

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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

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>

TESIS DOCTORAL

MARCADORES SÉRICOS Y ALTERACIONES EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y SU RELACIÓN CON LA DISFUNCIÓN MIOCÁRDICA SUBCLÍNICA EN SUJETOS CON DIABETES MELLITUS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Carlos Puig Jové

DIRECTORES

Dra. Núria Alonso Pedrol

Dr. Dídac Mauricio Puente

TUTOR

Dr. Manel Puig Domingo



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina

Barcelona, 2023

*La felicidad puede hallarse hasta en los más oscuros momentos,
si somos capaces de usar bien la luz.*

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, la Dra **Núria Alonso** y el Dr **Dídac Mauricio**, por toda la ayuda recibida y por guiarme a lo largo de este largo camino. Gracias a los dos por darme la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación y hacerme descubrir la pasión por la lipidología.

A mi tutor de tesis, el Dr **Manel Puig Domingo**, por todo su apoyo y por estimular y fomentar la investigación en mí y en todos los residentes que nos hemos formado en el hospital Universitari Germans Trias i Pujol.

Al Dr **Peter Rossing** y al Dr **Henrik Ullits Andersen**, así como al resto de compañeros del *Steno Diabetes Center*, por su desinteresada colaboración y por su paciencia, por enseñarme Dinamarca y por hacerme sentir uno más dentro del equipo.

A la Dra **Núria Amigó**, por su inestimable ayuda en el desarrollo y consecución de esta tesis, así como por lograr que entendamos lo más difícil de la forma más fácil.

Al Dr **Josep Julve**, por su colaboración y buena predisposición en todo momento.

A mis tutoras de residencia, la Dra **Isabel Salinas** y la Dra **Silvia Pellitero**, por guiarme a lo largo de mi formación como residente.

Al Dr **Jordi Reverter**, por todo lo aprendido.

A mis compañeras de residencia, **Montsita**, **Alejandrita** y **Laurita**, sobre todo, por aguantarme.

A mis colegas de hospital, **Filipe**, **Nacho** y **Dani**, por los buenos momentos vividos.

A mis buenos amigos, los **Coras**, y a toda la **SAGE**, por ser los hermanos que he escogido.

A mis padres, **Fernando** y **M^a Ángeles**, por darme una vida tan plena, por haberme transmitido los valores humanos que me han conducido hasta aquí. Esta tesis es también el fruto de todo vuestro esfuerzo.

A mi hermano pequeño y amigo, **Lucas**, por soportarme y por confiar siempre en mí.

A mis otros padres, **Joquei y Enric**, por toda su ayuda, por tratarme como a un hijo más, y por cuidar tanto de mis niñas.

A los **Charlies**, mis cuñados, por estar siempre allí y por ser cómo sois.

A mis queridos abuelos, **Ramón y M^a Ángeles**, por ser las extraordinarias personas que eran y por seguir guiándome desde allá donde estén. Esta tesis también es por vosotros, que nos contempláis en el que fue vuestro hogar, el planeta azul.

A mi mujer, mi compañera de vida, **Maria**, por ser mi motor en esta vida y por darnos a nuestras preciosas hijas, **Mia y Carla**, gracias a las tres por hacerme tan feliz y por ser mi TODO. Os quiero infinito.

Y, por último, gracias a todos los **pacientes** que han colaborado en los estudios realizados en la presente tesis doctoral, vosotros y vosotras sois la pieza fundamental para que la ciencia avance.

ABREVIATURAS

Se incluye el listado de las principales abreviaturas utilizado en esta tesis:

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGE	<i>Advanced Glycation End-products</i>
apoA1	Apolipoproteína A1
apoB	Apolipoproteína B
AUROC	<i>Area Under the ROC Curve</i>
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DOSY	<i>Diffusion-ordered Spectroscopy</i>
ECV	Enfermedad Cardiovascular
ERC	Enfermedad Renal Crónica
FG	Filtrado Glomerular
GlycA	Glicoproteína A
H/W	<i>Height/Width</i>
HGNA	Hígado Graso No Alcohólico
HIF-1α	<i>Hypoxia-Inducible Factor-1α</i>
HL	Lipasa Hepática
HTA	Hipertensión Arterial
IAM	Infarto Agudo de Miocardio

IC	Insuficiencia Cardiaca
LDL	Lípidos de Baja Densidad
LDLR	Receptor de LDL
LDL-Z	Z-score de LDL
LPL	Lipoproteína Lipasa
MCD	Miocardiopatía Diabética
MESA	<i>Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis</i>
NEFA	<i>Non-Esterified Fatty Acids</i>
PCR	Proteína C Reactiva
p-HDL	Partículas de colesterol de alta densidad
p-IDL	Partículas de colesterol de densidad intermedia
p-LDL	Partículas de colesterol de baja densidad
PLS-DA	<i>Partial Least Squares-discriminant Analysis</i>
ppm	Partes por millón
p-VLDL	Partículas de colesterol de muy baja densidad
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TG	Triglicéridos
TRL	<i>Triglyceride Rich Lipoproteins</i>
VI	Ventrículo Izquierdo
VLDLR	Receptor de VLDL

ÍNDICE

RESUMEN	13
SUMMARY	15
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Enfermedad cardiovascular, diabetes y perfil lipídico	17
1.1.1. El colesterol LDL como factor causal de arterioesclerosis	17
1.1.2. Concepto de riesgo lipídico residual	18
1.1.3. Papel de las lipoproteínas ricas en triglicéridos	19
1.1.4. Efectos de la diabetes en los parámetros lipídicos	21
1.1.5. Papel del perfil lipoproteico avanzado: evidencias de la utilidad de conocer el número de partículas de las lipoproteínas en la caracterización del riesgo cardiovascular.	24
1.1.6. Fundamento técnico de la medición directa de partículas lipoproteicas mediante espectroscopía por resonancia magnética (Liposcale®)	27
1.1.7. Análisis molecular de glicoproteínas plasmáticas asociadas a inflamación sistémica mediante espectroscopía por resonancia magnética	33
1.2. Insuficiencia cardíaca y diabetes.....	36
1.2.1. Miocardiopatía diabética: definición y prevalencia	36
1.2.2. Manifestaciones clínicas de la miocardiopatía diabética	37
1.2.3. Fisiopatología de la miocardiopatía diabética.	38
1.2.4. Papel de GlycA y de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca.....	41
2. JUSTIFICACIÓN	43
3. HIPÓTESIS	45
4. OBJETIVOS	47

5. COMPENDIO DE PUBLICACIONES	49
5.1. Resumen de material y métodos.....	49
5.1.1. Material y métodos del primer artículo	49
5.1.2. Material y métodos segundo artículo.....	51
5.2. Primer artículo	53
5.3. Segundo artículo	65
6. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS.....	79
7. RESUMEN DE LA DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	85
7.1. Comparación del perfil lipoproteico avanzado según el grado de alteración del metabolismo glucémico	86
7.2. Análisis del perfil lipoproteico avanzado en el grupo de sujetos con normogluemia y diferencias en función del sexo y de la edad	88
7.3. Variables asociadas con el perfil lipoproteico proaterogénico en población con normogluemia	89
7.4. Asociación del biomarcador proinflamatorio GlycA con la presencia de disfunción cardiaca en sujetos con diabetes tipo 1	89
7.5. Papel de las lipoproteínas ricas en triglicéridos con la presencia de disfunción cardiaca en sujetos con diabetes tipo 1	91
7.6. Potenciales limitaciones de la tesis.....	92
8. CONCLUSIONES	95
9. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	97
10. BIBLIOGRAFÍA.....	99
11. ANEXOS	113
11.1. Material suplementario del primer artículo.....	113
11.2. Material suplementario del segundo artículo	116

RESUMEN

Es conocido que los parámetros lipídicos convencionales son insuficientes para categorizar debidamente el riesgo cardiovascular en determinados pacientes. Esta limitación es un problema más evidente en sujetos con diabetes, en los que se ha demostrado la presencia de cambios proaterogénicos perceptibles únicamente a nivel del perfil lipoproteico avanzado, caracterizado por alteraciones en el número y tamaño de partículas lipoproteicas, así como en su contenido en colesterol o triglicéridos. Se dispone, no obstante, de escasa información acerca de los cambios producidos a nivel de las lipoproteínas mediante el estudio de sujetos con diferentes alteraciones en el metabolismo de la glucosa provenientes de una misma área geográfica.

Por otro lado, existe evidencia científica de la presencia de una forma de miocardiopatía específica en población con diabetes que puede aparecer en ausencia de hipertensión o cardiopatía isquémica, la miocardiopatía diabética. La etiopatogenia de esta entidad, caracterizada por su carácter subclínico en sus primeros estadios, es compleja y actualmente no está completamente caracterizada, pero dentro de la misma podríamos destacar el papel de la inflamación sistémica y de los fenómenos de lipotoxicidad. Existen pocos estudios que hayan estudiado la implicación de estas vías en el colectivo de población con diabetes tipo 1, especialmente vulnerable a la aparición de insuficiencia cardiaca de etiología no isquémica.

El primer estudio de esta tesis doctoral ha demostrado la presencia de alteraciones en el perfil lipoproteico avanzado entre sujetos en situación de normogluemia en comparación con sujetos con diabetes tipo 2. Estas alteraciones observadas fueron especialmente en lipoproteínas distintas a las LDL, como las VLDL, que también están asociadas con un mayor riesgo cardiovascular y que actualmente no son un objetivo de intervención terapéutica ni una herramienta para la predicción del riesgo cardiovascular. Por otro lado, en sujetos con normogluemia, se ha observado un perfil avanzado más

favorable en mujeres. Por el contrario, los índices de adiposidad relacionados con la resistencia insulínica estaban asociados positivamente con un perfil lipoproteico más proaterogénico. Nuestros hallazgos confirman la utilidad del análisis lipoproteico avanzado para descubrir nuevas dianas terapéuticas y estrategias preventivas en la enfermedad cardiovascular.

En el segundo estudio de esta tesis doctoral, estudiamos el papel del perfil lipoproteico y glicoproteico avanzado como posibles vías implicadas con la aparición de miocardiopatía diabética. En dicho estudio, se ha demostrado una asociación existente entre las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL e IDL) y el biomarcador proinflamatorio GlycA, con la presencia de disfunción miocárdica subclínica en una población sujetos con diabetes mellitus tipo 1 sin enfermedad cardiovascular, con una capacidad predictiva mayor que otros factores de riesgo clásicos reconocidos de insuficiencia cardíaca. De acuerdo con esto, proponemos un papel primordial de las características de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y de la inflamación sistémica reflejada por el biomarcador GlycA en la disfunción miocárdica subclínica en pacientes con diabetes tipo 1.

SUMMARY

Conventional lipid parameters are known to be insufficient to properly categorize the cardiovascular risk of certain patients. This is a more evident problem in subjects with diabetes, in whom the presence of perceptible proatherogenic changes have been demonstrated only at the advanced lipoprotein profile level, characterized by alterations in the number and size of lipoprotein particles, as well as in their cholesterol or triglyceride content. However, there are few data available on the changes produced at the level of lipoproteins when studying subjects with different degrees of impaired glucose metabolism in the same geographic area.

On the other hand, there is scientific evidence of the presence of a specific form of cardiomyopathy in the diabetic population that can occur in the absence of hypertension or ischemic heart disease: diabetic cardiomyopathy. The etiopathogenesis of this entity, characterized by its subclinical course in its early stages, is complex and currently not fully characterized, but within it, we could highlight the role of systemic inflammation and lipotoxicity phenomena. There are few studies on the involvement of these pathways in the population with type 1 diabetes, especially vulnerable to the development of non-ischemic heart failure.

The first study of this doctoral thesis demonstrates the presence of alterations in the advanced lipoprotein profile among patients with normoglycemia compared to patients with type 2 diabetes. The observed alterations were especially seen in lipoproteins other than LDL, such as VLDL, which are also associated with a higher cardiovascular risk and are not currently a target of therapeutic intervention or a tool for cardiovascular risk prediction. On the other hand, we observed a more favorable advanced profile in women with normoglycemia. By contrast, adiposity indexes related to insulin resistance were positively associated with a more proatherogenic lipoprotein profile. Our findings

support the utility of the advanced lipoprotein analysis to uncover new therapeutic targets and preventive strategies in cardiovascular disease.

The second study of this doctoral thesis investigates the role of advanced lipoprotein and glycoprotein profiles as possible pathways involved in the development of diabetic cardiomyopathy. In this study, we demonstrate an association between triglyceride-rich lipoproteins (VLDL and IDL) and the proinflammatory biomarker GlycA, with the presence of subclinical myocardial dysfunction in a population of subjects with type 1 diabetes without cardiovascular disease, with a greater predictive capacity compared with other recognized classic risk factors for heart failure. Therefore, we propose a pivotal role of triglyceride-rich lipoproteins characteristics and systemic inflammation reflected by the GlycA biomarker in subclinical myocardial dysfunction in patients with type 1 diabetes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR, DIABETES Y PERFIL LIPÍDICO.

1.1.1. El colesterol LDL como factor causal de arterioesclerosis.

Desde hace ya décadas, el colesterol se ha convertido en la medida estandarizada para establecer los objetivos terapéuticos y la determinación del riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV), siendo actualmente el colesterol transportado por las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) el factor lipídico más importante y comúnmente utilizado para diagnosticar la dislipemia y evaluar el riesgo cardiovascular de un individuo (1).

El c-LDL es considerado un factor causal directo de arterioesclerosis, existiendo una relación lineal directa entre su concentración sérica y el riesgo de ECV (1). En este sentido, se ha descrito que, independientemente del fármaco utilizado, un descenso de 1mmol/L (± 39 mg/dl) de c-LDL se asocia con una reducción de aproximadamente el 21% del riesgo relativo de sufrir un evento cardiovascular (2). Cabe destacar que, a diferencia de otras variables biológicas como la presión arterial o la glucemia, no existe un límite inferior a partir del cual un descenso de c-LDL no aporte un beneficio en términos de prevención de eventos (3), de allí que incluso se haya llegado a promulgar la hipótesis del “c-LDL cero”, la cual defiende que concentraciones plasmáticas extremadamente bajas de c-LDL debidas a un aumento en la actividad de su receptor (LDLR) no deberían considerarse perjudiciales, sino más bien como un marcador de óptima eficiencia del sistema LDL/LDLR (4). Con los datos referidos queda demostrada la influencia del c-LDL en el riesgo cardiovascular y que, cuanto más intenso sea el descenso logrado de este parámetro, mayor será el descenso de dicho riesgo.

1.1.2. Concepto de riesgo lipídico residual.

En ocasiones los términos c-LDL y LDL se usan indistintamente y ello puede llevar a confusión, dado que hay que tener en cuenta que en la práctica clínica habitual el nivel de LDL en plasma no se determina de forma directa, sino que suele realizarse una estimación indirecta a partir de la cantidad de colesterol contenido en las partículas LDL (p-LDL) en plasma a través de las cifras de colesterol total, el colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y los triglicéridos (5). Este es el motivo por el cual la gran mayoría de los estudios clínicos han basado como variable resultado el c-LDL calculado en plasma, tanto para la estimación del riesgo cardiovascular como para demostrar el beneficio de las diferentes estrategias terapéuticas.

No obstante, en la práctica clínica diaria es frecuente observar que, pese a lograr alcanzar un buen control de los diferentes factores de riesgo cardiovascular, entre ellos el c-LDL, un porcentaje no menospreciable de pacientes siguen presentando eventos cardiovasculares, aspecto conocido como riesgo cardiovascular residual (6). Más concretamente, es frecuente encontrar pacientes en los cuales los parámetros lipídicos convencionales son insuficientes para poder categorizar debidamente su riesgo cardiovascular, y en los que los eventos cardiovasculares siguen teniendo una gran prevalencia en las personas con concentraciones séricas de c-LDL normal o incluso bajo (7), fenómeno conocido como riesgo lipídico residual (6). Por otro lado, se ha constatado que más del 50% de los individuos que han sufrido un primer evento cardiovascular con una edad inferior a los 50 años no cumplen criterios de elegibilidad para el uso de estatinas al presentar concentraciones de c-LDL que podrían considerarse como saludables (8), de allí la importancia de establecer parámetros lipídicos que nos permitan una mejor categorización del riesgo cardiovascular en estos individuos.

Existen otras magnitudes relacionadas con el metabolismo lipídico involucradas en la aterogénesis, y que van más allá de la concentración plasmática de c-LDL, por lo que este riesgo lipídico residual podría explicarse por diferentes parámetros lipídicos, dentro

de las cuales podríamos destacar el descenso del c-HDL, el incremento de las concentraciones de lipoproteína a (Lp(a)), y el aumento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y del colesterol remanente, que englobaría las partículas de colesterol de muy baja densidad (p-VLDL), las de densidad intermedia (p-IDL), y los quilomicrones remanentes, que formarían parte del colesterol no-HDL (c-no-HDL) (9, 10).

Por otro lado, se ha demostrado que diferentes alteraciones cualitativas y cuantitativas en las distintas subclases de partículas lipoproteicas, únicamente perceptibles mediante la determinación de un perfil lipoproteico avanzado, también podrían justificar en parte el riesgo lipídico residual, de allí la importancia de estudiar la distribución de las lipoproteínas que transportan el colesterol, ya que este factor juega un papel fundamental en el riesgo individual de ECV (7). Los test avanzados de lipoproteínas pueden mostrar patrones de distribución de las partículas lipoproteicas, su contenido en colesterol y triglicéridos, su número y tamaño, y aportarnos valores independientes para calcular y reclasificar el riesgo cardiovascular individual, en contraposición a la concentración de colesterol total o c-LDL, que son parámetros lipídicos considerados como clásicos o tradicionales.

1.1.3. Papel de las lipoproteínas ricas en triglicéridos.

Las lipoproteínas ricas en triglicéridos, del inglés *triglyceride rich lipoproteins* (TRL), son partículas lipoproteicas generadas mayoritariamente a nivel hepático, y caracterizadas por su alto contenido en triglicéridos. Los ésteres de colesterol y los triglicéridos son los dos lípidos circulantes más importantes. Debido a su naturaleza hidrofóbica, se combinan con lipoproteínas que les permiten ser transportados en el plasma. El colesterol es transportado por todas las lipoproteínas, y se concentra especialmente en las partículas de colesterol de alta densidad (p-HDL) y en las p-LDL. En general, los triglicéridos se transportan en el plasma en las VLDL, las IDL, los quilomicrones, y en sus remanentes. Las TRL están compuestas por un núcleo de triglicéridos y ésteres de

colesterol y una monocapa superficial que comprende fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas, siendo éstas últimas un elemento importante en la regulación del transporte y metabolismo de estas lipoproteínas.

Aunque se ha centrado principalmente en las LDL como factor de riesgo para la ECV, se ha demostrado que las TRL también atraviesan la pared endotelial y, por dicho motivo, son consideradas también cómo lipoproteínas proaterogénicas y están implicadas en la etiopatogenia de la arteriosclerosis (11, 12). Es importante tener en cuenta que, a diferencia de las LDL, que deben oxidarse para unirse a los macrófagos, los remanentes ricos en triglicéridos pueden ser captados directamente sin sufrir modificación oxidativa previa, lo que conduce a la formación de células espumosas, y posteriormente al desarrollo de la placa aterosclerótica (13). Contamos con evidencia científica que respalda la aterogenicidad de las TRL y del colesterol remanente (12, 14), aspecto también descrito de forma específica en población con diabetes (15) y en sujetos con sobrepeso u obesidad (16). Por otro lado, se ha demostrado que tanto el c-no-HDL como las concentraciones de apolipoproteína B (apoB) presentan una correlación positiva superior al c-LDL con el riesgo residual de mortalidad por cualquier causa y de infarto agudo de miocardio (IAM) en pacientes que reciben tratamiento con estatinas (17).

