Genoux A, Ingueneau C, Najib S, Ferrières J, et al. Serum level of HDL particles are independently associated with long-term prognosis in patients with coronary artery disease: The GENES study. *Sci Rep.* 2020 Dec 18;10(1):8138.
82. Rowland CM, Shiffman D, Caulfield M, Garcia V, Melander O, Hastie T. Association of cardiovascular events and lipoprotein particle size: Development of a risk score based on functional data analysis. Shimosawa T, editor. *PLoS One.* 2019 Mar 7;14(3):e0213172.
83. van der Steeg WA, Holme I, Boekholdt SM, Larsen ML, Lindahl C, Stroes ESG, et al. High-Density Lipoprotein Cholesterol, High-Density Lipoprotein Particle Size, and Apolipoprotein A-I: Significance for Cardiovascular Risk. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Feb;51(6):634–42.
84. Amigó N, Mallol R, Heras M, Martínez-Hervás S, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC, et al. Lipoprotein hydrophobic core lipids are partially extruded to surface in smaller HDL: “Herniated” HDL, a common feature in diabetes. *Sci Rep.* 2016 May 18;6(1):19249.
85. Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density

- lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *Eur Heart J*. 2017 Aug 21;38(32):2478–86.
86. Shirazi LF, Bissett J, Romeo F, Mehta JL. Role of Inflammation in Heart Failure. *Curr Atheroscler Rep*. 2017 Jun 21;19(6):27.
87. Ng KE, Delaney PJ, Thenet D, Murtough S, Webb CM, Zaman N, et al. Early inflammation precedes cardiac fibrosis and heart failure in desmoglein 2 murine model of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Cell Tissue Res*. 2021 Oct 8;386(1):79–98.
88. Anker SD. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart*. 2004 Apr 1;90(4):464–70.
89. Kalogeropoulos A, Georgiopoulou V, Psaty BM, Rodondi N, Smith AL, Harrison DG, et al. Inflammatory Markers and Incident Heart Failure Risk in Older Adults. *J Am Coll Cardiol*. 2010 May;55(19):2129–37.
90. Malo A-I, Girona J, Ibarretxe D, Rodríguez-Borjabad C, Amigó N, Plana N, et al. Serum glycoproteins A and B assessed by 1H-NMR in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2021 Aug;330:1–7.
91. Malo A-I, Rull A, Girona J, Domingo P, Fuertes-Martín R, Amigó N, et al. Glycoprotein Profile Assessed by 1H-NMR as a Global Inflammation Marker in Patients with HIV Infection. A Prospective Study. *J Clin Med*. 2020 May 4;9(5):1344.
92. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol*. 2018 Apr 13;9.
93. Sanders-van Wijk S, van Empel V, Davarzani N, Maeder MT, Handschin R, Pfisterer ME, et al. Circulating biomarkers of distinct

- pathophysiological pathways in heart failure with preserved vs. reduced left ventricular ejection fraction. *Eur J Heart Fail.* 2015 Oct;17(10):1006–14.
94. Schiattarella GG, Rodolico D, Hill JA. Metabolic inflammation in heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res.* 2021 Jan 21;117(2):423–34.
95. Tromp J, Westenbrink BD, Ouwerkerk W, van Veldhuisen DJ, Samani NJ, Ponikowski P, et al. Identifying Pathophysiological Mechanisms in Heart Failure With Reduced Versus Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* 2018 Sep;72(10):1081–90.
96. Carrillo-Salinas FJ, Ngwenyama N, Anastasiou M, Kaur K, Alcaide P. Heart Inflammation: Immune Cell Roles and Roads to the Heart. *Am J Pathol.* 2019 Aug;189(8):1482–94.