Además, la presencia de concentraciones altas de TRL se ha visto asociada con otros reconocidos factores de riesgo cardiovascular, tales como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la enfermedad renal crónica (ERC) y la resistencia insulínica. Por todos estos motivos, las últimas guías de prevención cardiovascular han introducido el c-no-HDL, en contraposición del colesterol total, en las herramientas de estratificación del riesgo cardiovascular SCORE₂ (18).

1.1.4. Efectos de la diabetes en los parámetros lipídicos.

En los sujetos con diabetes, se han observado diversas alteraciones en el perfil lipoproteico avanzado, incluyendo un aumento en el número de las p-LDL y p-VLDL, así como una disminución de las p-HDL (19). La dislipemia aterogénica, propia de sujetos con diabetes, se caracteriza por un incremento de los niveles de triglicéridos totales, así como por un descenso del c-HDL. Además, es frecuente ver asociado un incremento de las VLDL e IDL ricas en triglicéridos, así como un aumento, habitualmente moderado, de las concentraciones de LDL, con un claro predominio de LDL pequeñas y densas. En resumen, este tipo de dislipemia se caracteriza, por tanto, por un aumento de las partículas proaterogénicas y una disminución de las partículas antiaterogénicas.

La insulinoresistencia característica de la diabetes favorece un aumento de la liberación de ácidos grasos libres no esterificados (del inglés, *non-esterified fatty acids*, NEFA) desde los adipocitos, lo que a su vez induce la síntesis hepática de triglicéridos y un aumento en la producción de ApoB, resultando en la sobreproducción de VLDL ricas en triglicéridos (20-22). Tras la acción de la lipoproteína lipasa (LPL) sobre estas partículas, enzima que se expresa principalmente en tejido adiposo y musculoesquelético, se producen IDL con mayor contenido en triglicéridos y con menor contenido en colesterol que son a su vez metabolizadas por la lipasa hepática (HL), la cual se encuentra característicamente más activa en pacientes con DM2, favoreciendo así la producción de LDL más densas y de menor tamaño (23). Además, al estar la LPL característicamente menos activa en la diabetes, las TRL se mantienen más tiempo en circulación, e intercambian más triglicéridos con las LDL circulantes a través de la enzima CETP (proteína de transferencia de ésteres de colesterol), produciendo un enriquecimiento del contenido en triglicéridos de las LDL para, posteriormente y por acción de la HL (más activa), dar lugar nuevamente a LDL de menor tamaño, todo ello característico de la dislipemia aterogénica (23). Estas lipoproteínas LDL de menor tamaño presentan menor afinidad por el receptor LDL (24) y una mayor tendencia a la

transmigración endotelial y al acúmulo subendotelial (23). Por otro lado, al estar más tiempo en circulación, son más proclives a sufrir modificaciones producidas por la propia hiperglucemia, el estrés oxidativo, así como a su carbamilación (25-27).

El resultado de todas estas modificaciones es la generación de compuestos lipídicos que tienen mayor actividad inflamatoria, apoptótica y proliferativa y, por tanto, una mayor tendencia a la formación de la lesión ateromatosa. Por otra parte, estas modificaciones fragmentan la apoB e incrementan su carga negativa, favoreciendo la agregación y unión a los proteoglicanos de la pared arterial, con el consecuente acúmulo de las LDL y la formación de células espumosas (27, 28).

La figura 1 representa varias de las alteraciones típicas en el metabolismo de las lipoproteínas proaterogénicas en sujetos con diabetes.

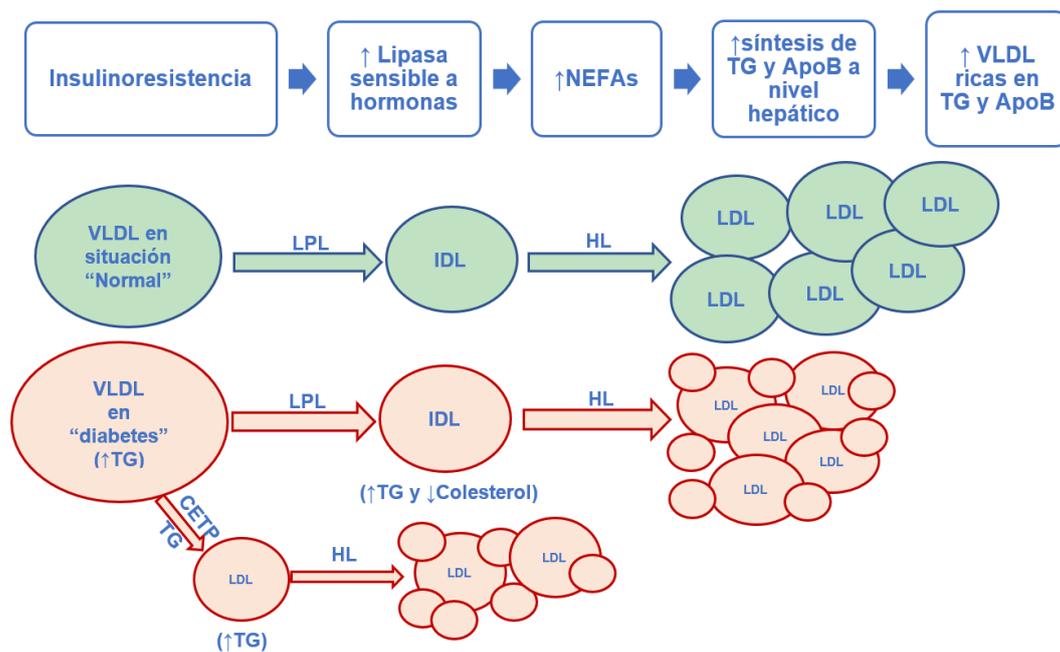


Figura 1: Representación gráfica de las alteraciones del metabolismo alterado de las lipoproteínas propio de la dislipemia aterogénica en sujetos con diabetes. ApoB: apolipoproteína B. CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol. HL: Lipasa hepática. IDL: lipoproteínas de densidad intermedia. LDL: lipoproteínas de baja

densidad. LPL: Lipoproteína lipasa. NEFAs: ácidos grasos no esterificados. TG: triglicéridos. VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Por otro lado, se ha observado una disminución del colesterol HDL (c-HDL) y de las p-HDL en los sujetos con diabetes. Esta disminución de las p-HDL se debe, en parte, a que las TRL compiten con las HDL por la enzima CETP. La CETP es una glicoproteína producida por el hígado que, de forma similar a lo que ocurre con las LDL, promueve también el intercambio de triglicéridos desde las VLDL e IDL a las HDL, así como de colesterol desde las HDL a las lipoproteínas ricas en apoB (VLDL e IDL). Esto explica que, en la diabetes, especialmente en presencia de hipertrigliceridemia, se produzca un enriquecimiento en el contenido de triglicéridos de las HDL, lo que va a terminar afectando a su catabolismo (23). Estas HDL ricas en triglicéridos son sustrato para la LPL endotelial y para la HL, que hidrolizan sus triglicéridos, resultando en HDL de menor tamaño y con escaso contenido en colesterol. Además, la hidrólisis de los triglicéridos contenidos en las HDL induce la disociación de la apolipoproteína AI (apoAI), principal proteína de estas lipoproteínas, favoreciendo su catabolismo renal (29). Estos dos efectos explican las concentraciones bajas de c-HDL y p-HDL en los sujetos con DM2. A esto, hay que añadir que estas HDL presentan una menor capacidad de captación periférica de colesterol y, por tanto, son consideradas más disfuncionales en su papel antianterogénico dentro del transporte reverso de colesterol (30).

En conclusión, las alteraciones en el perfil lipoproteico avanzado, incluyendo el aumento de las TRL (p-VLDL y p-IDL), el aumento de p-LDL pequeñas y densas, así como el descenso de las p-HDL, representan los componentes aterogénicos más importantes de la dislipemia diabética. Estas anomalías lipídicas, que caracterizan la dislipemia aterogénica en el paciente con diabetes, están estrechamente relacionadas entre sí desde el punto de vista metabólico. Por todo ello, su evaluación puede ser útil para identificar a aquellos pacientes con diabetes con un mayor riesgo cardiovascular y que, por lo tanto, puedan beneficiarse de un tratamiento hipolipemiente más intensivo.

1.1.5. Papel del perfil lipoproteico avanzado: evidencias de la utilidad de conocer el número de partículas de las lipoproteínas en la caracterización del riesgo cardiovascular.

Durante años, la resonancia magnética nuclear (RMN) ha sido utilizada para medir la concentración, tamaño, y composición de las diferentes partículas lipoproteicas presentes en suero o plasma.

Como ya se ha comentado, las características de las partículas lipoproteicas (número, tamaño y contenido en colesterol y triglicéridos) van a definir su potencial aterogénico (31). La pared arterial intacta puede ser atravesada libremente por las p-LDL, así como por otras lipoproteínas asociadas con la apoB (VLDL e IDL), cuyo diámetro sea inferior a 70-80 nm. De tal forma que, tanto la concentración como el tamaño de las partículas circulantes, así como la permeabilidad de la pared arterial, van a ser factores claves que condicionarán el influjo trans-endotelial de estas lipoproteínas (32). Debido a este hecho, situaciones en las que encontremos una elevada concentración de partículas y/o un diámetro reducido de éstas favorecerán su paso hacia la íntima arterial, aumentando así su potencial aterogénico. Como ya se ha comentado, las LDL pequeñas y densas, frecuentes en la dislipemia diabética, son, además, más susceptibles a los procesos de glicosilación no enzimática y de oxidación. La modificación oxidativa de las lipoproteínas, y concretamente de las LDL, que son más sensibles al ataque oxidativo, produce una lipoperoxidación que les confiere una mayor actividad lipotóxica. La glicosilación no enzimática de las LDL induce además la formación de radicales libres de oxígeno con la consecuente estimulación de procesos oxidativos, fenómeno que se conoce como glicoxidación, contribuyendo ésta también a un mayor potencial proaterogénico (27).

Estos son varios de los motivos por los que, a pesar de que dos individuos puedan tener unas mismas concentraciones de c-LDL, pueden presentar un riesgo cardiovascular muy dispar al presentar concentraciones de p-LDL diferentes (figura 2).

DOS INDIVIDUOS CON IGUAL CONCENTRACIÓN DE c-LDL

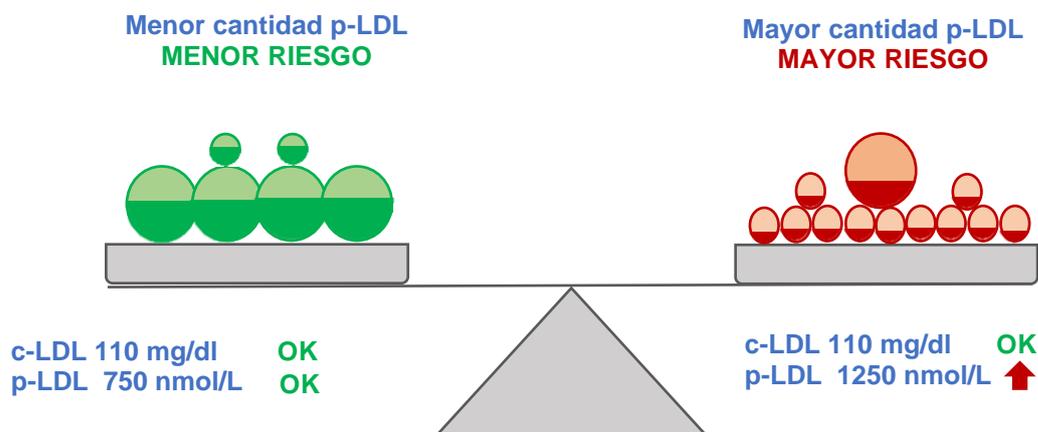


Figura 2: Patrones de distribución de p-LDL para una misma concentración de c-LDL. Según el tamaño de las p-LDL existe una asociación a un diferente riesgo cardiovascular. **Adaptado de:** Mora S. *Circulation*. 2009 May 5;119(17):2396-404 (33).

En la misma línea, tal y cómo se muestra en la figura 3, en el seguimiento de la población incluida en el estudio MESA (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*), una población formada por más de 6.500 individuos de diversas etnias, sin enfermedad cardiovascular conocida, y en la que se evaluó la aparición de ECV tras un seguimiento superior a 12 años, se observó una mayor tasa de eventos cardiovasculares en aquellos pacientes con un mayor cociente p-LDL/c-LDL (indicativo de una mayor cantidad de p-LDL con respecto a c-LDL), demostrando así que el número de p-LDL presenta una capacidad superior de predicción de riesgo cardiovascular en comparación con el c-LDL (34). Más recientemente, un mayor cociente p-LDL/c-LDL se ha visto asociado a la presencia de enfermedad arteriosclerótica preclínica en población con diabetes tipo 1 (DM1) con alto riesgo cardiovascular, resaltando así el papel que tendría este cociente como marcador subrogado del número de partículas LDL pequeñas y densas, responsables en gran medida del riesgo lipídico residual de este colectivo (35). Este mismo estudio también reveló una asociación positiva del cociente partículas no-HDL/c-no-HDL con la

presencia de arterioesclerosis preclínica en sujetos con DM1, resaltando nuevamente el papel del resto de lipoproteínas proaterogénicas más allá de las LDL (35).

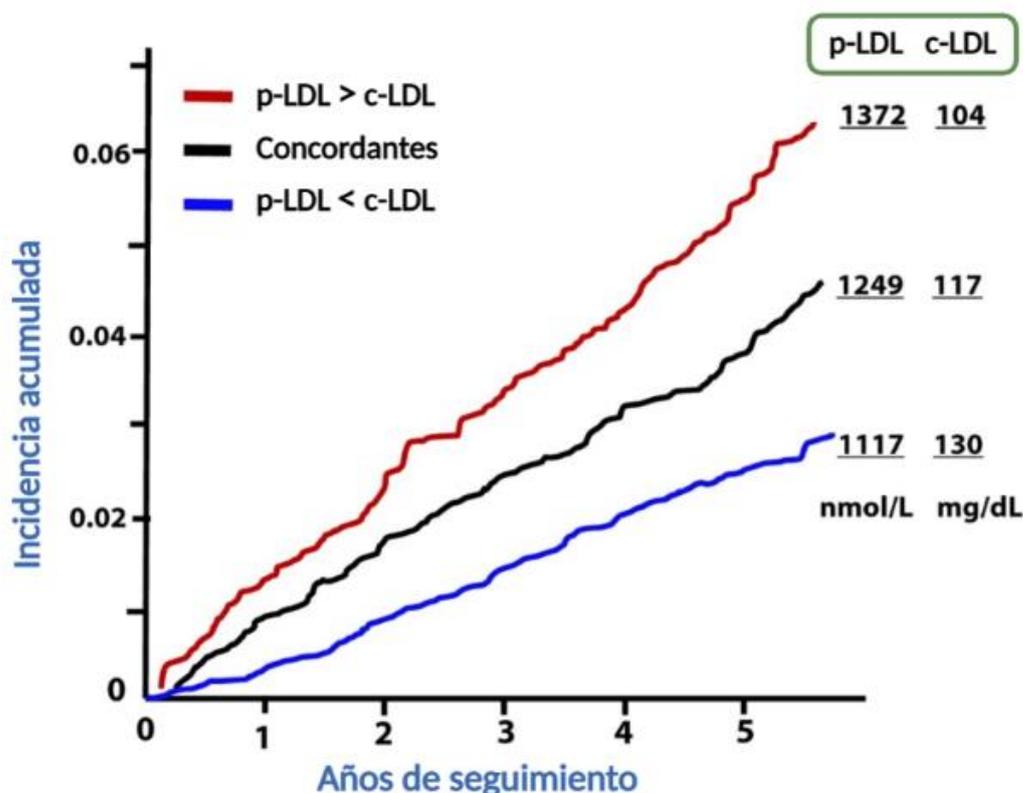


Figura 3: Incidencia de ECV a lo largo del tiempo según la estratificación de la población del estudio MESA con relación a las concentraciones de c-LDL/p-LDL en tres subpoblaciones diferentes: aquellos con p-LDL y c-LDL concordantes (indicado por la línea negra); aquellos con p-LDL y c-LDL discordantes a favor de p-LDL (p-LDL > c-LDL, indicado por la línea roja); aquellos con p-LDL y c-LDL discordantes a favor de c-LDL (p-LDL < c-LDL, indicado por la línea azul). El número de p-LDL presenta una capacidad superior de predicción de riesgo con respecto al c-LDL. **Adaptado de:** *Otvos JD, et al. J Clin Lipidol. 2011 Mar-Apr;5(2):105-13 (34).*

En lo que se refiere a las VLDL, en especial su subclase pequeña, se ha observado una relación con el riesgo cardiovascular residual en individuos en tratamiento activo con estatinas y con valores de c-LDL < 130 mg/dl (36). Esta asociación parecería depender en gran parte por el contenido en colesterol de estas partículas. En una línea similar, el

contenido en colesterol de las VLDL se ha visto también asociado a un aumento de mortalidad a un año en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda (37). Otros estudios han observado una asociación entre las subclases de VLDL de mayor tamaño con un aumento del riesgo de reinfarto dentro del primer año tras un síndrome coronario agudo (38).

1.1.6. Fundamento técnico de la medición directa de partículas lipoproteicas mediante espectroscopía por resonancia magnética (Liposcale®).

El test denominado Liposcale® es el resultado de un proyecto desarrollado a nivel nacional que ofrece una nueva generación tecnológica basada en el uso de la RMN para el estudio de las lipoproteínas y sus diferentes subclases. Este test se basa en la espectroscopia de RMN en 2 dimensiones, mediante la cual se analiza la atenuación de las señales de los picos lipídicos cuando estos son sometidos a un gradiente de campo magnético conocido. La diferencia en la atenuación de las señales se asocia a una difusión diferencial de las partículas lipoproteicas según el tamaño cuando se analizan mediante espectroscopia de RMN (*Diffusion Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* [DOSY-NMR]). Con el estudio DOSY-RMN bidimensional, es posible conocer las características de las moléculas, como el coeficiente de difusión asociado a cada subclase de lipoproteína. A partir de la medición de sus coeficientes de difusión es posible calcular los tamaños de las diferentes subclases de lipoproteínas utilizando la ecuación de *Stokes-Einstein* (39). El espectro generado por Liposcale® se traduce finalmente en información acerca del número y tamaño de las partículas lipoproteicas distribuidas en tres fracciones principales (VLDL, LDL y HDL), y tres subfracciones de cada una de ellas (grande, mediana y pequeña), dando así lugar a un total de 9 subfracciones de lipoproteínas, así como el contenido de colesterol y triglicéridos para

cada tipo de lipoproteína (40). La figura 4 muestra un esquema elemental del procedimiento utilizado por el test Liposcale®.