11. ANNEXES

11.1. Material suplementari Primer Article

Disponibile a l'accés web:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1885585721002851?via%3Dihub>

Supplementary Information

Supp Table 1.- Comparison of the lipoprotein profile between ischemic and non-ischemic HF patients

| | Heart Failure | | p |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|--------|
| | Ischaemic | Non-ischaemic | |
| | n=205 | n=224 | |
| Total Cholesterol, mg/dl | 181.80 (32.13) | 207.62 (38.54) | <0.001 |
| Total Triglycerides, mg/dl | 122.46 (44.31) | 135.56 (61.53) | 0.011 |
| VLDL particle number, nmol/L | | | |
| Total | 48.83 (37.81-68.10) | 53.54 (38.58-77.74) | 0.051 |
| Large | 1.39 (1.09-1.69) | 1.39 (1.09-1.84) | 0.443 |
| Medium | 5.45 (4.10-7.10) | 5.82 (4.22-8.47) | 0.001 |
| Small | 42.41 (32.52-59.15) | 46.36 (33.31-68.00) | 0.062 |

| | | | |
|------------------------------------|---------------------|----------------------|--------|
| VLDL-C, mg/dl | 18.53 (13.69-24.44) | 20.29 (15.12-28.89) | 0.001 |
| VLDL-TG, mg/dl | 67.34 (50.82-90.64) | 71.24 (50.98-104.05) | 0.068 |
| VLDL-Z (nm) | 42.17 (0.21) | 42.17 (0.19) | 0.871 |
| | | | |
| LDL particle number, nmol/L | | | |
| Total | 1064 (233-4) | 1238 (285.3) | <0.001 |
| Large | 167.4 (32.2) | 191.0 (39.4) | <0.001 |
| Medium | 298.1 (104.3) | 378.1 (130.6) | <0.001 |
| Small | 598.4 (119.0) | 669.2 (144.2) | <0.001 |
| LDL-C, mg/dl | 101.55 (23.68) | 118.92 (28.86) | <0.001 |
| LDL-TG, mg/dl | 15.75 (4.60) | 18.76 (6.31) | <0.001 |
| LDL-Z (nm) | 21.01 (0.23) | 21.07 (0.25) | 0.005 |
| | | | |
| HDL particle number, μmol/L | | | |
| Total | 24.57 (5.25) | 26.69 (5.40) | <0.001 |
| Large | 0.28 (0.26-0.31) | 0.30 (0.27-0.33) | 0.003 |
| Medium | 10.00 (1.80) | 10.44 (2.13) | 0.023 |
| Small | 14.28 (4.85) | 15.94 (4.86) | <0.001 |
| HDL-C, mg/dl | 46.66 (9.85) | 50.32 (10.61) | <0.001 |
| HDL-TG, mg/dl | 16.30 (14.25-18.98) | 17.29 (14.50-20.81) | 0.020 |
| HDL-Z (nm) | 8.33 (8.26-8.41) | 8.31 (8.25-8.40) | 0.042 |
| | | | |
| HDL-C/P ratio | 49.52 (5.89) | 49.01 (5.78) | 0.361 |

Results expressed as mean ± SD or median (25th-75th) percentiles.

-C: cholesterol content; -TG: triglycerides content; -Z: mean normalized particle size

Supp Table 2.- Comparison between cholesterol, triglycerides and lipoprotein subclasses between heart failure individuals and controls according to body mass index

| | | Heart Failure | Controls | p |
|-------------------------------------|-----------------|----------------------|---------------------|----------|
| | | n=429 | n=428 | |
| | BMI | | | |
| Total Cholesterol, mg/dl | <25 | 200 (39.3) | 209.5 (29.8) | 0.068 |
| | 25 to 30 | 191.9 (39.4) | 216.5 (32.5) | <0.001 |
| | ≥30 | 194.6 (32.6) | 216.9 (39.32) | <0.001 |
| Total Triglycerides, mg/dl | <25 | 107.8 (90.6-136.9) | 88.5 (73.5-109.6) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 114.9 (90.9-151.6) | 113.9 (90.3-140.3) | 0.337 |
| | ≥30 | 129.8 (103.3-157.6) | 132.9 (105.6-165.9) | 0.167 |
| VLDL particle number, nmol/L | | | | |
| Total | <25 | 47.5 (34.6-65.2) | 34.9 (27.3-43.4) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 50.8 (38.5-74.4) | 49.4 (34.5-70.3) | 0.366 |
| | ≥30 | 61.0 (43.3-80.4) | 63.6 (46.3-88.8) | 0.092 |
| Large | <25 | 1.22 (1.01-1.62) | 1.00 (0.81-1.31) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 1.38 (1.14-1.80) | 1.37 (1.02-1.87) | 0.951 |
| | ≥30 | 1.55 (1.29-1.91) | 1.70 (1.30-2.21) | 0.028 |
| Medium | <25 | 5.28 (3.92-6.69) | 3.58 (2.50-4.83) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 5.68 (4.19-7.56) | 4.10 (2.98-5.60) | <0.001 |
| | ≥30 | 6.15 (4.47-8.41) | 4.91 (3.40-6.67) | 0.657 |
| Small | <25 | 40.58 (30.09-57.15) | 30.01 (23.68-38.05) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 44.22 (33.12-63.77) | 42.65 (30.07-62.73) | 0.614 |
| | ≥30 | 53.23 (37.63-71.39) | 56.03 (40.58-80.67) | 0.056 |
| VLDL-C, mg/dl | <25 | 17.8 (13.4-23.7) | 11.7 (7.8-17.1) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 18.9 (14.5-27.1) | 17.2 (11.6-24.4) | 0.016 |
| | ≥30 | 21.2 (16.9-29.6) | 22.0 (16.2-27.9) | 0.665 |

| | | | | |
|------------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|--------|
| VLDL-TG, mg/dl | <25 | (46.5-62.9-85.9) | 45.8 (37.1-57.8) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 69.6 (53.0-96.9) | 65.2 (46.2-90.0) | 0.170 |
| | ≥30 | 80.8 (58.4-108.9) | 82.6 (61.6-111.1) | 0.177 |
| VLDL-Z (nm) | <25 | 42.19 (0.19) | 42.03 (0.30) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 42.17 (0.21) | 41.90 (0.42) | <0.001 |
| | ≥30 | 42.15 (0.20) | 41.85 (0.46) | <0.001 |
| LDL particle number, nmol/L | | | | |
| Total | <25 | 1198 (297.5) | 1306 (229.2) | 0.006 |
| | 25 to 30 | 1129 (284.3) | 1368 (269.4) | <0.001 |
| | ≥30 | 1143 (221.4) | 1353 (325.7) | <0.001 |
| Large | <25 | 189.6 (41.3) | 183.3 (31.1) | 0.246 |
| | 25 to 30 | 176.1 (37.6) | 184.3 (37.2) | 0.033 |
| | ≥30 | 173.0 (31.2) | 178.8 (46.8) | 0.265 |
| Medium | <25 | 373.1 (134.3) | 387.4 (120.7) | 0.437 |
| | 25 to 30 | 326.5 (127.4) | 388.0 (136.1) | <0.001 |
| | ≥30 | 319.0 (98.4) | 357.8 (141.2) | 0.016 |
| Small | <25 | 635.4 (144.2) | 735.6 (115.4) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 626.6 (142.3) | 795.9 (157.6) | <0.001 |
| | ≥30 | 651.5 (117.6) | 816.8 (216.6) | <0.001 |
| LDL-C, mg/dl | <25 | 116.0 (30.2) | 128.7 (24.1) | 0.002 |
| | 25 to 30 | 108.2 (28.5) | 131.8 (27.2) | <0.001 |
| | ≥30 | 107.8 (22.3) | 127.9 (31.7) | <0.001 |
| LDL-TG, mg/dl | <25 | 18.3 (5.8) | 16.1 (4.5) | 0.003 |
| | 25 to 30 | 16.7 (5.8) | 17.4 (5.0) | 0.158 |
| | ≥30 | 17.1 (5.6) | 17.7 (5.5) | 0.386 |
| LDL-Z (nm) | <25 | 21.13 (0.23) | 21.04 (0.28) | 0.013 |
| | 25 to 30 | 21.03 (0.24) | 20.93 (0.37) | 0.002 |
| | ≥30 | 20.95 (0.23) | 20.84 (0.44) | 0.018 |
| HDL particle number, μmol/L | | | | |