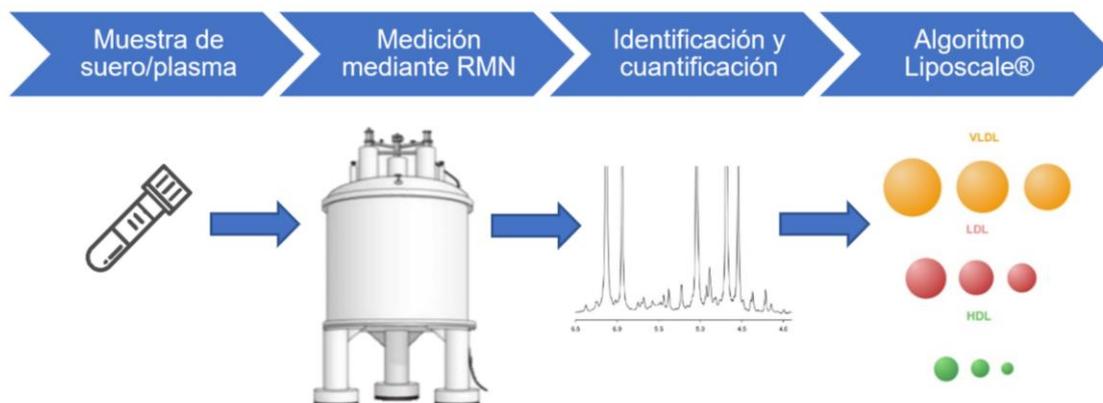


Figura 4: Esquema del procedimiento utilizado por el test Liposcale® para la obtención e identificación del perfil lipoproteico avanzado.

De forma más pormenorizada, el estudio de las moléculas por resonancia magnética nuclear se basa en la medición de la frecuencia de rotación de estas en función de la intensidad del campo magnético aplicado. Esta medición se expresa en términos de porcentaje de cambio respecto a una frecuencia de referencia que conocemos previamente, medida en partes por millón (ppm). Esto nos permite comparar los resultados obtenidos con diferentes equipos, y analizar los mismos compuestos a partir de muestras diferentes.

Primero, se coloca una muestra de suero o plasma, de la que generalmente se requiere una cantidad de 200µl a la que se le añade una disolución *buffer* para minimizar los cambios debidos al pH dentro del equipo de RMN, y se le aplica radiación electromagnética en forma de pulsos de radiofrecuencia, produciendo así una excitación de los protones de las moléculas. Cuando los protones se encuentran en un campo magnético externo, sufren un movimiento de precesión, vibran, y pueden entrar en resonancia absorbiendo energía si se les excita con una onda electromagnética que coincida con su frecuencia interna. Al relajarse y volver a su estado de equilibrio, se

registra una señal electromagnética oscilante que proporciona información sobre su cambio de intensidad a lo largo del tiempo (41). Los diferentes protones en diferentes partes de una misma molécula tienen un desplazamiento químico diferente, y esto hace que las moléculas den lugar a un patrón específico de picos, en términos tanto del desplazamiento químico como de las intensidades de esos picos (42). Lo que finalmente obtendremos es un espectro de intensidad de señal con respecto a la frecuencia de referencia, expresada en ppm, mediante un proceso matemático conocido como “deconvolución”. De esta manera, se obtiene un registro de espectroscopia que contiene información sobre los diferentes compuestos presentes en la muestra estudiada (42). En el caso del estudio de las lipoproteínas, se analiza una franja específica del espectro comprendida entre 1.3 y 0.7 ppm. Como se detallará más adelante, este proceso inicial de obtención del espectro permite no sólo el estudio de las lipoproteínas, sino también el de otros compuestos que se han relacionado con el proceso fisiopatológico de la enfermedad arterioesclerótica, como es el caso de las glicoproteínas.

La clasificación de las diferentes lipoproteínas y sus subfracciones en el espectro de RMN se realiza tradicionalmente mediante el análisis de las señales generadas por los grupos metilo presentes en el colesterol esterificado y en los triglicéridos transportados por las lipoproteínas. Estos grupos metilo resuenan a diferentes frecuencias bajo la influencia de los pulsos de radiofrecuencia, y su resonancia será diferente en función del tamaño de la partícula que los transporta. La deconvolución matemática de estas señales, basada en funciones analíticas asociadas a los lípidos presentes en cada subfracción, nos da una señal que se compara con una biblioteca de espectros de las subfracciones conocidas ya previamente, permitiendo así obtener una medición directa de la concentración de cada lipoproteína y de cada subfracción lipoproteica (40, 43).

Aunque este método ha sido validado y testado en múltiples estudios, presenta un inconveniente, que es la superposición de señales, lo que dificulta la separación entre las diferentes lipoproteínas y sus subclases. Por este motivo, la diferenciación de las

lipoproteínas y sus subclases mediante espectroscopía de RMN ha evolucionado hacia la aplicación de un segundo gradiente magnético sobre la señal inicial, técnica conocida como DOSY. Con este método, se obtiene un primer espectro de señal de metabolitos, para luego aplicar un nuevo gradiente magnético que permite separar los picos de las diferentes lipoproteínas dependiendo de la frecuencia del movimiento de precesión de cada una, que variará en función de sus características moleculares y de su tamaño. De esta manera, las lipoproteínas más grandes emiten señales a frecuencias más altas que las más pequeñas (40).

La figura 5 muestra un esquema de la obtención del perfil lipoproteico basado en espectroscopia por difusión bidimensional (DOSY).

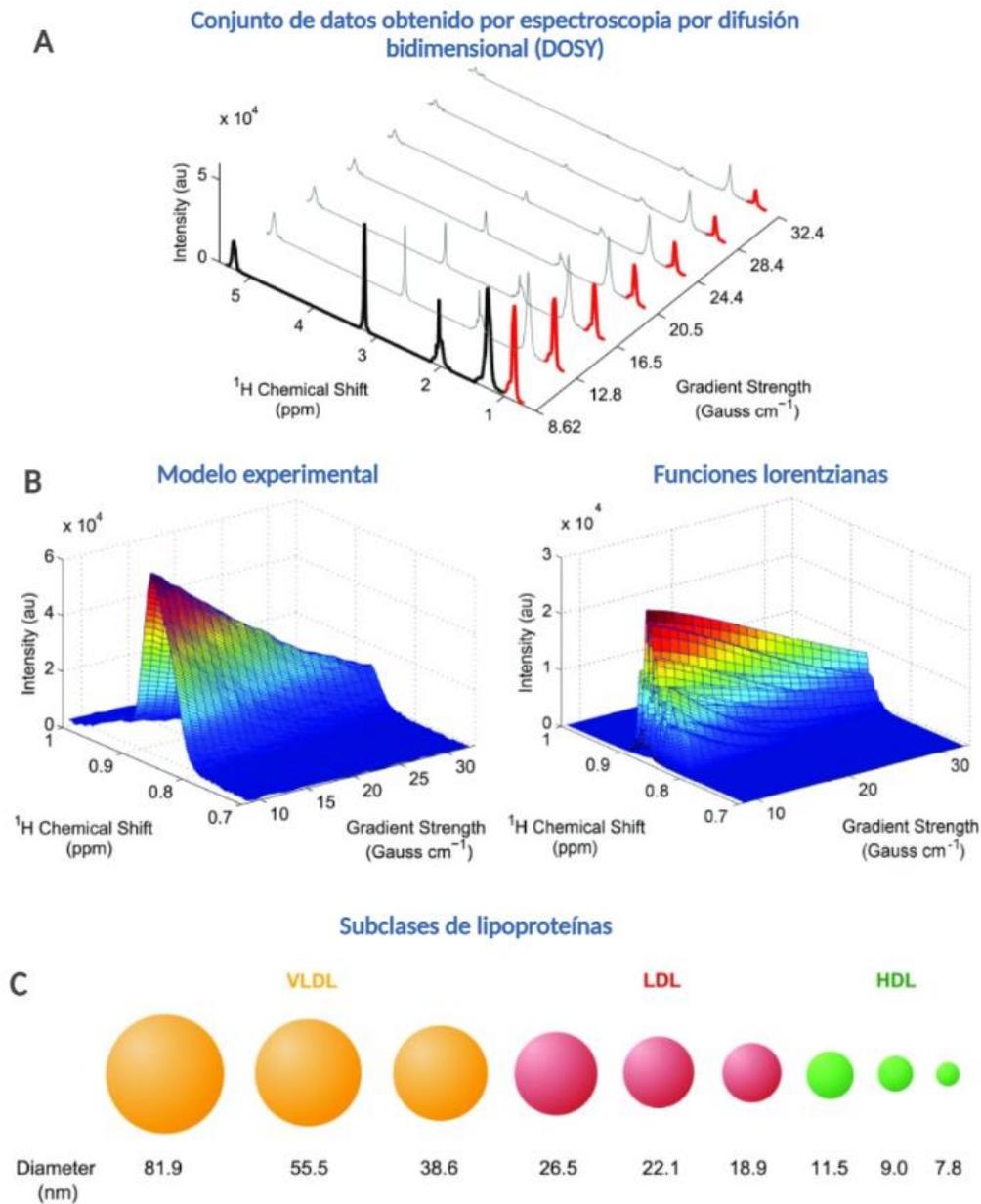


Figura 5: Resumen esquemático de la obtención del perfil lipoproteico basado en espectroscopia por difusión bidimensional (Test Liposcale ®). **A:** Se muestran diferentes gradientes obtenidos por espectroscopia RMN por difusión bidimensional (DOSY). El primer gradiente, en color negro, muestra las regiones de RMN de los espectros que se utilizan para calibrar y predecir las concentraciones de colesterol y triglicéridos mediante el modelo de regresión de mínimos cuadrados. Se muestra, en color rojo, la atenuación de la señal de los grupos metilo a lo largo del eje del gradiente para mostrar la región utilizada para caracterizar las diferentes subclases de lipoproteínas.

B: Proceso de ajuste de superficie para un sujeto determinado. La atenuación experimental de la señal de los grupos metilo (izquierda), y las nueve funciones de RMN utilizadas para ajustar la superficie experimental (derecha). **C:** Mediante esta metodología, se pueden obtener un total de nueve subclases de lipoproteínas. **Adaptado de:** Mallol R et al. *J Lipid Res.* 2015 Mar;56(3):737-746 (40).

En resumen, Liposcale® es un test avanzado de lipoproteínas basado en RMN en 2D que nos permite calcular directamente, además de la concentración de colesterol y triglicéridos que éstas transportan, el número y el tamaño de las diferentes fracciones de partículas lipoproteicas presentes en el suero, y además de una forma más precisa en comparación con los métodos basados en RMN en 1D. De esta forma, tal y como se muestra en la figura 6, gracias al test Liposcale® se pueden establecer nueve categorías de lipoproteínas en función de sus tamaños (grandes, medianas y pequeñas para cada tipo de subclase: p-VLDL, p-LDL y p-HDL) (44).

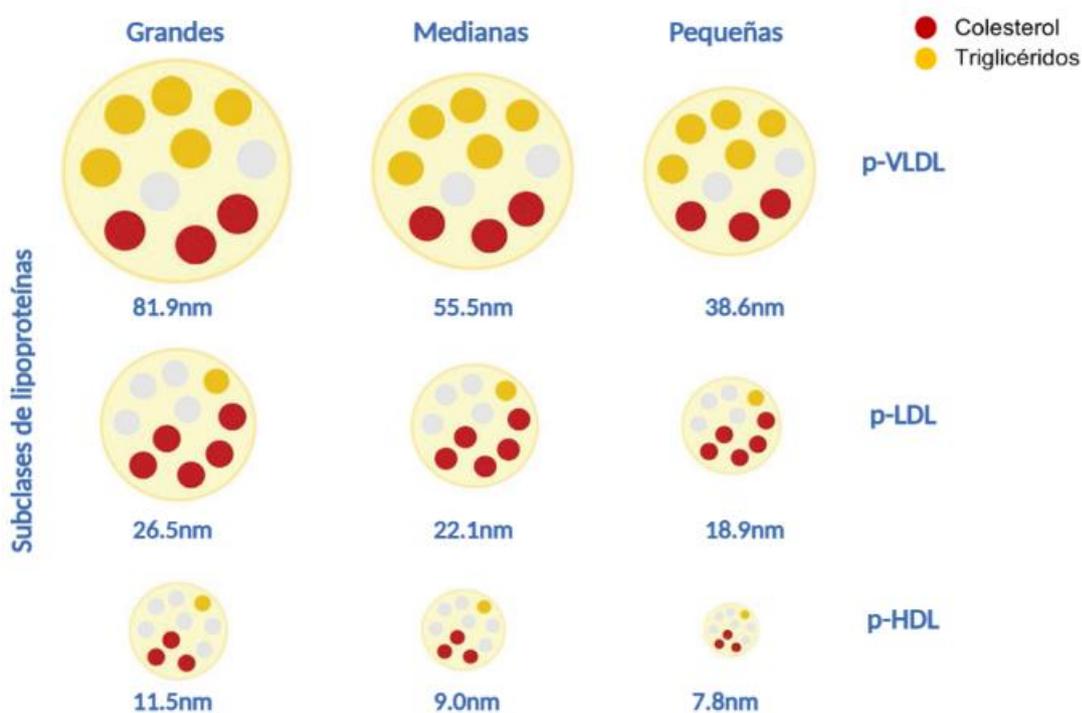


Figura 6: Esquema de las diferentes clases y subclases de lipoproteínas. Se expresan sus diámetros en nanómetros (nm). **Adaptado de:** Pintó X, et al. *Clin Investig Arterioscler.* 2020;32(5):219-229 (44).

El test Liposcale® ha sido validado científicamente, y se ha utilizado ya en numerosos estudios previos, proporcionando un valor pronóstico adicional a los factores de riesgo cardiovascular clásicos tanto en el ámbito de las enfermedades cardiovasculares arterioscleróticas como en el síndrome metabólico, la insuficiencia cardiaca, la diabetes y sus complicaciones (35, 45-51). De hecho, recientemente se ha publicado un consenso por parte de la Sociedad Española de Arterioesclerosis (SEA) en el que se especifican las recomendaciones para el uso clínico de este test (44).

1.1.7. Análisis molecular de glicoproteínas plasmáticas asociadas a inflamación sistémica mediante espectroscopía por resonancia magnética.

Tal y cómo se ha comentado previamente en esta tesis, uno de los beneficios de los métodos de análisis mediante espectroscopía de RMN es que, además de permitirnos medir el perfil lipoproteico avanzado, se pueden obtener datos sobre otros metabolitos o moléculas a partir de una misma muestra. De entre estos metabolitos, se podría destacar la caracterización de la concentración de proteínas glicosiladas en el plasma, una parte de las cuales generan una señal denominada glicoproteína A (GlycA). En este sentido, se ha descrito que la concentración sérica de esta glicoproteína aumenta de forma proporcional con el grado de inflamación sistémica (52).

En el caso de las glicoproteínas, la región del espectro sobre la que resuenan es una señal compuesta con un pico prominente centrado en aproximadamente 2,03 ppm del espectro de resonancia (2.15-1.90 ppm). La espectroscopía de RMN nos permite así detectar los picos de señal derivados de los grupos N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina (pico de GlycA), que aparecen en la mayoría de las proteínas inflamatorias séricas (ver figura 7). Es importante señalar que, cuando su concentración es inferior a 20 $\mu\text{mol/L}$ no pueden distinguirse los diferentes tipos de proteínas

glicosiladas durante las mediciones, y que por tanto un pequeño subconjunto de glicoproteínas de fase aguda son las que influirán de forma más significativa en la señal de GlycA, al presentar una mayor concentración y un mayor grado de glicosilación. En este sentido, las proteínas que más contribuyen a la señal GlycA son: la alfa-1-glicoproteína ácida, la alfa-1-antitripsina, la alfa-1-antiquimotripsina, la haptoglobina y la transferrina (53). Al detectar enlaces específicos de glicosilación de estas proteínas, la medición de GlycA nos permite analizar diferentes vías inflamatorias en una única medida y de forma conjunta (54).

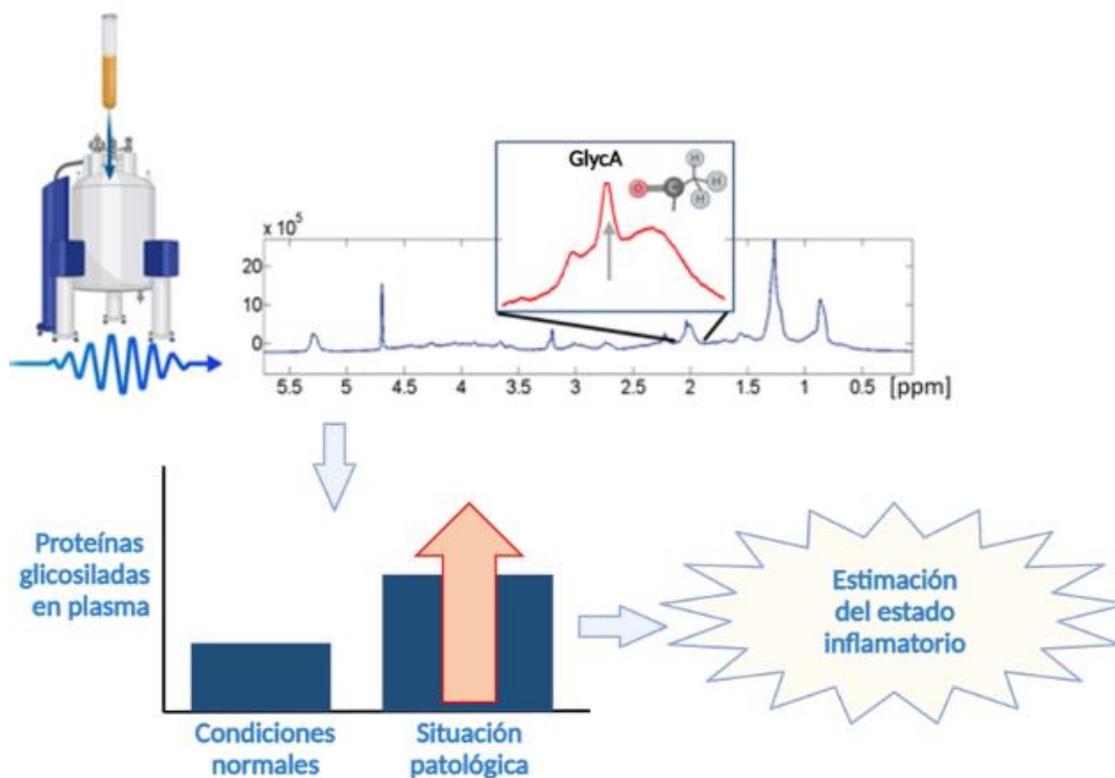


Figura 7: Representación gráfica de la obtención por RMN del pico de señal de las glicoproteínas en plasma que nos permite conocer el grado de inflamación sistémica que producen determinadas patologías. **Adaptado de:** Fuertes-Martín R, et al. *J Clin Med.* 2020 Jan 27;9(2):354 (54).

A parte de la señal del área de GlycA, a partir del espectro obtenido por la espectroscopia de ^1H -RMN es posible calcular el cociente *Height/Width* (H/W) de GlycA,

el cual nos proporciona información sobre la “forma” del pico de glicosilación. Esta función depende de su altura (*Height*), que está relacionada con la concentración, y su ancho (*Width*), que está relacionada con la flexibilidad y la agregación de las moléculas que generan la señal. Se ha encontrado que picos de señal más altos y estrechos (más “picudos”), y que serían indicativos de una mayor libertad entre los enlaces entre azúcares y proteínas, están relacionados con algunas enfermedades inflamatorias (55).

Se sabe además que las concentraciones séricas de GlycA están directamente asociadas con las de la proteína C reactiva (PCR) (52), que es otro biomarcador diagnóstico bien establecido para valorar el estado inflamatorio sistémico. Cabe destacar que la ventaja que ofrece GlycA sobre la PCR es que puede integrar múltiples vías inflamatorias de forma simultánea al capturar la señal global de varias proteínas inflamatorias y, por lo tanto, capturar mejor el grado de inflamación sistémica (56). Además, es capaz de hacerlo con una mayor fiabilidad y una menor variabilidad intraindividual que la PCR al detectarse de manera similar en muestras de suero y plasma, en estados de ayuno y posprandial e incluso después de largos periodos de almacenamiento de la muestra (53, 57).

Existe evidencia sobre el valor pronóstico del estudio del estado inflamatorio mediante el perfilado de la glicosilación por espectroscopía de RMN en diferentes enfermedades no cardiovasculares tales como distintas neoplasias, la obesidad, la diabetes mellitus (y sus complicaciones), el síndrome metabólico y otros procesos inflamatorios crónicos sistémicos (52, 54, 57-59). En el campo de la ECV, se ha observado una relación entre la concentración sérica de glicoproteínas y la enfermedad coronaria, la enfermedad arterial periférica, los accidentes cerebrovasculares, así como con la mortalidad por cualquier causa en pacientes seleccionados, incluso después del ajuste por otros marcadores inflamatorios (52, 60-61).

1.2. INSUFICIENCIA CARDIACA Y DIABETES.

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre la DM y la insuficiencia cardiaca (IC), siendo la prevalencia de IC en individuos con DM dos veces superior a la de la población general (62-64). De hecho, la DM es muy prevalente entre los sujetos con IC, especialmente en aquellos que presentan una fracción de eyección preservada (64). Dentro de la IC, podemos distinguir entre aquella disfunción ventricular que se presenta en forma de disfunción sistólica, definida como una reducción de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (VI) acompañada generalmente de una dilatación ventricular, o bien en forma de disfunción diastólica, entendida como la condición en la cual, para mantener un gasto cardíaco normal, la presión de llenado se encuentra aumentada, generalmente como consecuencia de una rigidez de la pared ventricular (65). Es importante señalar que ambas condiciones pueden coexistir en un mismo paciente.

1.2.1. Miocardiopatía diabética: definición y prevalencia.

Debe destacarse que, en estudios poblacionales, el riesgo de IC en sujetos con diabetes (particularmente con DM2) está incrementado significativamente después de ajustar por otros factores de riesgo reconocidos de IC (66). La forma específica resultante de cardiomiopatía se denomina miocardiopatía diabética (MCD) (67).

Se define a la MCD como la presencia de disfunción ventricular diastólica y/o sistólica en sujetos con diabetes mellitus en ausencia de enfermedad coronaria o hipertensión arterial (HTA). El concepto de MCD se basa en el concepto de que la DM es en sí misma el factor clave que provoca diferentes cambios a nivel molecular y celular en el miocito, lo que produce anomalías estructurales y funcionales en el corazón, con la progresiva aparición de disfunción miocárdica (67).

Si bien es cierto que, debido al carácter subclínico de esta entidad en sus estadios iniciales, su verdadera prevalencia no se conoce con exactitud y es difícil de determinar, se estima ésta se situaría en torno al 15-20% y que aumentaría con la edad y la duración de la diabetes (68). Por otro lado, aunque se trata de un concepto más comúnmente relacionado con la DM2, también es evidente la presencia de una miocardiopatía inducida metabólicamente, independientemente de la presencia de HTA, nefropatía o cardiopatía isquémica en individuos con DM1 (69, 70).

1.2.2. Manifestaciones clínicas de la miocardiopatía diabética.

La primera etapa de la miocardiopatía diabética es clínicamente asintomática, y se caracteriza por una señalización metabólica y una utilización de la energía cardíaca alteradas, lo que conduce progresivamente a un aumento de la rigidez miocárdica (71, 72). Se desarrolla además una disminución de la distensibilidad (*compliance*) del VI, un deterioro del llenado diastólico temprano, un aumento del llenado y agrandamiento auricular, un deterioro de la relajación ventricular isovolumétrica con una prolongación de ésta, y un aumento de la presión final diastólica del VI (73, 74).

Posteriormente, en una segunda etapa, se produce una remodelación estructural del miocardio en forma de hipertrofia y de fibrosis progresivas del VI. Con el paso del tiempo, irá evolucionando a una tercera etapa caracterizada por un deterioro anatómico y funcional progresivo hasta finalmente producir disfunción miocárdica, que puede ser tanto diastólica, sistólica como mixta (73).

Por lo tanto, es importante hacer énfasis en el hecho de que, antes de que se presente una insuficiencia cardíaca sintomática, aparecerán únicamente cambios sutiles a nivel del miocardio, lo que dificulta aún más el diagnóstico de esta patología.

1.2.3. Fisiopatología de la miocardiopatía diabética.

La etiopatogenia de la MCD es sumamente compleja y hoy en día aún no se comprende completamente. Se han descrito varios mecanismos fisiopatológicos que afectan directamente la estructura y función del miocardio contribuyendo al desarrollo de la MCD. Entre ellos, se podrían destacar las alteraciones en el metabolismo energético miocárdico, anomalías en la señalización intracelular, la disfunción autonómica, la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, el estrés oxidativo, la inflamación sistémica, la lipotoxicidad, el daño microvascular y la fibrosis miocárdica (71, 75-78).

La hiperglucemia, la hiperinsulinemia y la señalización alterada de la insulina probablemente sean parte de los principales mecanismos iniciadores (73). La insulina es una de las principales hormonas encargadas de la regulación del metabolismo intermedio de los carbohidratos y los lípidos en el organismo, orquestando la utilización de sustratos para su almacenamiento en el interior de las células. En consecuencia, las alteraciones en su señalización tienen efectos deletéreos en numerosos tejidos, incluyendo el sistema cardiovascular. Asimismo, otras alteraciones metabólicas tales como la depleción del transportador de glucosa GLUT-4 y el aumento de los ácidos grasos libres también se han visto involucrados en las fases iniciales de esta patología (79, 80).

En la etiopatogenia de la MCD es especialmente importante señalar el papel del aumento sistémico del estrés oxidativo (72). Probablemente, una de las principales causas es un aumento de la actividad mitocondrial producido como consecuencia de la hiperglucemia mantenida, favoreciendo así la producción de especies reactivas del oxígeno (del inglés, *reactive oxygen species*, ROS). Este estrés oxidativo tendría un papel crucial a nivel del espacio subendotelial de las paredes arteriales y a nivel de los cardiomiocitos, un microambiente rodeado de células metabólicamente activas que carece de las defensas antioxidantes tan abundantes en el plasma sanguíneo (71). Este

proceso termina dando lugar a la formación de productos de glicación avanzada (del inglés, *advanced glycation end-products*, AGE). Los AGE son un grupo heterogéneo de compuestos con propiedades inflamatorias y capacidad de inducción de apoptosis, que pueden alterar de manera irreversible la función de ciertas proteínas extracelulares, como el colágeno y la elastina, alterando así sus propiedades estructurales, y favoreciendo el deterioro de la relajación del músculo cardíaco (73, 74).

Por otro lado, debe destacarse también el papel que juega el daño microvascular dentro de la etiopatogenia de la MCD, aspecto especialmente llamativo en las etapas más tardías de dicha enfermedad (73, 81). En condiciones de resistencia insulínica se produce una reducción en la producción de óxido nítrico, así como un aumento de su degradación, resultando en una reducción de sus niveles biodisponibles. El óxido nítrico es un elemento fundamental para la correcta relajación vascular coronaria, por lo que ésta sería una de las principales causas de microangiopatía observadas en la MCD (81). Por otro lado, en la diabetes también se ha descrito un aumento de niveles endotelina-1, un potente vasoconstrictor, que, junto con el descenso de óxido nítrico, también favorecería una vasodilatación defectuosa de los capilares, promoviendo así la microangiopatía diabética (81). Asimismo, el aumento en los niveles de calcio intracelular en las células musculares lisas del epitelio vascular favorecería también la constricción coronaria, y se ha descrito que el hiperinsulinismo tendría efectos en la diferenciación de las células endoteliales a un fenotipo similar al de los fibroblastos (82), lo que contribuiría también a un aumento en la rigidez vascular. Además, dentro del efecto deletéreo producido a través de los AGE, se ha descrito un descenso en los niveles de factor inducible por hipoxia-1 α (del inglés, *hypoxia-inducible factor-1 α* , HIF-1 α) que impediría una adecuada vasculogénesis compensatoria en respuesta a la isquemia (83).

La lipotoxicidad, referida como el daño celular causado por la acumulación excesiva de lípidos, ha sido también considerada como un factor importante en el desarrollo de la

MCD (84). La elevación de lípidos circulantes en el contexto metabólico del hiperinsulinismo aumenta la incorporación de ácidos grasos libres a los cardiomiocitos, los cuales se adaptan rápidamente para su utilización como sustrato energético. Sin embargo, si la entrega de ácidos grasos supera la capacidad oxidativa de la célula, los ácidos grasos se acumularán intracelularmente, impidiendo el adecuado metabolismo del miocito (74). La alta captación y metabolismo de ácidos grasos no solo estimula la acumulación de sus productos intermedios, sino que también aumentará la demanda de oxígeno y reducirá la producción de energía, provocará el desacoplamiento mitocondrial y un aumento del estrés del retículo endoplasmático y de la producción de ROS, desencadenando finalmente la apoptosis de los cardiomiocitos (74, 80). En conjunto, todos estos eventos participan de manera importante en la patogénesis de la MCD.

A continuación, se incluye la figura 9 con el propósito de resumir los diferentes mecanismos etiopatogénicos propuestos en la fisiopatología de la MCD. Aunque se representan como mecanismos separados, es importante señalar que muchas de estas vías interactúan entre sí de forma compleja.

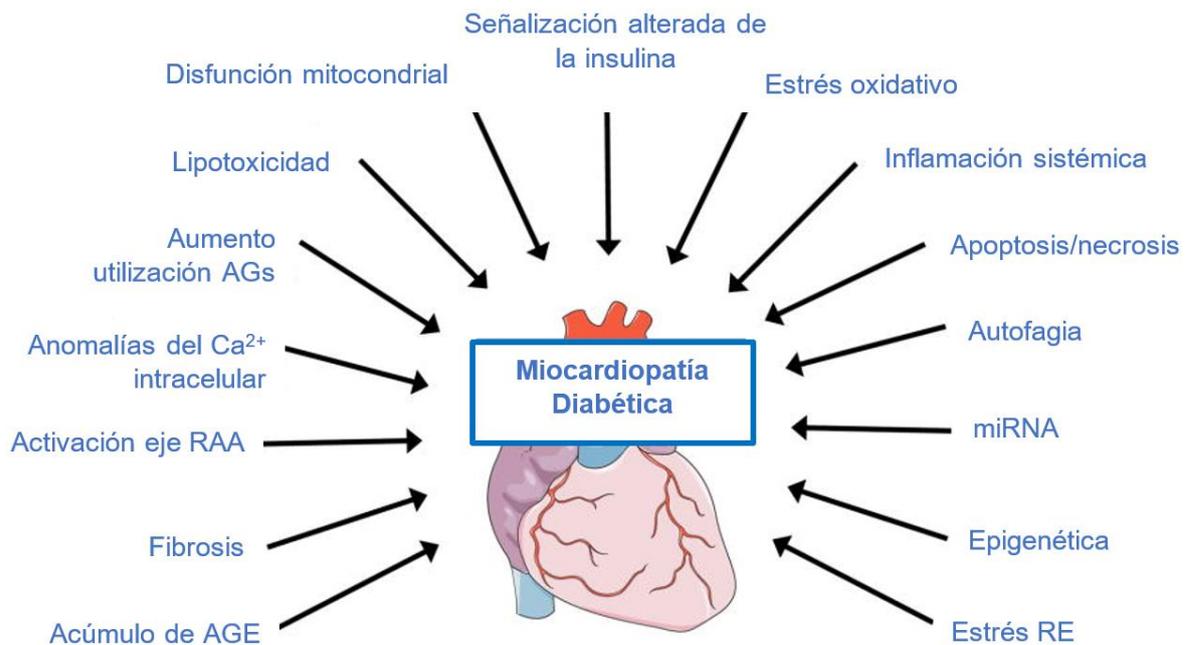


Figura 8: Mecanismos etiopatogénicos propuestos en la fisiopatología de la miocardiopatía diabética. AGE: *Advanced Glycation End-products*. AGs: Ácidos Grasos. miRNA: MicroRNA. RAA: Renina-Angiotensina-Aldosterona. RE: Retículo Endoplasmático. **Adaptado de:** Bugger H, et al. *Diabetologia* 2014; 57(4):660-71 (66).

1.2.4. Papel de GlycA y de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en la fisiopatología de la insuficiencia cardiaca.

Tal y cómo se ha comentado previamente, GlycA es un reconocido biomarcador compuesto de inflamación sistémica cuya señal por RMN representa tanto los niveles como el grado de glicosilación de diversas proteínas de fase aguda. Concretamente, se ha sugerido que la inflamación crónica en pacientes con diabetes puede contribuir al desarrollo de la MCD (85, 86).

Diferentes estudios han descrito que las concentraciones elevadas de GlycA se asocian con un mayor riesgo de IC en población general, sobre todo en el subgrupo de sujetos que presentan una fracción de eyección preservada (87). Más recientemente, se ha observado su asociación con la variable de resultado combinada de mortalidad por cualquier causa y de reingreso por IC en una población de sujetos con IC crónica de causa no isquémica (88). Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos estudios son de tipo observacional y que, por tanto, no permiten establecer una relación directa de causalidad. Hasta la fecha, no existe evidencia del papel de GlycA en la disfunción cardíaca en su fase preclínica, menos aún si hablamos de aquella que acontece de forma específica en sujetos con DM1.

En relación con las TRL, se sabe que el exceso de flujo de ácidos grasos movilizados hacia el hígado promueve la sobreproducción de éstas, así como de sus remanentes, situación típicamente presente en la diabetes. Concretamente, en modelos investigación experimental murina se ha observado que la sobreexpresión de receptores de VLDL

(VLDLR) en un estado postprandial, con el consecuente aumento de la captación de TRL por parte de los cardiomiocitos, favorecería la aparición de disfunción ventricular (89). También se ha hipotetizado sobre el papel que tendrían en el remodelado cardiaco, así como en la vulnerabilidad a la aparición de fibrilación auricular (90). Sin embargo, la contribución de las TRL a la cardiomiopatía no isquémica aún está pobremente estudiada.

2. JUSTIFICACIÓN

El colesterol contenido en las lipoproteínas LDL se considera, en la actualidad, un factor causal de arteriosclerosis. Sin embargo, es conocido que, además de las concentraciones del c-LDL en sangre periférica, existen otros parámetros lipídicos que estarían involucrados en el proceso de arteriosclerosis y, por lo tanto, en el riesgo de enfermedades de causa aterosclerótica. Entre las descritas, estarían las alteraciones en el fenotipo de las distintas lipoproteínas (tanto de tipo cualitativo, como cuantitativo). Este hecho es especialmente prevalente en situaciones clínicas como la diabetes. En este último caso, se ha descrito que la alteración en el fenotipo de las lipoproteínas, más allá de las concentraciones séricas de c-LDL, estaría implicada en el mayor riesgo de ECV ateromatosa descrito en sujetos con DM.

Existen muy pocos datos en la literatura relacionados con el perfil lipoproteico en sujetos que presentan diferentes grados de alteración del metabolismo de la glucosa (prediabetes o DM2), y de sujetos con normoglucemia provenientes de una misma zona geográfica, menos aún en población del área mediterránea. Esta es, por tanto, una aproximación prometedora que podría ser de utilidad para mejorar la predicción del riesgo cardiovascular de estos individuos.

Por otro lado, en el momento actual, existe escasa evidencia en la literatura sobre el papel del perfil lipoproteico avanzado y el estado inflamatorio sistémico, medido a través de la caracterización de la glicosilación plasmática, en la MCD. Este hecho es especialmente destacado en sujetos con DM1. Desde un punto de vista fisiopatológico, es importante disponer de datos relacionados con el perfil avanzado de las lipoproteínas en estadios preclínicos de dicha entidad. De esta forma, la información obtenida podría contribuir a clarificar su implicación en la fase preclínica de la MCD, para así poder sentar las bases de futuros tratamientos que puedan ser utilizados en estadios precoces de la enfermedad, permitiendo alterar su historia natural.

Por dichos motivos, y teniendo en cuenta la alta prevalencia de todas estas patologías, se propuso la realización de esta esta tesis doctoral con el fin de lograr una mayor comprensión de las diferencias que pueden observarse en el perfil lipoproteico avanzado en función del estado glucémico de cada individuo, así como de la relación entre el mismo y el perfil glicoproteico avanzado como mecanismos fisiopatológicos implicados en la MCD.

3. HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas en esta tesis doctoral son las siguientes:

1. Existe una asociación entre el grado de alteración del metabolismo de la glucosa con diferentes alteraciones cualitativas y cuantitativas del perfil lipoproteico avanzado.
2. Existe una asociación entre diferentes alteraciones en el perfil lipoproteico y glicoproteico avanzado con la presencia de disfunción miocárdica subclínica en sujetos con DM1.

4. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Describir el patrón fenotípico del perfil lipoproteico avanzado, definido como las diferentes subclases de lipoproteínas, así como su contenido en colesterol y triglicéridos, en sujetos con distintos grados de alteración del metabolismo glucídico sin antecedentes de ECV: normogluemia, prediabetes, DM2 y DM1; en este último grupo junto con la caracterización de la glicosilación plasmática, definida como la concentración sérica de GlycA, y evaluar su relación con la función miocárdica.

Objetivos específicos:

1. Describir las diferencias en el perfil lipoproteico avanzado en sujetos con distintos grados de alteración del metabolismo glucídico, sin enfermedad cardiovascular previa y sin tratamiento hipolipemiente, analizando su asociación con variables clínicas como la edad y el sexo, así como con diferentes parámetros relacionados con la composición corporal, la resistencia insulínica y el hígado graso no alcohólico (HGNA).
2. Describir el patrón fenotípico del perfil lipoproteico avanzado y de las concentraciones séricas de GlycA en una cohorte bien caracterizada de sujetos con DM1 sin enfermedad cardiovascular previa, estudiando su asociación con la presencia de disfunción miocárdica subclínica.

5. COMPENDIO DE PUBLICACIONES

5.1. RESUMEN DE MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1.1. Material y métodos del primer artículo.

Población a estudio:

Se incluyeron un total de 929 participantes (463 con normoglucemia, 250 con prediabetes, y 216 con DM2) provenientes de diferentes cohortes de 4 centros participantes pertenecientes a la misma institución sanitaria del noreste de España (Cataluña).

Los criterios de inclusión para los 3 grupos fueron: ausencia de insuficiencia renal crónica (definida como un filtrado glomerular (FG) < 60 ml/min/1,73 m²), y ausencia de cardiopatía conocida (definida como cualquier tipo de enfermedad arterial periférica, ictus, IC o enfermedad coronaria, incluidos el IAM previo y la angina, o los antecedentes de revascularización coronaria percutánea o mediante cirugía de derivación). Los criterios de exclusión fueron el tratamiento hipolipemiente activo (estatinas y/o fibratos), o un diagnóstico de diabetes diferente a la DM2.

Para catalogar la presencia de diabetes o prediabetes, se usaron los criterios diagnósticos establecidos por la *American Diabetes Association* (ADA) (91).