| | | | | |
|----------------------|-----------------|------------------|------------------|--------|
| Total | <25 | 25.49 (5.26) | 28.81 (5.20) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 25.48 (5.20) | 28.02 (5.08) | <0.001 |
| | ≥30 | 26.14 (5.87) | 27.13 (4.16) | 0.120 |
| Large | <25 | 0.30 (0.26-0.33) | 0.27 (0.25-0.29) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 0.29 (0.26-0.32) | 0.27 (0.25-0.30) | <0.001 |
| | ≥30 | 0.29 (0.27-0.32) | 0.27 (0.25-0.31) | <0.001 |
| Medium | <25 | 10.56 (2.03) | 9.61 (1.54) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 10.10 (1.83) | 8.97 (1.54) | <0.001 |
| | ≥30 | 9.98 (2.13) | 8.71 (1.32) | <0.001 |
| Small | <25 | 14.62 (4.77) | 18.94 (4.45) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 15.09 (4.82) | 18.77 (4.32) | <0.001 |
| | ≥30 | 15.86 (5.15) | 18.14 (3.88) | <0.001 |
| HDL-C, mg/dl | <25 | 49.3 (10.8) | 56.0 (12.2) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 48.0 (9.9) | 52.2 (11.6) | <0.001 |
| | ≥30 | 48.3 (10.6) | 49.4 (8.9) | 0.371 |
| HDL-TG, mg/dl | <25 | 16.4 (14.4-19.6) | 15.4 (13.3-19.8) | 0.128 |
| | 25 to 30 | 16.8 (14.3-19.1) | 17.2 (14.8-20.0) | 0.565 |
| | ≥30 | 16.8 (14.5-20.4) | 18.3 (14.9-21.3) | 0.555 |
| HDL-Z (nm) | <25 | 8.34 (8.27-8.43) | 8.26 (8.22-8.31) | <0.001 |
| | 25 to 30 | 8.33 (8.26-8.40) | 8.24 (8.18-8.31) | <0.001 |
| | ≥30 | 8.29 (8.24-8.38) | 8.25 (8.18-8.31) | <0.001 |
| HDL-C/P ratio | <25 | 50.32 (6.32) | 50.01 (3.32) | 0.680 |
| | 25 to 30 | 49.10 (5.81) | 47.92 (4.06) | 0.020 |
| | ≥30 | 48.12 (5.25) | 47.02 (3.87) | 0.058 |

Results expressed as mean ± SD or median (25th-75th) percentiles.

Patient number per group: HF and BMI<25: n=139; HF and BMI 25-<30: n=185; HF and BMI ≥30: 104; no-HF and BMI<25: n=77; no-HF and BMI25-<30: n=205; no-HF and BMI≥30: n=146.

-C: cholesterol content; -TG: triglycerides content; -Z: mean normalized particle size

11.2. Material suplementari Segon Article

Disponible a l'accés web: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-82861-6>

SUPPLEMENTARY MATERIAL FILE

Particle size and cholesterol content of circulating HDL correlate with cardiovascular death in chronic heart failure

Author's names and institutions

Teis A; Cediell G; Amigó N; Julve J; Aranyó J; Andrés J; Puig-Jové C; Castelblanco E; Gual-Capllonch F; Ferrer-Sistach E; Vallejo N; Juncà G; López-Ayerbe J; De Antonio M; Domingo M; Santiago-Vacas E; Codina P; Mauricio D; Lupón J; Alonso N; Bayes-Genis A