Evaluación y variables de interés:

Se registraron las características de los participantes y los parámetros antropométricos y analíticos. Para evaluar la posible presencia de hígado grado no alcohólico, se calculó también el índice *Fatty Liver Index* (FLI) de todos los participantes, considerando un FLI > 60 como indicativo de la presencia de HGNA.

A todos los sujetos se les practicó un análisis por espectroscopia por RMN del perfil lipoproteico avanzado (Liposcale®). Se estudiaron las diferencias existentes entre los tres grupos incluidos (DM2, prediabetes y normogluemia) y, dentro del grupo de sujetos con normogluemia, en función del sexo (hombre o mujer) y del grupo de edad (de 18.0 a 44.3 años, de 44.3 a 56.4 años o de 56.4 a 83 años).

Metodología estadística:

La estadística descriptiva se resumió como mediana [intervalo intercuartílico] o media \pm desviación estándar para las variables continuas, y mediante frecuencia y porcentaje para las variables cualitativas. Se utilizaron la prueba de la t de Student o la de la χ^2 para explorar las diferencias entre los diferentes grupos. Se calcularon los valores de p correspondientes a las comparaciones de datos emparejados mediante pruebas múltiples con el método de Tukey. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre los perfiles avanzados de lipoproteínas basados en RMN y los parámetros clínicos y analíticos del grupo de control normogluémico.

Por último, para evaluar las diferencias ajustadas entre los grupos para cada subclase de lipoproteína, se utilizaron modelos de regresión multivariante. Las covariables incluidas en el análisis ajustado fueron la edad, el sexo y el IMC. Además, se aplicó una corrección mediante pruebas de comparaciones múltiples con el método de Bonferroni para introducir un control para una tasa de error agrupada prefijada de 0,05.

5.1.2. Material y métodos del segundo artículo.

Población a estudio:

Se estudiaron 304 sujetos procedentes de una cohorte de sujetos daneses con DM1 proveniente del estudio *Thousand & 1* (92).

Del total de 304 sujetos, 154 presentaban disfunción miocárdica sistólica y/o diastólica objetivable por ecocardiograma (grupo con disfunción miocárdica), y los 150 restantes no tenían disfunción miocárdica y procedían de la misma cohorte original, y estaban apareados por edad, sexo y HbA1c con el grupo de disfunción, representando así el grupo de control. Ninguno de los sujetos incluidos en el estudio presentaba ECV previa conocida (con los mismos criterios de definición utilizados en el primer estudio).

Evaluación y variables de interés:

A todos se les realizó un ecocardiograma transtorácico. La disfunción miocárdica subclínica se definió como la presencia de disfunción sistólica y/o diastólica observada en el ecocardiograma en ausencia de síntomas de IC. La disfunción sistólica se definió como una fracción eyección ventrículo izquierdo $\leq 45\%$, mientras la disfunción diastólica como un cociente $E/e' \geq 12$ (donde E corresponde a velocidad de flujo mitral temprano y e' el pico diastólico temprano), o un cociente $E/e' 8-12$ + un volumen de la aurícula izquierda > 34 ml/m².

Además, se realizó en todos los sujetos un análisis por espectroscopia por RMN del perfil lipoproteico avanzado y de la concentración de proteínas glicosiladas determinada a partir de los enlaces entre galactosamina y glucosamina unidos a diferentes proteínas plasmáticas (GlycA) mediante el test de Liposcale®.

Metodología estadística:

Para identificar un perfil metabólico asociado con la presencia de disfunción miocárdica subclínica se realizó un análisis estadístico univariante, y un modelo supervisado multivariante de clasificación basado en regresión de mínimos cuadrados (del inglés, *partial least squares-discriminant analysis*, PLS-DA).

El análisis PLS-DA es un tipo de análisis multivariante utilizado para discriminar qué variables ayudan a una mejor clasificación entre dos grupos. En nuestro caso, el grado de contribución de cada variable a la presencia de disfunción miocárdica en nuestros sujetos con DM1.

Por otro lado, mediante el uso de la regresión logística, se evaluó la capacidad discriminadora para predecir la presencia de disfunción por parte de los biomarcadores obtenidos por RMN cuando éstos se añadían a un modelo que incluía únicamente variables clínicas tradicionales (edad, sexo, FG, NTproBNP, IMC, duración de la diabetes y presión arterial sistólica).

5.2. PRIMER ARTÍCULO.

Título: *Advanced lipoprotein profile in individuals with normal and impaired glucose metabolism.*

Autores: **Carlos Puig-Jové**, Esmeralda Castelblanco, Mireia Falguera, Marta Hernández, Berta Soldevila, María Teresa Julián, Albert Teis, Josep Julve, María Barranco-Altirriba, Josep Franch-Nadal, Manel Puig-Domingo, Emilio Ortega, Núria Amigó, Núria Alonso, Dídac Mauricio.

Revista: Revista Española de Cardiología.

IF (2021) = 7.050 (Q1)

Fecha de publicación: enero de 2022 (Epub: marzo 2021).

Referencia: Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2022 Jan;75(1):22-30.

Doi: [10.1016/j.rec.2021.02.006](https://doi.org/10.1016/j.rec.2021.02.006).

DOI: 10.1016/j.rec.2021.02.006

Disponible en el enlace: <https://www.revespcardiol.org/en-linkresolver-advanced-lipoprotein-profile-in-individuals-S1885585721000736>

5.3. SEGUNDO ARTÍCULO.

Título: *The novel inflammatory biomarker GlycA and triglyceride-rich lipoproteins are associated with the presence of subclinical myocardial dysfunction in subjects with type 1 diabetes mellitus.*

Autores: **Carlos Puig-Jové**, Josep Julve, Esmeralda Castelblanco, María Teresa Julián, Núria Amigó, Henrik U Andersen, Tarunveer S Ahluwalia, Peter Rossing, Dídac Mauricio, Magnus T Jensen, Núria Alonso.

Revista: Cardiovascular Diabetology.

IF (2021) = 8.949 (Q1)

Fecha de publicación: noviembre de 2022.

Referencia: Cardiovasc Diabetol. 2022 Nov 24;21(1):257.

Doi: [10.1186/s12933-022-01652-z](https://doi.org/10.1186/s12933-022-01652-z).

RESEARCH

Open Access



The novel inflammatory biomarker GlycA and triglyceride-rich lipoproteins are associated with the presence of subclinical myocardial dysfunction in subjects with type 1 diabetes mellitus

Carlos Puig-Jové^{1,2†}, Josep Julve^{3,4†}, Esmeralda Castelblanco⁵, M Teresa Julián^{3,6}, Núria Amigó^{3,7,8}, Henrik U Andersen⁹, Tarunveer S Ahluwalia^{9,10}, Peter Rossing^{9,11}, Dídac Mauricio^{3,12,13}, Magnus T Jensen¹⁴ and Núria Alonso^{2,3,6*}

Abstract

Background Subjects with Type 1 diabetes mellitus (T1DM) have an increased incidence of heart failure (HF). Several pathophysiological mechanisms have been involved in its development. The aim of this study was to analyze the potential contribution of the advanced lipoprotein profile and plasma glycosylation (GlycA) to the presence of subclinical myocardial dysfunction in subjects with T1DM.

Methods We included subjects from a Danish cohort of T1DM subjects (*Thousand & 1 study*) with either diastolic and/or systolic subclinical myocardial dysfunction, and a control group without myocardial dysfunction, matched by age, sex and HbA1c. All underwent a transthoracic echocardiogram and an advanced lipoprotein profile obtained by using the NMR-based Liposcale® test. GlycA NMR signal was also analyzed. Systolic dysfunction was defined as left ventricular ejection fraction $\leq 45\%$ and diastolic dysfunction was considered as $E/e' \geq 12$ or $E/e' 8-12 +$ volume of the left atrium > 34 ml/m². To identify a metabolic profile associated with the presence of subclinical myocardial dysfunction, a multivariate supervised model of classification based on least squares regression (PLS-DA regression) was performed.

Results One-hundred forty-six subjects had diastolic dysfunction and 18 systolic dysfunction. Compared to the control group, patients with myocardial dysfunction had longer duration of diabetes ($p = 0.005$), and higher BMI ($p = 0.013$), serum NTproBNP concentration ($p = 0.001$), systolic blood pressure ($p < 0.001$), albuminuria ($p < 0.001$), and incidence of advanced retinopathy ($p < 0.001$). The supervised classification model identified a specific pattern

[†]These authors contributed equally to this study

Dídac Mauricio, Magnus T Jensen and Núria Alonso share senior authorship

*Correspondence:
Núria Alonso
nalonso32416@yahoo.es

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



© The Author(s) 2022. **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 Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

associated with myocardial dysfunction, with a capacity to discriminate patients with myocardial dysfunction from controls. PLS-DA showed that triglyceride-rich lipoproteins (TGRLs), such as VLDL (total VLDL particles, large VLDL subclass and VLDL-TG content) and IDL (IDL cholesterol content), as well as the plasma concentration of GlycA, were associated with the presence of subclinical myocardial dysfunction.

Conclusion Proatherogenic TGRLs and the proinflammatory biomarker Glyc A are strongly associated to myocardial dysfunction in T1DM. These findings suggest a pivotal role of TGRLs and systemic inflammation in the development of subclinical myocardial dysfunction in T1DM.

Keywords Myocardial dysfunction, Heart failure, Type 1 diabetes, Lipoproteins, GlycA

Background

Diabetes mellitus (DM) and heart failure (HF) are two multifaceted entities that involve high morbidity and mortality when both conditions coexist [1, 2]. The risk of HF is increased both in subjects with type 2 DM (T2DM) [3] and type 1 DM (T1DM) [4]. Indeed, DM is highly prevalent amongst patients with HF [5, 6], especially those with HF and preserved ejection fraction (HFpEF) [7, 8].

In population-based studies, the risk of HF in patients with diabetes (particularly T2DM) is significantly increased following adjustment for well-established HF risk factors [9]. The resulting specific form of cardiomyopathy is known as “diabetic cardiomyopathy” [10]. Although the concept of diabetic cardiomyopathy is often considered in individuals affected by T2DM, a metabolically-induced cardiomyopathy, independent of hypertension, nephropathy or ischemic heart disease is also evident in individuals with T1DM [11, 12].

Several pathophysiological mechanisms directly affecting the structure and function of the myocardium have been proposed to contribute to the development of diabetic cardiomyopathy. Among those described are hyperglycemia, hyperinsulinemia, inflammation and increased levels of circulating fatty acids (FAs) and triglycerides (TGs) [13–17]. Systemic inflammation plays a key role in HF etiopathogenesis [18, 19]. In that sense, GlycA has been described as a “composite biomarker of systemic inflammation” since its signal on nuclear magnetic resonance (NMR) spectra represents both the levels and degree of glycosylation of various acute phase proteins. GlycA NMR signal has been reported to be associated with increased risk of CV events, peripheral arterial disease, and mortality even after adjusting for other inflammatory markers [20, 21].

Lipotoxicity and cardiac lipid accumulation are other factors that have been related to the etiopathogenesis of diabetic cardiomyopathy [22]. In this line, myocardial metabolism studies have shown a reduced myocardial glucose uptake and an increased uptake of FAs in subjects with T1DM [23]. In T1DM, insulin deficiency promotes the mobilization of FAs from fat pads which results in an increased availability of excess FAs in different tissues,

including the myocardium. When the capacity for storage and oxidation of mobilized FAs is exceeded, they can be transformed in other reactive species that further potentiates myocardial lipotoxicity. This cause of non-ischemic and non-hypertensive cardiomyopathy is often referred to as diabetic or “lipotoxic” cardiomyopathy.

Diabetic dyslipidaemia may also contribute to the diabetic myocardial dysfunction. Particularly, the excess flux of mobilized FAs to the liver promotes overproduction of TG-rich lipoproteins (TGRLs) and their remnants. Elevations in circulating TGRLs are frequently associated with increased concentrations of remnant cholesterol and with reduced high-density lipoproteins (HDL) cholesterol, and all contribute to the development of ischemic heart disease [24]. However, their contribution, if any, on non-ischemic cardiomyopathy remains poorly explored.

To the best of our knowledge, no previous studies in T1DM patients have studied the relationship between metabolic advanced profile with subclinical HF, defined as presence of impaired cardiac diastolic and/or systolic function without previous clinical manifestation of HF. Thus, the present study aims to analyze the contribution of inflammation (GlycA) and an advanced lipoprotein profile to the presence of subclinical myocardial dysfunction in a well-defined cohort of T1DM patients.

Methods

Study population

Our study population was selected from the *Thousand & 1 study* cohort study. This study was carried out at the Steno Diabetes Center in Copenhagen (SDCC) with cardiology examinations conducted at the Department of Cardiology, Copenhagen University Hospital Herlev-Gentofte. It was conducted between April 1st, 2010, and April 1st, 2012, and was based on a large cohort of 1.093 patients with T1DM without known heart disease. Patients were included if they were 18 years of age or older, attending the outpatient clinic at the SDCC, diagnosed with T1DM, without known heart disease (defined as any known HF, coronary artery disease [including previous myocardial infarction, stable angina, previous percutaneous coronary intervention, or coronary artery bypass surgery], atrial fibrillation or atrial flutter,

left bundle branch block, congenital heart disease, pacemaker or implantable cardioverter defibrillator implantation), and if willing to participate in the study. The study population has been described in detail elsewhere [25]. Briefly, from the total study population included in the study, 15.5% (n=169) of the participants had grossly abnormal systolic or diastolic function.

From the original cohort of *Thousand & 1 study*, we finally included a subgroup of 304 patients with T1DM, comprising 154 patients with myocardial dysfunction (the myocardial dysfunction group) and 150 controls. For the myocardial dysfunction group, we selected all T1DM patients who had either diastolic and/or systolic myocardial dysfunction and enough serum sample for conducting the NMR spectroscopy analysis. Additionally, we included 150 patients from the same cohort who had no echocardiographic alterations (the control group) matched by age, glycated hemoglobin (HbA1c) and gender.

Ethical consideration

The original study was performed in accordance with the second Helsinki declaration and approved by the regional ethics committee (H-3-2009-139) and the Danish Data Protection Agency (00934-Geh-2010-003). All subjects gave written informed consent.

Study visit

Prior to the echocardiographic examination, all patients received study information, signed the consent form and filled out a questionnaire with information about lifestyle factors, including smoking, exercise, alcohol consumption and cardiorespiratory symptoms. The use of cardiovascular treatments, such as lipid lowering medication (statins) and antihypertensive medication (beta blockers, calcium antagonists, diuretics, angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor antagonists), was also recorded. Blood pressure was measured in the supine position.

Echocardiogram

Echocardiography was performed with a General Electric, Vivid 7 Dimension imaging system device (GE Vingmed Ultrasound AS, Horten, Norway) with a 3.5-MHz transducer in accordance with the recommendations from the European Association of Echocardiography/American Society of Echocardiography [26]. Echocardiographic examinations were read and analysed using the General Electric EchoPAC software (BT11), recording three consecutive heart cycles. Left ventricle ejection fraction (LVEF) was determined by Simpson's biplane method. Left atrial volume (LAV) was determined by the recommended biplane area-length method and indexed

for body surface area. LV mass was determined by the linear method and indexed for body surface area.

Subclinical myocardial dysfunction was defined when patients had systolic and/or diastolic myocardial dysfunction on the echocardiogram in the absence of HF symptoms. Systolic dysfunction was defined as LVEF \leq 45% determined by Simpson's biplane method and diastolic dysfunction was considered if there was evidence of long-standing LV filling pressure defined as $E/e' > 12$ (where E is diastolic mitral early inflow velocity and e' is pulsed-wave early diastolic tissue doppler velocity) or $E/e' 8-12$ and LAV > 34 ml/m².

Biochemistry

Information about biochemistry such as HbA1c, p-creatinine and albuminuric status was collected from electronic patient files at the SDCC from the ambulatory visit closest to study inclusion, which was maximally ± 4 months from inclusion. This information was collected after analyzing the echocardiography.

The urinary albumin excretion rate (UAER) was measured in 24-h sterile urine collections by enzyme immunoassay. Patients were categorized as normoalbuminuric if the UAER, in two out of three consecutive measurements, was < 30 mg/24 h, microalbuminuric if the UAER was between 30 and 300 mg/24 h, and macroalbuminuric if the UAER > 300 mg/24 h. HbA1c was measured by high-performance liquid chromatography (normal range: 21–46 mmol/mol [4.1–6.4%]; Variant; Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany), and serum creatinine concentration was measured by an enzymatic method (Hitachi 912; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated by the MDRD method.

Lipoprotein and glycoprotein analysis by NMR spectroscopy (advanced profile)

Serum samples were shipped on dry ice from the SDCC to the Biosfer Teslab facilities (Reus, Spain) for Liposcale[®] lipoprotein and glycoprotein analysis. Samples were kept at -80°C until the NMR analysis. 200 μl of serum was diluted with 50 μl deuterated water and 300 μl of 50 mM phosphate buffer solution at pH 7.4. ¹H-NMR spectra were recorded at 306 K on a Bruker Avance III 600 spectrometer operating at a proton frequency of 600.20 MHz (14.1 T).

Lipoprotein analysis

Lipoprotein profiling was obtained by using the Liposcale[®] test (IVD-CE), a previously reported method based on a two-dimensional ¹H-NMR diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) approach for lipoprotein profile characterization including lipid content (cholesterol and triglyceride concentration), size and particle number of

the main lipoprotein classes [27]. The methyl signal was deconvoluted by using 9 Lorentzian functions to determine the lipid concentration of the large, medium and small subclasses of the main lipoprotein classes: very low-density lipoproteins (VLDL), low-density lipoproteins (LDL) and HDL, and their size associated diffusion coefficients. Then, the lipid concentration was combined with their associated particle volume in order to quantify the number of particles required to transport the measured lipid concentration of each lipoprotein subclass. Weighted average VLDL, LDL and HDL particle sizes were calculated from various subclass concentrations by summing the known diameter of each subclass multiplied by its relative percentage of subclass particle number. The variation coefficients for the particle numbers were between 2% and 4%, and for the particle sizes they were lower than 0.3%.

Glycoprotein analysis

The region of the ¹H-NMR spectrum where the glycoproteins resonate (2.15–1.90 ppm) was deconvoluted using several analytical functions associated with specific plasmatic sugar-protein bonds according to a previously published procedure [28]. For each function, the total area (proportional to concentration), height, position and bandwidth were determined. The area of the specific glycoprotein signal defined as the GlycA NMR signal arose from the acetyl groups of N-acetylglucosamine and N-acetylgalactosamine bonded to plasmatic proteins [29]. Consistent with that, a larger GlycA area reflects a higher level of plasmatic glycosylation. The height-to-width (H/W) ratio of the GlycA signal, associated with its molecular aggregation state, was also reported. The H/W parameter, increased during inflammatory processes, reflects the sugar-protein bond flexibility, indicating glycosylation in accessible regions of the proteins. Height is defined as the difference from baseline to the maximum of the corresponding NMR peaks and the width value corresponds to the peak width at half height.

Statistical analysis

We used widely described chemometric methods [30] in order to identify a specific lipoprotein/glycoprotein profile associated with myocardial dysfunction. Briefly, multivariate statistical analyses were computed in MATLAB, Ver. 7.10.0 using PLS-Toolbox, Ver. 5.2.2 (Eigenvector Research Inc., Manson, WA, United States) after application of a genetic algorithm (GA) for variable selection to optimize the predictive ability of the model. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) models were used as a supervised classification method between the study groups. This is a well established and widely used method in

chemometrics- and metabolomics-based analyses when a large number of variables are used to classify two-stage conditions. PLS-DA relates the X matrix (input data including NMR derived parameters, clinical and anthropometric variables), and the Y matrix (presence or absence of myocardial dysfunction) to find the maximum discrimination between classes (study groups). The PLS-DA method reduces the dimensionality of the initial dataset (X matrix), creating a new multidimensional dataset for each individual maximizing the total variance of data using just a few components (the latent scores), obtained from the specific contribution of each variable (loadings) to the new multidimensional axis [31].