Supp. Figure 1.- Distribution of HDL-C/P ratio and HDL-Sz in the overall cohort

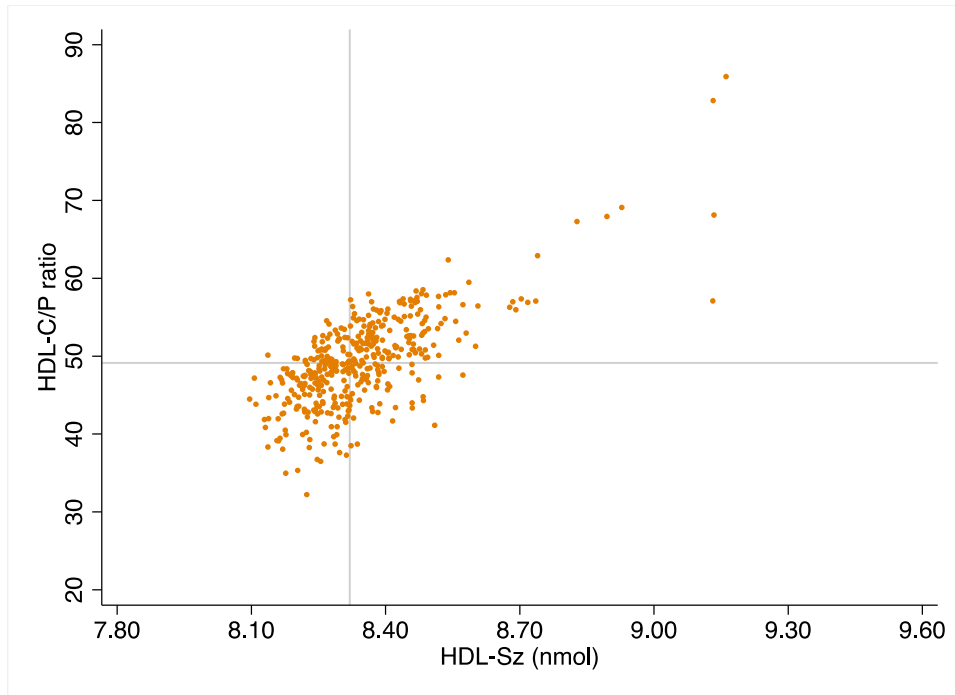


Figure S1 legend: HDL-C/P ratio: Content of Cholesterol per HDL particle.
HDL-Sz: Mean normalized HDL particle size. Nm: nanometers

Supp. Table S1.-Univariable and multivariable Cox Regression Analysis of the associations between HDL-Sz and HDL-C/P ratio with cardiovascular death according to NYHA functional classification.

| | HDL-Sz | | HDL-C/P ratio | |
|-------------------------------------|--------------------|---------|------------------|---------|
| | HR (95% CI) | P value | HR (95% CI) | P value |
| NYHA functional class I-II | | | | |
| Unadjusted | 1.28 (1.05-1.56) | 0.016 | 1.05 (1.01-1.08) | 0.005 |
| Model 1 | 1.21 (0.97-1.51) | 0.087 | 1.03 (0.99-1.01) | 0.119 |
| Model 2 | 1.15 (0.93-1.43) | 0.199 | 1.03 (0.97-1.09) | 0.280 |
| NYHA functional class III-IV | | | | |
| Unadjusted | 1.34 (1.05-1.70) | 0.020 | 1.07 (1.01-1.13) | 0.028 |
| Model 1 | 1.38 (1.07 – 1.78) | 0.012 | 1.06 (1.00-1.13) | 0.044 |
| Model 2 | 1.38 (1.07-1.78) | 0.012 | 1.09 (1.02-1.15) | 0.006 |

Hazard ratios for HDL-Sz reflect 1 SD change in a given measure.

Model 1 Adjusted for age, sex, BMI, diabetes, arterial hypertension, vasculopathy, ischemic etiology, eGFR, Hemoglobin, NT-proBNP, LDL-P and treatment with ACEi/ARB, Betablockers, statins and ICD.

Model 2 Adjusted for Model 1 plus glycoprotein (Gly)-A, Gly-B and Gly-F.

11.3. Tercer article

GlycA and GlycB as Inflammatory Markers in Chronic Heart Failure

Cediel G, Teis A, Codina P, Julve J, Domingo M, Santiago-Vacas E, Castelblanco E, Amigó N, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Am J Cardiol. 2022 Aug 22:S0002-9149(22)00749-4.

doi: 10.1016/j.amjcard.2022.07.019. Epub ahead of print. PMID: 36008162.

GlycA and GlycB as Inflammatory Markers in Chronic Heart Failure

Cediel G, Teis A, Codina P, Julve J, Domingo M, Santiago-Vacas E, Castelblanco E, Amigó N, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Am J Cardiol. 2022 Aug 22:S0002-9149(22)00749-4.

doi: 10.1016/j.amjcard.2022.07.019. Epub ahead of print. PMID: 36008162.

GlycA and GlycB as Inflammatory Markers in Chronic Heart Failure

Cediel G, Teis A, Codina P, Julve J, Domingo M, Santiago-Vacas E, Castelblanco E, Amigó N, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Am J Cardiol. 2022 Aug 22:S0002-9149(22)00749-4.

doi: 10.1016/j.amjcard.2022.07.019. Epub ahead of print. PMID: 36008162.