On the other hand, to avoid overfitting and correct the multiple testing effects, we auto scaled and cross-validated by the permutation Venetian Blinds cross validation method by using 10 splits of the input data. The area under the curve (AUC) was used to evaluate the capacity of the NMR and clinical variables to distinguish between the two groups (with and without subclinical myocardial dysfunction).

The following subset of 19 clinical and biochemical variables was selected after a GA approach: diabetes duration, body mass index (BMI), hemoglobin, intermediate-density lipoproteins (IDL) cholesterol content (IDL-C), LDL cholesterol content (LDL-C), VLDL TG content (VLDL-TG), total VLDL particles (VLDL Particles), Large VLDL, total LDL particles (LDL Particles), total HDL particles (HDL Particles); Large HDL, Medium HDL, LDL size (LDL-Z), HDL size (HDL-Z), GlycA area, H/W GlycA ratio (H/W GlycA), HDL-TG/HDL-C ratio (HDL ratio), Small VLDL/total VLDL particles ratio (% Small VLDL) and Small LDL/total LDL particles ratio (% Small LDL).

Finally, we assessed the discrimination capacity of NMR biomarkers to predict the presence of myocardial dysfunction when these variables were added to the model including only traditional clinical variables (age, sex, eGFR, NTproBNP, BMI, diabetes duration and systolic blood pressure) by using logistic regression.

Results

Clinical characteristics of our study population

Our study population comprised a total of 304 T1DM subjects (53.6% women, 50.7% subjects with myocardial dysfunction) with a median [min;max] age of 62.1 [22.5;87.0] years at inclusion, median diabetes duration of 33 years and a median HbA1c value of 8.0%. Clinical characteristics by group are shown in Table 1. Briefly, there were no differences regarding gender, age, HbA1c value, smoking habit, total cholesterol, LDL cholesterol and TGs values between the groups. From a total of 154 subjects with myocardial dysfunction, 146 (94.8%) and

Table 1 Descriptive analysis of clinical variables by group

Variable	Myocardial Dysfunction (n 154)	Control (n 150)	p value
Sex (men)	72 (46.8%)	69 (46.0%)	0.987
Age (years)	61.0 (11.7)	60.6 (11.1)	0.756
Diabetes duration (years)	35.1 (14.9)	30.1 (15.5)	0.005
EF (%)	55.8 (7.58)	58.6 (5.24)	<0.001
E/e' Cocient			<0.001
E/e' <8	8 (5.19%)	92 (61.3%)	
E/e' 8–12	67 (43.5%)	58 (38.7%)	
E/e' >12	79 (51.3%)	0 (0.00%)	
LAV (ml/m ²)	34.1 (7.67)	28.9 (5.52)	<0.001
Diastolic HF			<0.001
No	8 (5.19%)	150 (100%)	
Yes	146 (94.8%)	0 (0.00%)	
Systolic HF			<0.001
No	136 (88.3%)	150 (100%)	
Yes	18 (11.7%)	0 (0.00%)	
Height (m)	1.71 (0.09)	1.73 (0.10)	0.037
Weight (Kg)	76.4 (15.1)	75.1 (13.7)	0.422
BMI (Kg/m ²)	26.1 (3.93)	25.0 (3.66)	0.013
Diastolic BP (mmHg)	73.5 (11.2)	71.4 (9.53)	0.073
Systolic BP (mmHg)	143 (17.7)	136 (17.9)	0.002
Statin use			0.039
No	52 (33.8%)	69 (46.0%)	
Yes	102 (66.2%)	81 (54.0%)	
Antihypertensive use			<0.001
No	29 (19.8%)	59 (39.3%)	
Yes	125 (81.2%)	91 (60.7%)	
Smoking habit			0.140
Never smoker	51 (33.1%)	61 (40.7%)	
Current smoker	25 (16.2%)	30 (20.0%)	
Ex-smoker	78 (50.6%)	59 (39.3%)	
NTproBNP (pg/mL)	352 [163;591]	249 [116;449]	<0.001
MRproANP (pmol/L)	100 [69.2;144]	82.3 [56.4;112]	<0.001
HbA1c value (%)	8.19 (1.11)	8.01 (1.20)	0.178
Total cholesterol (mmol/L)	4.77 (0.99)	4.72 (0.93)	0.620
LDL cholesterol (mmol/L)	2.44 (0.70)	2.44 (0.80)	0.997
Triglycerides (mmol/L)	1.12 (0.78)	1.07 (0.60)	0.595
24 h albumin in urine (mg/24 h)	309 (1587)	18.0 (26.0)	0.026
eGFR value (mL/min/1.73m ²)	75.4 (26.2)	83.7 (21.0)	0.003
Albuminuria status			<0.001
Normoalbuminuria	73 (47.4%)	110 (73.3%)	
Microalbuminuria	42 (27.3%)	35 (23.3%)	
Macroalbuminuria	39 (25.3%)	5 (3.33%)	
Retinopathy status global (worst eye)			<0.001
Normal	37 (24.2%)	55 (36.7%)	
Simplex retinopathy	63 (41.2%)	79 (52.7%)	
Proliferative retinopathy	53 (34.6%)	16 (10.7%)	

Results are expressed in mean (SD) for continuous variables, frequency and percentage for categorical variables and median [25th;75th] for variables not normally distributed. EF: ejection fraction, E/e': estimated left ventricular filling pressure, LAV: left atrial volume, HF: heart failure. BMI: body mass index, BP: blood pressure, NTproBNP: N-terminal fragment of pro-B-type natriuretic peptide, MRproANP: Mid-regional pro atrial natriuretic peptide, HbA1c: glycated hemoglobin, LDL: low-density lipoproteins, eGFR: estimated glomerular filtration rate

Table 2 Lipoprotein and glycoprotein NMR advanced profile in cases and controls

Variable	Myocardial Dysfunction (n 154)	Control (n 150)	p value
VLDL-P (nmol/L)	41.3 (26.5)	44.4 (30.3)	0.343
Large VLDL-P	1.11 (0.65)	1.17 (0.65)	0.406
Medium VLDL-P	3.66 (2.31)	4.08 (3.53)	0.215
Small VLDL-P	36.5 (24.5)	39.1 (27.0)	0.377
LDL-P (nmol/L)	1217 (231)	1230 (235)	0.608
Large LDL-P	172 (32.7)	173 (30.7)	0.757
Medium LDL-P	353 (115)	363 (109)	0.457
Small LDL-P	691 (134)	694 (138)	0.845
HDL-P (nmol/L)	32.6 (6.59)	32.4 (6.38)	0.708
Large HDL-P	0.29 (0.05)	0.29 (0.04)	0.891
Medium HDL-P	11.2 (2.55)	11.0 (2.26)	0.451
Small HDL-P	21.1 (4.58)	21.1 (4.61)	0.895
Total-P/HDL-P	40.1 (11.5)	41.3 (14.2)	0.442
LDL-P/HDL-P	38.8 (10.9)	39.8 (13.3)	0.465
VLDL-C (mg/dL)	15.2 (10.80)	13.8 (9.35)	0.198
IDL-C (mg/dL)	11.6 (4.98)	10.1 (3.96)	0.004
LDL-C (mg/dL)	120 (22.80)	119 (23.40)	0.813
HDL-C (mg/dL)	65.1 (16.40)	66.7 (17.80)	0.401
VLDL-TG (mg/dL)	57.8 (39.30)	53.9 (33.10)	0.353
IDL-TG (mg/dL)	11.9 (3.90)	10.7 (3.25)	0.003
LDL-TG (mg/dL)	16.5 (4.46)	15.5 (4.15)	0.048
HDL-TG (mg/dL)	18.2 (4.83)	17.2 (4.98)	0.073
VLDL-Z (nm, diameter)	41.9 (0.44)	42.0 (0.45)	0.921
LDL-Z (nm, diameter)	21.0 (0.31)	21.0 (0.34)	0.687
HDL-Z (nm, diameter)	8.28 (0.07)	8.28 (0.08)	0.633
Cholesterol total (mg/dL)	212 (31.2)	210 (30.60)	0.582
TG total (mg/dL)	104 (47.1)	97.2 (39.40)	0.155
HDL-C (mg/dL)	65.1 (16.4)	66.7 (17.80)	0.401
Ratio VLDL (VLDL-TG/VLDL-C)	4.19 (1.34)	4.41 (1.41)	0.160
Ratio LDL (LDL-TG/ LDL-C)	0.14 (0.03)	0.13 (0.03)	0.012
Ratio IDL (IDL-TG/IDL-C)	1.08 (0.18)	1.12 (0.23)	0.123
Ratio HDL (HDL-TG/ HDL-C)	0.29 (0.10)	0.27 (0.10)	0.061
% VLDL (Small/total VLDL-P)	0.88 (0.04)	0.88 (0.04)	0.916
% LDL (Small/total LDL-P)	0.57 (0.06)	0.57 (0.06)	0.491
% HDL (Small/total HDL-P)	0.65 (0.04)	0.65 (0.05)	0.596
GlycA area (1,39*10 ² µmol/L)	4.93 (0.94)	4.66 (0.85)	0.009
H/W GlycA	16.9 (3.09)	15.8 (2.80)	0.001

Results are expressed in mean (SD). VLDL: very-low-density lipoproteins, P: particles, LDL: low-density lipoproteins, HDL: high-density lipoproteins, C: cholesterol, IDL: intermediate-density lipoproteins, TG: triglycerides, Z: size, H/W: height-to-width ratio

18 (11.7%) had diastolic and systolic dysfunction, respectively. Subjects with myocardial dysfunction showed, in comparison with controls, a longer diabetes duration (35.1±14.9 years vs. 30.1±15.5 years; $p=0.005$), a higher BMI (26.1±3.9 kg/m² vs. 25.0±3.7 kg/m²; $p=0.013$), a higher systolic blood pressure (143 mmHg vs. 136 mmHg; $p<0.001$) and a lower eGFR (75.4±26.2 mL/min/1.73m² vs. 83.7±21.0 mL/min/1.73m²; $p=0.003$). Differences in echocardiographic parameters

and serum cardiac biomarkers of HF were also observed between the two groups. In summary, subjects with myocardial dysfunction had lower mean (SD) ejection fraction (55.8±7.5% vs. 58.6±5.2%, $p<0.001$), higher LAV (34.1±7.6 ml/m² vs. 28.9±5.5 ml/m², $p<0.001$) and higher median [25th;75th] concentrations of N-terminal fragment of pro-B-type natriuretic peptide (NTproBNP) (352 [163;591] pg/mL vs. 249 [116;449] pg/mL, $p=0.001$), and mid-regional pro atrial natriuretic peptide (MRproANP) (100 [69.2;144] pmol/L vs. 82.3 [56.4;112] pmol/L, $p<0.001$). Also, the percentage of subjects with $E/e' >8$ on echocardiography was higher in subjects with myocardial dysfunction compared with those without myocardial dysfunction (94.8% vs. 38.7%, $p<0.001$). Additionally, the use of statin and antihypertensive therapies was more frequent in subjects with myocardial dysfunction than in those without ($p=0.039$ and $p<0.001$ respectively). Finally, subjects with myocardial dysfunction were more likely to have advanced stages of retinopathy and albuminuria ($p<0.001$ for both comparisons) than those without.

Lipoprotein and glycoprotein NMR advanced profile in subjects with myocardial dysfunction and controls

Results from the lipoprotein and glycoprotein profile are shown in Table 2. Most remarkably, compared with controls, subjects with myocardial dysfunction presented a more proatherogenic and pro-inflammatory profile, associated with increased IDL cholesterol and TG content ($p=0.004$ and 0.003 respectively) and a greater GlycA area ($p<0.001$). The LDL lipid composition, defined as LDL-TG / LDL-C, was also increased in the myocardial dysfunction group, reflecting increased remnant levels and neutral lipid heteroexchange (TGs and cholesteryl esters) from TG-rich particles to LDL particles, and vice versa, by the cholesteryl ester transfer protein.

Lipoprotein and glycoprotein signature associated with the presence of myocardial dysfunction

We used a multivariate classification approach based on PLS-DA in order to identify a specific lipoprotein and glycoprotein profile associated with myocardial dysfunction in subjects with T1DM. Figure 1 shows the good performance of the classification method by using a ROC curve analysis, and the contribution of each variable to the model, summarized in the loadings plot of the principal two latent multidimensional variables (LV1 and LV2).

This supervised classification model succeeded in identifying a specific pattern associated with myocardial dysfunction, with a capacity to discriminate diabetic patients with myocardial dysfunction from the rest of the individuals without CVD, in a modest but significant way in relation to fortuitously obtaining the correct classification (area under the ROC curve 0.63, $p<1.1801e-012$).

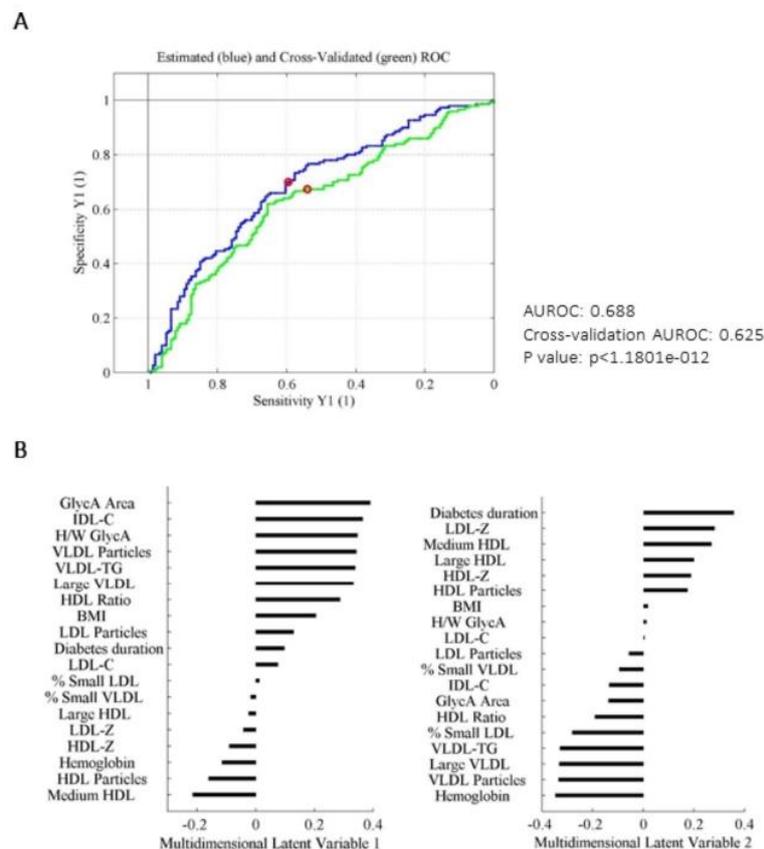


Fig. 1 **A:** Estimated and cross-validated ROC curve of the PLS-DA classification model. **B:** Contribution of each variable to the multidimensional latent variables LV1 and LV2. PLS-DA relates the X matrix (input data including NMR derived parameters, clinical and anthropometric variables) and the Y matrix (presence or absence of myocardial dysfunction) to find the maximum discrimination between both groups. AUROC: area under the ROC curve, PLS-DA: partial least squares discriminant analysis, LV: latent variable, NMR: nuclear magnetic resonance

In that sense, we used the PLS-DA classification approach to investigate which variables discriminated best between subjects with myocardial dysfunction and controls (non-myocardial dysfunction subjects). LV1 showed that the variables with the most significant contribution to explain the presence of myocardial dysfunction in T1DM subjects beyond well-established risk factors included: NMR-determined GlycA area and H/W GlycA ratio as well as TGRLs, such as VLDL (total VLDL particles, large VLDL subclass and VLDL-TG content) and IDL (IDL cholesterol content). In the second latent variable (i.e. after the first discriminating analysis based on inflammatory parameters and VLDL and IDL related parameters was accomplished), other clinical variables including diabetes duration and LDL related characteristics (LDL-Z) became discriminative, whereas VLDL related variables were no longer discriminant. Furthermore, we compared the predicted probability of the presence of myocardial dysfunction when NMR variables were added together with traditional risk factors by using logistic regressions.

Supplementary Fig. 1 shows the predicted probability of myocardial dysfunction in a model (model 1) including only classical risk variables (age, sex, eGFR, NTproBNP, BMI, diabetes duration and systolic blood pressure >140mmHg). We built a second model (model 2) including both classical variables and the NMR-assessed biomarkers. The inclusion of the NMR variables in this second model significantly increased the area under the ROC curve from 0.62 [0.56–0.68] to 0.67 [0.61–0.73], with a net reclassification analysis improvement considering NMR-assessed parameters of 21%.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to date evaluating the association between a metabolic advanced profile with subclinical myocardial dysfunction assessed with echocardiography in subjects with T1DM. The analysis has been performed in a well characterized large cohort of T1DM patients without prior CVD. Our data showed that the inflammation biomarker

GlycA as well as VLDL-related variables (total VLDL particles, large VLDL subclass and VLDL-TG content) and IDL-related variables (IDL cholesterol content) were associated with the presence of myocardial dysfunction in T1DM subjects.

Although the underlying mechanisms explaining the myocardial dysfunction remain still obscure, accumulating evidence supports the role of chronic inflammation in its manifestation and progress to HF [32–33]. In support of this, our data suggest that the circulating levels of GlycA are related to myocardial dysfunction in T1DM subjects. Our finding is consistent with the significance of circulating GlycA, as it integrates in a single metrics the plasma concentrations [34] and glycosylation states [29, 35] of several abundant acute-phase inflammatory proteins. Notably, GlycA exhibits lower intraindividual variability and greater analytical precision than other inflammatory markers [34], thereby suggesting a role as a potential novel biomarker linked to systemic inflammation and CVD assessment [36–38]. In line with this, the serum levels of GlycA are directly associated with those of C-reactive protein (CRP) [39], which is a well-established diagnostic biomarker of inflammation used in clinical practical clinical. Noteworthy, the advantage offered by GlycA over CRP is that it may integrate multiple inflammatory pathways by capturing the global signal of several proteins and, therefore, better captures the degree of systemic inflammation [40]. In addition, the measurement of GlycA is associated with higher reliability and lower intra-individual variability than CRP because it is detected similarly in both serum and plasma samples, in fasting and non-fasting states, after short or long-term storage [34], and also after repeated intraindividual determinations over time [41].

A main finding of our study was that GlycA values allowed identification of T1DM subjects with and without subclinical myocardial dysfunction. Our data are in line with other study that support the concept that GlycA is associated with an increased risk of HF, particularly HFpEF, which is independent of traditional CVD risk factors and other inflammatory markers [42]. To our knowledge, data about GlycA concentrations in subjects with T1DM are lacking and for the first time our results regarding GlycA further suggest a role for inflammatory mechanisms in the pathogenesis of myocardial dysfunction in these patients.

Our data also showed that some characteristics of VLDL-related particles, together with GlycA, could help to better discriminate between T1DM subjects with and without subclinical myocardial dysfunction. Regarding T1DM, the advanced characteristics of VLDL has been positively and independently associated with arterial stiffness [43]. Likewise, similar associations have

also been described in T1DM women with previous pre-eclampsia with carotid atherosclerosis [44].

Additionally, the role of TGRLs in HF has been previously established. In two prospective studies of 113,554 individuals from the general population in Denmark, a higher risk of HF for stepwise higher non-fasting TGs (i.e., TGRLs, which also include the chylomicron remnants) was found [45].

Although evidence supporting a relationship between cholesterol remnants and non-ischemic causes of HF is limited, the induction of VLDL receptor (VLDLR) abundance and TGRL uptake by cardiomyocytes in an experimental postprandial setting [46] suggest a role for VLDLR in atrial cardiomyopathy and ventricular dysfunction [47, 48]. Indeed, an association of atrial fibrillation with abnormal VLDL-related lipid metabolism has been suggested by some authors [48] and an increased risk of developing atrial fibrillation among patients with T1DM compared with the general population has been reported [49].

According to previous studies, the circulating baseline levels of GlycA exhibit significant positive associations with incident CVD event rates and associated mortality [37]. Remarkably, such correlations remain significant even after adjusting for several other established CVD risk factors. In our study, the discriminating capability of our PLS-DA model was not improved when including either the 24 h-urinary albumin excretion rate or NTproBNP as input variables, maintaining GlycA as the best discriminating variable for the presence of myocardial dysfunction in subjects with T1DM (data not shown).

The multivariate approach used in the present study by using the PLS-DA methodology helped in identifying concomitant lipoprotein characteristics (TGRLs) that, together with the proinflammatory GlycA, could mainly account for myocardial dysfunction in T1DM subjects on top of the commonly used traditional and well-established risk factors, including BMI, gender, HbA1c or diabetes duration. Inflammation showed the higher discriminant ability distinguishing myocardial dysfunction among T1DM patients, with the GlycA area being the highest contributor to the first multidimensional latent variable (LV1). Of note, diabetes duration helped to discriminate myocardial dysfunction from non-myocardial dysfunction T1DM patients only once the inflammatory signature was considered, as shown in the second latent variable (LV2) of the multivariable classification analysis. Furthermore, this second multidimensional latent variable showed a loss of association between isolated increased TG-rich parameters and myocardial dysfunction. Therefore, our data revealed an interaction between GlycA and TGRLs in T1DM subjects with myocardial dysfunction. This association was lost in those patients without myocardial dysfunction.

Our study had some limitations that should be taken into account. We matched individuals with and without subclinical myocardial dysfunction by age, sex and glycemic control. This may have resulted in a biased comparison because, according to original *Thousand & 1 study* results, patients with myocardial dysfunction were likely to be older and have longer diabetes duration than subjects with normal function. Therefore, by selecting subjects who were similar for these criteria, at least one group may be unrepresentative of the population from which it came, and the abnormalities observed in the NMR profile may be different from a truly representative population. Furthermore, considering the condition of hypertension as a risk factor for myocardial dysfunction, is important to emphasize that the use of antihypertensive therapies was significantly more frequent in the group of subjects with myocardial dysfunction. Nevertheless, due to the fact that these drugs can be used both as an antihypertensive treatment as well as a nephroprotective intervention, we consider this as a limitation to assess the condition of hypertension associated with myocardial dysfunction. Additionally, the small number of subjects who presented systolic dysfunction within subjects with myocardial dysfunction (n=18, 11.7%) implies that the results obtained in the present study should be primordially referred to diastolic dysfunction. Finally, since this study is cross-sectional we cannot infer causality between the metabolic profile and presence of myocardial dysfunction. Possible strengths should also be mentioned, since the current population is selected from a large study of ambulatory T1DM patients without previous known heart disease. This cohort had the advantage of a relatively low HbA1c and may therefore be at a lower risk of HF than typical T1DM patients and that may potentially have strengthened our findings.

Conclusion

The present study uncovered associations between subclinical myocardial dysfunction and advanced NMR metabolic characteristics in patients with T1DM that were hidden in conventional analyses. The GlycA area and the H/W GlycA ratio, as well as TGRLs (VLDL and IDL) related variables, were revealed as strong contributors of subclinical myocardial dysfunction. According to the aforementioned results, we propose a pivotal role of TGRLs characteristics and systemic inflammation reflected by the GlycA biomarker in subclinical myocardial dysfunction in T1DM patients.

Estimation of the presence of subclinical myocardial dysfunction among T1DM patients and its relationship with lipoprotein and glycoprotein characteristics revealed in this study still deserves more attention in the future. Therefore, further studies will be required to

clarify the potential clinical applications of these findings as well as to investigate their biological basis.

Abbreviations

DM	Diabetes mellitus.
HF	Heart failure.
T2DM	Type 2 diabetes mellitus.
T1DM	Type 1 diabetes mellitus.
HFpEF	Heart failure with preserved ejection fraction.
CVD	Cardiovascular disease.
FAs	Fatty acids.
TGs	Triglycerides.
NMR	Nuclear magnetic resonance.
TGRLs	Triglycerides-rich lipoproteins.
HDL	High density lipoproteins.
SDCC	Steno diabetes center in Copenhagen.
HbA1c	Glycated hemoglobin.
LVEF	Left ventricle ejection fraction.
LAV	Left atrial volume.
UAER	Urinary albumin excretion rate.
eGFR	Estimated glomerular filtration rate.
DOSY	Diffusion-ordered spectroscopy.
VLDL	Very low-density lipoproteins.
LDL	Low-density lipoproteins.
GA	Genetic algorithm.
PLS-DA	Partial least square discriminant analysis.
AUC	Area under the curve.
BMI	Body mass index.
IDL	Intermediate-density lipoprotein.
NTproBNP	N-terminal fragment of pro-B-type natriuretic peptide.
MRproANP	Mid-regional pro atrial natriuretic peptide.
CRP	C-reactive protein.
VLDLR	VLDL receptor.
hsCRP	High-sensitivity CRP.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12933-022-01652-z>.

Supplementary Material 1: Supplementary Fig. 1: Comparison of the distribution of the predicted probabilities showing the classification performance of the presence of MCD between two different models, being the x-axis the predicted probabilities for both classes and the y-axis the count of observations. A: Model 1 includes classical risk variables (age, sex, eGFR, NTproBNP, BMI, diabetes duration and systolic blood pressure >140mmHg). B: Model 2 includes classical risk variables and the NMR-assessed biomarkers. The inclusion of NMR parameters significantly increased the AUROC from 0.62 [0.56–0.68] to 0.67 [0.61–0.73], with a NRI considering NMR-assessed parameters of 21%. MCD: myocardial dysfunction, BMI: body mass index, NMR: nuclear magnetic resonance, AUROC: area under the ROC curve, NRI: net reclassification improvement.

Acknowledgements

We want to particularly acknowledge the participants of the *Thousand & 1 study* and all the collaboration provided from SDCC.

Author contributions

CPJ, JJ, PR, DM and NAL contributed to the study design, data analysis and interpretation, and the writing of the manuscript. HUA, PR and MTJc contributed to the acquisition, analysis and interpretation of data. EC, MTJc, NAM and TSA contributed to data interpretation and discussion. PR, DM and NAL contributed to the study coordination, conduct of the study and writing of the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript and agreed with the final version of the manuscript.

Funding

The support for the original *Thousand & 1 Study* has been provided by the European Foundation for the Study of Diabetes/Pfizer European Programme 2010 for Research into Cardiovascular Risk Reduction in

Patients with Diabetes; and The Danish Heart Foundation (number 12-04-R90-A3840-22725). This work was supported by Grants from Fundació La MARATÓ de TV3 (201602-30-31 to NAL and JJ), Instituto de Salud Carlos III (PI17-00232 to JJ, PI17-01362 to NAL) and by CIBER -Consortio Centro de Investigación Biomédica en Red- (CB15/00071), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, with co-funding from the European Regional Development Fund (ERDF). JJ is supported by funds provided by ISCIII (Grant CPII18/00004, Miguel Servet II program). This research was partially funded by the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris I de Recerca AGAUR, grant number 2020-PANDE-00083.

Data availability

Primary material is held by the authors.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The original study was approved by the regional ethics committee (H-3-2009-139), and the Danish Data Protection Agency (00934-Geh-2010-003). The investigation has been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki, and all the included participants provided written informed consents.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

NAM is stockholders of and serve on the board of director of Biosfer Teslab, a diagnostic laboratory company that performed the lipoprotein and glycoprotein analyses described herein. The remaining authors declared not having anything to disclose regarding conflict of interest with respect to this manuscript.

Author details

¹Department of Endocrinology & Nutrition, University Hospital Mútua de Terrassa, Terrassa, Spain

²Department of Medicine, Autonomous University of Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

³Center for Biomedical Research on Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

⁴Sant Pau Biomedical Research Institute (IB Sant Pau), Barcelona, Spain

⁵Division of Endocrinology, Metabolism and Lipid Research, Washington University School of Medicine in St. Louis, St Louis, MO, USA

⁶Department of Endocrinology & Nutrition, University Hospital and Health Sciences Research Institute Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

⁷Biosfer Teslab SL, Reus, Spain

⁸Department of Basic Medical Sciences, Universitat Rovira i Virgili (URV), Reus, Spain

⁹Steno Diabetes Center Copenhagen, Herlev, Denmark

¹⁰Department of Biology, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

¹¹Department of Clinical Medicine, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

¹²Faculty of Medicine, University of Vic - Central University of Catalonia (UVic/UCC), Vic, Spain

¹³Department of Endocrinology & Nutrition, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau & Sant Pau Biomedical Research Institute (IB Sant Pau), Barcelona, Spain

¹⁴Department of Cardiology, Copenhagen University Hospital Amager Hvidovre, Copenhagen, Denmark

Received: 23 January 2022 / Accepted: 23 September 2022

Published online: 24 November 2022

References

- Formiga F, Camafort M, Carrasco Sánchez FJ. Heart failure and diabetes: The confrontation of two major epidemics of the 21st century. *Rev Clin Esp*. 2020;Mar;220(2):135–8.
- Lindman BR, Dávila-Román VG, Mann DL, McNulty S, Semigran MJ, Lewis GD, et al. Cardiovascular phenotype in HFpEF patients with or without diabetes: a RELAX trial ancillary study. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(6):541–9.
- Shah AD, Langenberg C, Rapsomaniki E, Denaxas S, Pujades-Rodriguez M, Gale CP, et al. Type 2 diabetes and incidence of a wide range of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.79 million people. *Lancet*. 2015;26(385 Suppl 1):86.
- Avogaro A, Azzolina D, Fadini GP, Baldi I. Incidence of heart failure in patients with type 1 diabetes: a systematic review of observational studies. *J Endocrinol Invest*. 2021;44(4):745–53.
- Nichols GA, Hillier TA, Erbey JR, Brown JB. Congestive heart failure in type 2 diabetes: prevalence, incidence, and risk factors. *Diabetes Care*. 2001;24:1614–9.
- From AM, Leibson CL, Bursi F, Redfield MM, Weston SA, Jacobsen SJ, et al. Diabetes in heart failure: prevalence and impact on outcome in the population. *Am J Med*. 2006;119:591–9.
- McHugh K, DeVore AD, Wu J, Matsouka RA, Fonarow GC, Heidenreich PA, et al. Heart failure with preserved ejection fraction and diabetes: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(5):602–11.
- Fonarow GC, Stough WG, Abraham WT, Albert NM, Gheorghiadu M, Greenberg BH, et al. Characteristics, treatments, and outcomes of patients with preserved systolic function hospitalized for heart failure: a report from the OPTIMIZE-HF Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(8):768–77.
- Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 2014;57(4):660–71.
- Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2013;34(39):3035–87.
- Götzsche O, Darwish A, Götzsche L, Hansen LP, Sørensen KE. Incipient cardiomyopathy in young insulin-dependent diabetic patients: a seven-year prospective Doppler echocardiographic study. *Diabet Med*. 1996;13(9):834–40.
- Rosengren A, Vestberg D, Svensson AM, Kosiborod M, Clements M, Rawshani A, et al. Long-term excess risk of heart failure in people with type 1 diabetes: a prospective case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(11):876–85.
- Evangelista I, Nuti R, Piccioni T, Dotta F, Palazzuoli A. Molecular Dysfunction and Phenotypic Derangement in Diabetic Cardiomyopathy. *J Mol Sci*. 2019;20(13):3264.
- Borghetti G, von Lewinski D, Eaton DM, Sourij H, Houser SR, Wallner M. Diabetic Cardiomyopathy: Current and Future Therapies. *Beyond Glycemic Control*. *Front Physiol*. 2018;9:1514.
- Tan Y, Zhang Z, Zheng C, Wintergerst KA, Keller BB, Cai L. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17:585–607.
- Spillmann F, Linthout SV, Tschöpe C. Cardiac effects of HDL and its components on diabetic cardiomyopathy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012;12(2):132–47.
- Xu X, Luo Z, He Y, Shan J, Guo J, Li J. Application of untargeted lipidomics based on UHPLC-high resolution tandem MS analysis to profile the lipid metabolic disturbances in the heart of diabetic cardiomyopathy mice. *J Pharm Biomed Anal*. 2020;190:113525.
- Shirazi LF, Bissett J, Romeo F, Mehta JL. Role of inflammation in heart failure. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(6):27.
- Murphy SP, Kakkar R, McCarthy CP, Januzzi JL Jr. Inflammation in heart failure: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(11):1324–40.
- Duprez DA, Otvos J, Sanchez OA, Mackey RH, Tracy R, Jacobs DR Jr. Comparison of the predictive value of GlycA and other biomarkers of inflammation for total death, incident cardiovascular events, noncardiovascular and noncancer inflammatory-related events, and total cancer events. *Clin Chem*. 2016;62(7):1020–31.
- Akinkuolie AO, Buring JE, Ridker PM, Mora S. A novel protein glycan biomarker and future cardiovascular disease events. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(5):e001221.
- Ritchie RH, Zerenturk EJ, Prakoso D, Calkin AC. Lipid metabolism and its implications for type 1 diabetes-associated cardiomyopathy. *J Mol Endocrinol*. 2017;58(4):R225–40.
- Herrero P, Peterson LR, McGill JB, Matthew S, Lesniak D, Dence C, et al. Increased myocardial fatty acid metabolism in patients with type 1 diabetes mellitus. *JACC*. 2006;47(3):598–604.

24. Varbo A, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol and ischemic heart disease. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(4):266–73.
25. Jensen MT, Sogaard P, Andersen HU, Bech J, Hansen TF, Galatius S, et al. Prevalence of systolic and diastolic dysfunction in patients with type 1 diabetes without known heart disease: the Thousand & 1 Study. *Diabetologia*. 2014;57(4):672–80.
26. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18(12):1440–63.
27. 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 1H NMR spectroscopy. *J Lipid Res*. 2015;56(3):737–46.
28. Fuertes-Martín R, Taverer D, Vallvé JC, Paredes S, Masana L, Correig X, et al. Characterization of 1H NMR Plasma Glycoproteins as a New Strategy To Identify Inflammatory Patterns in Rheumatoid Arthritis. *J Proteome Res*. 2018;17(11):3730–9.
29. Fuertes-Martín R, Moncayo S, Insenser M, Martínez-García MA, Luque-Ramírez M, Amigó Grau N, 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*. 2019;18(11):4038–4045.
30. Bro R, Smilde AK. Principal component analysis. *Anal Methods*. 2014;6:2812–31.
31. Lee LC, Liong CY, Jemain AA. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. *Analyst*. 2018;143(15):3526–39.
32. Riehle C, Bauersachs J. Of mice and men: models and mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*. 2018;114(1):2.
33. Riehle C, Bauersachs J. Key inflammatory mechanisms underlying heart failure. *Herz*. 2019;96–106.
34. Otvos JD, Shalaurova I, Wolak-Dinsmore J, Connelly MA, Mackey RH, Stein JH, et al. GlycA: a composite nuclear magnetic resonance biomarker of systemic inflammation. *Clin Chem*. 2015;61(5):714–23.
35. Fuertes-Martín R, Correig X, Vallvé JC, Amigó N. Title: human serum/plasma glycoprotein analysis by 1H-NMR, an emerging method of inflammatory assessment. *J Clin Med*. 2020;9(2):354.
36. Ballout RA, Remaley AT. GlycA: a new biomarker for systemic inflammation and cardiovascular disease (CVD) risk assessment. *J Lab Precis Med*. 2020;5:17.
37. Rodríguez-Carrio J, Alperi-López M, López P, Pérez-Álvarez AI, Gil-Serret M, Amigó N, et al. GlycA levels during the earliest stages of rheumatoid arthritis: potential use as a biomarker of subclinical cardiovascular disease. *J Clin Med*. 2020;9(8):2472.
38. Carmona-Maurici J, Amigó N, Cuello E, Bermúdez M, Baena-Fustegueras JA, Peinado-Onsurbe J. Bariatric surgery decreases oxidative stress and protein glycosylation in patients with morbid obesity. *Eur J Clin Invest*. 2020;50(11):e13320.
39. Mehta NN, Dey AK, Maddineni R, Kraus WE, Huffman KM. GlycA measured by NMR spectroscopy is associated with disease activity and cardiovascular disease risk in chronic inflammatory diseases. *Am J Prev Cardiol*. 2020;4:100120.
40. Connelly MA, Otvos JD, Shalaurova I, Playford MP, Mehta NN. GlycA, a novel biomarker of systemic inflammation and cardiovascular disease risk. *J Transl Med*. 2017;15:219.
41. Moncayo S, Insenser M, Martínez-García MA, Fuertes-Martín R, Amigó-Grau N, Álvarez-Blasco F, et al. Acute-phase glycoprotein profile responses to different oral macronutrient challenges: Influence of sex, functional hyperandrogenism and obesity. *Clin Nutr*. 2021;40(3):1241–6.
42. 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: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circ Heart Fail*. 2020;13(8):e007067.
43. Llauradó G, Amigó N, Cano A, Ballesta S, Albert L, Mazarico I, et al. Specific nuclear magnetic resonance lipoprotein subclass profiles and central arterial stiffness in Type 1 diabetes mellitus: a case control study. *J Clin Med*. 2019;8(11):1875.
44. Amor AJ, Vinagre I, Valverde M, Urquiza X, Meler E, López E, et al. Nuclear magnetic resonance lipoproteins are associated with carotid atherosclerosis in type 1 diabetes and pre-eclampsia. *Diabetes Metab Res Rev*. 2021;37(1):e3362.
45. Varbo A, Nordestgaard BG. Nonfasting triglycerides, low-density lipoprotein cholesterol, and heart failure risk: two cohort studies of 113 554 individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(2):464–72.
46. Nakajima K, Tokita Y, Tanaka A, Takahashi S. The VLDL receptor plays a key role in the metabolism of postprandial remnant lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 2019;495:382–93.
47. Perman JC, Boström P, Lindbom M, Lidberg U, Ståhlman M, Hägg D, et al. The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2625–40.
48. Lee HC, Lin YH. The Pathogenic Role of Very Low Density Lipoprotein on Atrial Remodeling in the Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):891.
49. Dahlqvist S, Rosengren A, Gudbjörnsdóttir S, Pivodic A, Wedel H, Kosiborod M, et al. Risk of atrial fibrillation in people with type 1 diabetes compared with matched controls from the general population: a prospective case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(10):799–807.