GlycA and GlycB as Inflammatory Markers in Chronic Heart Failure

Cediel G, Teis A, Codina P, Julve J, Domingo M, Santiago-Vacas E, Castelblanco E, Amigó N, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Am J Cardiol. 2022 Aug 22:S0002-9149(22)00749-4.

doi: 10.1016/j.amjcard.2022.07.019. Epub ahead of print. PMID: 36008162.

GlycA and GlycB as Inflammatory Markers in Chronic Heart Failure

Cediel G, Teis A, Codina P, Julve J, Domingo M, Santiago-Vacas E, Castelblanco E, Amigó N, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Am J Cardiol. 2022 Aug 22:S0002-9149(22)00749-4.

doi: 10.1016/j.amjcard.2022.07.019. Epub ahead of print. PMID: 36008162.

GlycA and GlycB as Inflammatory Markers in Chronic Heart Failure

Cediel G, Teis A, Codina P, Julve J, Domingo M, Santiago-Vacas E, Castelblanco E, Amigó N, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Am J Cardiol. 2022 Aug 22:S0002-9149(22)00749-4.

doi: 10.1016/j.amjcard.2022.07.019. Epub ahead of print. PMID: 36008162.

GlycA and GlycB as Inflammatory Markers in Chronic Heart Failure

Cediel G, Teis A, Codina P, Julve J, Domingo M, Santiago-Vacas E, Castelblanco E, Amigó N, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Am J Cardiol. 2022 Aug 22:S0002-9149(22)00749-4.

doi: 10.1016/j.amjcard.2022.07.019. Epub ahead of print. PMID: 36008162.

GlycA and GlycB as Inflammatory Markers in Chronic Heart Failure

Cediel G, Teis A, Codina P, Julve J, Domingo M, Santiago-Vacas E, Castelblanco E, Amigó N, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Am J Cardiol. 2022 Aug 22:S0002-9149(22)00749-4.

doi: 10.1016/j.amjcard.2022.07.019. Epub ahead of print. PMID: 36008162.

GlycA and GlycB as Inflammatory Markers in Chronic Heart Failure

Cediel G, Teis A, Codina P, Julve J, Domingo M, Santiago-Vacas E, Castelblanco E, Amigó N, Lupón J, Mauricio D, Alonso N, Bayés-Genís A.

Am J Cardiol. 2022 Aug 22:S0002-9149(22)00749-4.

doi: 10.1016/j.amjcard.2022.07.019. Epub ahead of print. PMID: 36008162.

11.4. Material suplementari Tercer Article

Disponible a l'accés web: <https://www.ajconline.org/>

Supp Table 1. Hazard ratios with 95% confidence intervals for clinical endpoints for GlycA and GlycB in ischemic etiology

| | GlycA | | GlycB | |
|---------------------------|------------------|---------|------------------|---------|
| | HR (95% CI) | P value | HR (95% CI) | P value |
| Composite endpoint | | | | |
| Univariable | 0.92 (0.79-1.06) | 0.240 | 0.87 (0.57-1.32) | 0.506 |
| Model 1 | 0.96 (0.83-1.10) | 0.532 | 0.98 (0.64-1.49) | 0.928 |
| Model 2 | 1.03 (0.88-1.21) | 0.705 | 0.86 (0.55-1.36) | 0.527 |
| All-cause death | | | | |
| Univariable | 0.97 (0.84-1.13) | 0.731 | 1.06 (0.68-1.66) | 0.802 |
| Model 1 | 1.03 (0.88-1.20) | 0.718 | 1.22 (0.78-1.90) | 0.386 |
| Model 2 | 1.10 (0.93-1.29) | 0.269 | 1.11 (0.70-1.77) | 0.654 |
| HF readmission | | | | |
| Univariable | 0.85 (0.70-1.04) | 0.123 | 0.74 (0.41-1.33) | 0.314 |
| Model 1 | 0.88 (0.71-1.08) | 0.206 | 0.80 (0.44-1.46) | 0.468 |
| Model 2 | 0.97 (0.77-1.21) | 0.765 | 0.68 (0.36-1.31) | 0.252 |

Model 1 adjusted for age and sex. Model 2 adjusted for model 1 plus: body mass index, arterial hypertension, diabetes mellitus, estimated glomerular filtration rate, HF duration, statins use, antiplatelet therapy, NYHA functional class III-IV, left ventricular ejection fraction and NT-proBNP.

CI, confidence interval; CV, cardiovascular; HF, heart failure; HR, hazard ratio.

Supp Table 2. Hazard ratios with 95% confidence intervals for clinical endpoints for GlycA and GlycB in non-ischemic etiology with available ST2 measurement.

| | GlycA | | GlycB | |
|---------------------------|------------------|---------|------------------|---------|
| | HR (95% CI) | P value | HR (95% CI) | P value |
| Composite endpoint | 1.19 (1.03-1.36) | 0.015 | 2.65 (1.74-4.03) | <0.001 |
| All-cause death | 1.06 (0.89-1.27) | 0.506 | 1.87 (1.11-3.17) | 0.020 |
| HF readmission | 1.12 (0.95-1.32) | 0.191 | 2.51 (1.64-3.83) | <0.001 |

Adjusted for age and sex, body mass index, arterial hypertension, diabetes mellitus, body mass index, estimated glomerular filtration rate, HF duration, statins use, antiplatelet therapy, NYHA functional class III-IV, left ventricular ejection fraction, NT-proBNP and ST2.

CI, confidence interval; CV, cardiovascular; HF, heart failure; HR, hazard ratio.

Supp Table 3. Hazard ratios with 95% confidence intervals for clinical endpoints for GlycA and GlycB in non-ischemic etiology with available hs-TnT measurement.

| | GlycA | | GlycB | |
|---------------------------|------------------|---------|------------------|---------|
| | HR (95% CI) | P value | HR (95% CI) | P value |
| Composite endpoint | 1.25 (1.00-1.56) | 0.047 | 3.08 (1.65-5.76) | <0.001 |
| All-cause death | 1.22 (0.94-1.57) | 0.128 | 2.21 (1.04-4.68) | 0.038 |
| HF readmission | 1.11 (0.85-1.45) | 0.432 | 3.15 (1.52-6.50) | 0.002 |

Adjusted for age and sex, body mass index, arterial hypertension, diabetes mellitus, body mass index, estimated glomerular filtration rate, HF duration, statins use, antiplatelet therapy, NYHA functional class III-IV, left ventricular ejection fraction, NT-proBNP and ST2.

CI, confidence interval; CV, cardiovascular; HF, heart failure; HR, hazard ratio.

Supp Table 4. Performance of Models for the composite endpoint in the non-ischemic etiology group

| | | | Harrell's C statistic and 95% CI | | P value |
|-------------|---|-----------|-------------------------------------|---------------|---------|
| CM | + | NT-proBNP | 0.752 | (0.705-0.799) | |
| (reference) | | | | | |
| | + | ST2 | 0.767 | (0.719-0.815) | 0.157 |
| | + | GlycA | 0.763 | (0.717-0.809) | 0.106 |
| | + | GlycB | 0.773 | (0.728-0.818) | 0.042 |

Clinical model (CM) includes the following variables: age and sex, body mass index, arterial hypertension, diabetes mellitus, estimated glomerular filtration rate, HF duration, statin use, antiplatelet therapy, NYHA functional class III-IV and left ventricular ejection fraction.

Analysis performed in 171 with available ST2 levels in the non-ischemic etiology group.

Supp Table 5. Association between GlycA and GlycB and the risk of HF-related recurrent admissions in ischemic etiology group

| NBreg models | GlycA | | GlycB | |
|--------------|------------------|---------|------------------|---------|
| | IRR (95% CI) | P value | IRR (95% CI) | P value |
| Unadjusted | 0.95 (0.74-1.21) | 0.656 | 1.84 (0.86-3.94) | 0.118 |
| Model 1 | 1.06 (0.84-1.34) | 0.619 | 1.79 (0.87-3.67) | 0.111 |
| Model 2 | 1.11 (0.88-1.39) | 0.373 | 1.35 (0.69-2.62) | 0.381 |

Model 1 adjusted for age and sex. Model 2 adjusted for model 1 plus: body mass index, arterial hypertension, diabetes mellitus, estimated glomerular filtration rate, HF duration, NYHA functional class III-IV, left ventricular ejection fraction and NT-proBNP.

CI, confidence interval; HF, heart failure, IRR, incidence rate ratio; NBreg, negative binomial regression.

UAB

**Universitat Autònoma
de Barcelona**