Publisher's Note

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

6. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

Los resultados principales de la presente tesis doctoral son:

- Análisis del perfil lipoproteico avanzado en función del grado de alteración en el metabolismo glucídico (sujetos con normogluemia, prediabetes y DM2):
 1. Prácticamente todas las subclases de VLDL fueron significativamente superiores en los sujetos con DM2 en comparación con los sujetos con normogluemia, con unas concentraciones séricas más altas de p-VLDL grandes y pequeñas ($p = 0,040$ y $p = 0,042$, respectivamente).
 2. No se observaron diferencias significativas en la distribución de las LDL al comparar los 3 grupos, pero se puso de manifiesto una reducción estadísticamente significativa del tamaño de las LDL (expresado por el Z-score de las LDL, o LDL-Z) en los sujetos con DM2 en comparación con los sujetos con normogluemia ($p = 0,018$).
 3. Las concentraciones de p-HDL totales en los sujetos con DM2 fueron menores que las del grupo normogluémico ($p = 0,017$), así como las p-HDL medianas ($p = 0,013$). Al mismo tiempo, la mediana de contenido de colesterol en las p-HDL fue inferior en los sujetos con DM2 en comparación con los sujetos con normogluemia ($p = 0,002$).
 4. No se observaron diferencias en el perfil lipoproteico avanzado al comparar los sujetos con prediabetes con sujetos con normogluemia.
 5. En el grupo de sujetos con normogluemia, se observó una correlación positiva entre variables relacionadas con la adiposidad y la resistencia insulínica (IMC, FLI y perímetro de cintura) con un perfil lipoproteico avanzado más proaterogénico, caracterizado por una mayor cantidad de

todas las subclases de VLDL y de su contenido en colesterol y triglicéridos, una mayor cantidad de p-LDL pequeñas y una menor cantidad de p-HDL.

- Análisis del perfil lipoproteico avanzado en el grupo con normogluemia en función del sexo:
 1. El perfil lipoproteico mostró marcadas diferencias en función del sexo de los participantes. Los perfiles lipoproteicos de los sujetos con normogluemia, separados por sexo, están recogidos en la tabla suplementaria del artículo número 1, disponible en el anexo de esta tesis doctoral.
 2. Las mujeres, en comparación con los varones, mostraron concentraciones séricas de p-VLDL más bajas, así como concentraciones de p-HDL más elevadas ($p < 0,001$ para todas las comparaciones excepto la de las p-VLDL medianas, con $p = 0,010$). Por otro lado, en comparación con los varones, la mediana de las concentraciones de p-LDL totales y de p-LDL pequeñas fue inferior en las mujeres (1.256 frente a 1.319 nmol/l; $p = 0,014$; 638 frente a 735 nmol/l; $p < 0,001$, respectivamente).
 3. Las concentraciones séricas del total de partículas no-HDL, que incluyen todas las lipoproteínas proaterogénicas, fueron significativamente inferiores en las mujeres en comparación con los varones ($p = 0,001$).

- Análisis del perfil lipoproteico avanzado en el grupo de sujetos con normogluemia en función de la edad:
 1. Se observó un aumento significativo de varios parámetros lipídicos conforme aumentaba la edad, con $p < 0,001$ para el colesterol total, $p < 0,01$ para el c-LDL y $p < 0,001$ para las LDL totales y todas sus subclases de tamaños (grandes, medianas y pequeñas). Las concentraciones de p-HDL

aumentaron también con la edad: $p = 0,03$ para las HDL totales y $p < 0,001$ para las HDL medianas. El aumento en relación con la edad fue más marcado entre los grupos de edad temprana (18.0-44.3 años) y edad media (44.3-56.4) que entre los de edad media y edad avanzada (56.4-83 años).

- Parámetros del perfil lipoproteico convencional y del perfil lipoproteico avanzado en el grupo de sujetos con normoglucemia:
 1. Del total de sujetos con normoglucemia, únicamente 75 de los 462 participantes (16%) presentaban valores “anormales” tanto de cHDL (< 40 mg/dl los varones y < 50 mg/dl las mujeres) como de cLDL (> 130 mg/dl), mientras que el resto de los participantes (84%) presentaban valores considerados como “normales” para ambos parámetros convencionales.
 2. De entre los sujetos con normoglucemia que presentaban valores considerados como “normales” para c-LDL y c-HDL, aproximadamente la mitad (50,4%) mostraron concentraciones “anormales” de p-LDL totales, al ser éstas superiores a las recomendadas (> 1300 nmol/L).

- Características de los sujetos con DM1 y disfunción miocárdica subclínica:
 1. De los 154 sujetos con disfunción miocárdica subclínica incluidos, 146 (95,4%) presentaban disfunción diastólica y 18 (11,6%) disfunción sistólica.
 2. En comparación con los sujetos del grupo control, los sujetos con disfunción miocárdica presentaban una mayor duración de la diabetes ($p = 0,005$), mayor IMC ($p = 0,013$), mayor concentración sérica de NT-proBNP ($p = 0,001$), mayor presión arterial sistólica ($p < 0,001$), mayor albuminuria ($p < 0,001$), y mayor porcentaje de retinopatía avanzada ($p < 0,001$).

- Parámetros del perfil lipoproteico y glicoproteico avanzado relacionados con la presencia de disfunción miocárdica subclínica en sujetos con DM1:
 1. Se identificó un patrón específico asociado a la presencia de disfunción miocárdica subclínica, con una capacidad para discriminar los pacientes DM1 con disfunción miocárdica del resto de sujetos sin disfunción, de forma modesta pero muy significativa en relación con el azar (*Area Under the ROC Curve* [AUROC] de 0.63, $p < 1.1801e-012$).
 2. El análisis por PLS-DA mostró que, tanto las variables relacionadas con GlycA (área de GlycA y el cociente H/W de GlycA), como aquellas relacionadas con las TRL: VLDL (VLDL totales, su contenido en triglicéridos y el subtipo de VLDL grandes) e IDL (su contenido en colesterol), contribuyen de forma significativa a explicar la presencia de disfunción miocárdica subclínica en sujetos con DM1.
 3. Se comparó la capacidad para predecir la presencia de disfunción miocárdica subclínica cuando se suman las variables obtenidas por RMN a factores de riesgo clásicos reconocidos de IC. La inclusión de las variables del perfil metabólico obtenidas por RMN aumentaba significativamente el AUROC de 0,62 [0,56–0,68] a 0,67 [0,61–0,73] (véase la figura 9).

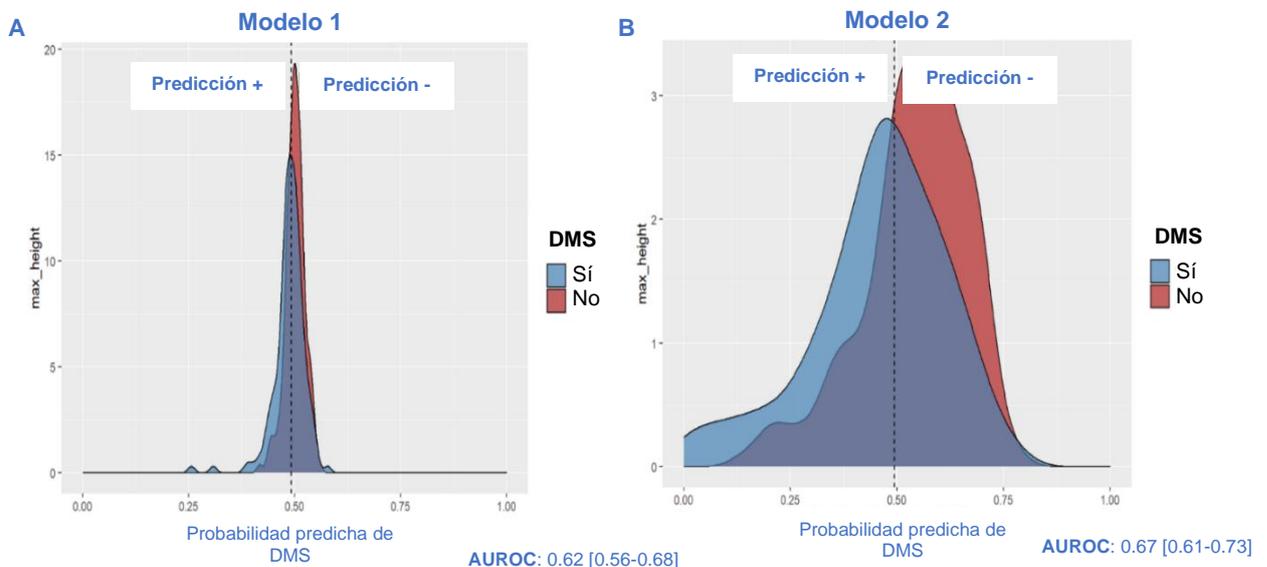


Figura 9: Comparación de la distribución probabilidad que muestra el poder discriminatorio de presencia de DMS entre dos modelos diferentes, siendo el eje X las probabilidades predichas para ambas clases y el eje Y el recuento de observaciones. **A:** El modelo 1 incluye variables de riesgo clásicas (edad, sexo, filtrado glomerular, NTproBNP, índice de masa corporal, duración de la diabetes y presión arterial sistólica > 140 mmHg). **B:** El modelo 2 incluye variables de riesgo clásicas sumadas a diferentes biomarcadores evaluados por RMN. AUROC: área bajo la curva ROC; DMS: disfunción miocárdica subclínica; RMN: resonancia magnética nuclear.

7. RESUMEN DE LA DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Los trabajos incluidos en esta tesis tienen como objetivo genérico identificar las diferencias en el perfil lipoproteico avanzado en diferentes sujetos con distintos grados de alteración del metabolismo glucídico y sin antecedentes de ECV. Por otra parte, esta tesis pretende responder también a otras cuestiones poco estudiadas, como es la relación existente entre el perfil lipoproteico y glicoproteico avanzado con la presencia de disfunción miocárdica subclínica en sujetos con DM1.

Los resultados obtenidos en cada uno de los estudios se discutirán a continuación por separado, pero globalmente confirman la utilidad del estudio del perfil avanzado de lipoproteínas para un abordaje más detallado y profundo de las anomalías lipídicas y, por consiguiente, es posible que en un futuro próximo ésta sea una herramienta útil para lograr una mejor caracterización del riesgo cardiovascular en poblaciones con mayor riesgo lipídico residual, como es el caso de los sujetos con diabetes, en los que el c-LDL en ocasiones no es un marcador lo suficientemente fiable como para orientar completamente las estrategias terapéuticas y preventivas. Por otra parte, se ha observado que el perfil lipoproteico avanzado presenta marcadas variaciones en función del sexo y la edad de los sujetos con normogluceemia, siendo este más desfavorable en varones y en individuos de mayor edad. Además, nuestros resultados demuestran que la caracterización avanzada de lipoproteínas puede aportar también un valor añadido en aquellos individuos que presentan un incremento en los depósitos grasa corporal, principalmente de localización ectópica, en los que los parámetros lipídicos convencionales pueden infraestimar el riesgo futuro de ECV, abriendo así las puertas a un abordaje más individualizado.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren un papel fundamental de las lipoproteínas proaterogénicas ricas en triglicéridos (VLDL e IDL) y de fenómenos relacionados con la inflamación sistémica (mediada por GlycA) en el desarrollo de la disfunción miocárdica subclínica en sujetos con DM1.

A continuación, se discuten los resultados más relevantes.

7.1. COMPARACIÓN DEL PERFIL LIPOPROTEICO AVANZADO SEGÚN EL GRADO DE ALTERACIÓN DEL METABOLISMO GLUCÉMICO.

Hasta la actualidad, el trabajo de investigación de la presente tesis doctoral es el primero en evaluar las diferencias en el perfil lipoproteico avanzado de grupos con diferentes categorías del metabolismo glucémico en una población procedente de la misma área mediterránea. Los sujetos con DM2, en comparación con el grupo con normoglucemia, muestran un perfil avanzado con concentraciones inferiores de p-HDL totales y p-HDL medianas y un aumento de las concentraciones de p-VLDL, debido principalmente a su subclase de mayor tamaño. Los cambios en estas lipoproteínas, distintas a las LDL, resaltan la necesidad de desarrollar nuevos instrumentos que nos permitan una mejor caracterización del perfil lipídico de los individuos con diabetes en la práctica clínica.

Concretamente, deben remarcarse las alteraciones observadas en las VLDL, puesto que este tipo de lipoproteínas se han visto asociadas con un mayor riesgo de ECV (11), aunque actualmente no son objeto de ningún tipo de intervención terapéutica directa. Más específicamente, de acuerdo con un estudio llevado a cabo por Balling et al en sujetos sin ECV y sin tratamiento hipolipemiante, el contenido en colesterol de las VLDL podría justificar hasta la mitad del riesgo derivado del total de lipoproteínas que contienen apoB de sufrir un primer IAM (93). Por otro lado, Johansen et al demostraron que, en sujetos sin ECV previa, para un mismo número total de partículas con apoB, las VLDL se asociaban a un riesgo superior de sufrir un IAM incluso al de las LDL e IDL de

forma conjunta (94), remarcando así la importancia de estudiar la presencia de alteraciones del perfil lipídico relacionadas con este tipo de lipoproteínas. Por otro lado, las alteraciones cualitativas observadas en el perfil lipoproteico relacionado con las HDL también deben ser objeto de mención, dado que se ha demostrado que cambios en su tamaño y distribución, así como en su contenido en colesterol y triglicéridos, se asocian con un mayor riesgo de enfermedad arterial coronaria (95).

En el primer estudio de esta tesis, se ha observado que el perfil lipoproteico avanzado se asocia al grado de alteración del metabolismo glucídico. En este sentido, se ha observado una tendencia a un empeoramiento en el perfil lipoproteico aterogénico conforme empeora el grado de alteración del metabolismo de la glucosa, siendo mayor la diferencia observada entre sujetos con DM2 y con aquellos en situación de normoglucemia. En este sentido, es importante señalar el hecho de que no hemos logrado observar diferencias estadísticamente significativas al comparar el perfil lipoproteico de sujetos con prediabetes con el grupo con normoglucemia. Este hecho puede ser como consecuencia del menor grado de resistencia insulínica observado en los participantes con prediabetes de nuestro estudio, lo cual se desprende de los valores relativamente bajos de HOMA-IR que presentan estos sujetos. Este aspecto debe ser tenido en cuenta, ya que en estudios previos sí se han descrito distintas alteraciones en las lipoproteínas en sujetos con prediabetes, siendo éstas diferentes en función de la situación que prevalece en la prediabetes, predominando un aumento en las concentraciones de p-LDL en casos de intolerancia oral a la glucosa y de p-VLDL grandes en casos de glucemia basal alterada (96). En dicho trabajo, los autores planteaban la hipótesis de que estas diferencias podrían ser consecuencia de distintos mecanismos fisiopatológicos en los diferentes estados de tolerancia a la glucosa, y que ello podría estar en relación con el lugar donde predomina la resistencia insulínica: a nivel hepático o en el músculo esquelético.

7.2. ANÁLISIS DEL PERFIL LIPOPROTEICO AVANZADO EN EL GRUPO DE SUJETOS CON NORMOGLUCEMIA Y DIFERENCIAS EN FUNCIÓN DEL SEXO Y DE LA EDAD.

En el primer estudio realizado en esta tesis, hemos demostrado la existencia de diferencias en el perfil lipoproteico avanzado en función del sexo de cada individuo. En este sentido, el sexo femenino muestra una intensa asociación con un perfil lipoproteico avanzado más favorable en comparación con los varones, con una concentración inferior de partículas proaterogénicas totales (p-VLDL y p-LDL), y un aumento de las concentraciones totales de partículas antiaterogénicas (p-HDL). Más concretamente, se ha observado un aumento significativo de las LDL de menor tamaño en varones y de las HDL de mayor tamaño en mujeres. Estos resultados serían similares a los hallados en estudios previos llevados a cabo en poblaciones de otras áreas geográficas: Freedman et al también observaron un perfil más favorable en mujeres en comparación con varones, caracterizado por LDL y HDL de mayor tamaño, siendo estas diferencias entre sexos menos llamativas conforme aumentaba la edad de los sujetos (97).

Por otro lado, también se ha observado una tendencia a un incremento de varios parámetros relacionados con las LDL conforme aumenta la edad de los sujetos con normogluceemia, con unos cambios más pronunciados en el sexo femenino y de forma más llamativa entre el grupo de menor edad y el de edad intermedia. Estos resultados también estarían en concordancia con estudios previos (97). El hecho de que los cambios observados en sujetos de mayor edad sean más marcados en el sexo femenino también ha sido reportado en estudios previos. El Khoudary et al observaron una correlación negativa entre los niveles de estradiol y la concentración de LDL de menor tamaño y una correlación positiva con el tamaño de las HDL (98), hecho que podría en parte justificar la equiparación del riesgo cardiovascular observada en el sexo femenino con respecto al de los varones con la llegada de la menopausia.

7.3. VARIABLES ASOCIADAS CON EL PERFIL LIPOPROTEICO PROATEROGÉNICO EN POBLACIÓN CON NORMOGLUCEMIA.

Como previamente se ha señalado, nuestros resultados muestran un perfil lipoproteico más desfavorable en los varones normoglucémicos en comparación con las mujeres. Además, los índices de adiposidad relacionados con resistencia insulínica, como el IMC, el perímetro de cintura y el FLI, son factores importantes a tener en cuenta, puesto que presentan también una asociación con un perfil avanzado más proaterogénico, consistente en una correlación positiva con diferentes variables relacionadas con las VLDL y las LDL, en especial con las partículas de menor tamaño, que son reconocidamente más proaterogénicas (9). Este hecho estaría también en consonancia con los datos observados en otro estudio llevado a cabo también en sujetos con normoglucemia en el que también se demostró una asociación del IMC, incluso en situación de normopeso, con un perfil más proaterogénico (99). Otros estudios previos también han demostrado una relación entre el exceso de adiposidad central con un perfil lipoproteico más desfavorable, hecho más marcado en el sexo femenino (100). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo por Amor et al también se observó una relación entre la presencia de HGNA, definida según el valor de FLI, con un perfil lipoproteico más proaterogénico, especialmente a expensas de alteraciones en las VLDL y las HDL (51).

7.4. ASOCIACIÓN DEL BIOMARCADOR PROINFLAMATORIO GLYCA CON LA PRESENCIA DE DISFUNCIÓN CARDIACA EN SUJETOS CON DIABETES TIPO 1.

El espectro de GlycA representa las señales producidas por varias proteínas inflamatorias de fase aguda y captura un estado de inflamación sistémico modulado a nivel hepático (52). Entre las variables relacionadas con GlycA contamos con el área de GlycA y el cociente H/W. El área de GlycA representa la concentración de enlaces entre proteína-azúcar por lo que, a mayor área de GlycA, mayor grado de glicosilación

plasmática. Por otro lado, el cociente H/W representa cómo es la “forma” del pico de glicosilación. En este sentido, un mayor cociente (\uparrow H y \downarrow W) implica una mayor flexibilidad o libertad de los enlaces de glicosilación.

En el segundo estudio de esta tesis, hemos demostrado como ambas variables (área de GlycA y cociente H/W de GlycA) forman parte de las que mejor discriminan la presencia de disfunción miocárdica subclínica en una cohorte bien caracterizada de sujetos con DM1. Concretamente, como se puede ver en la primera variable latente (LV1) del análisis PLS-DA, el área de GlycA resulta ser la variable con una capacidad discriminatoria mayor a la hora de diferenciar aquellos sujetos con disfunción miocárdica subclínica de aquellos sin disfunción, por encima incluso de otros factores de riesgo tradicionales bien establecidos como son el IMC, el sexo, la hemoglobina glicosilada o la duración de la diabetes. Ello estaría en consonancia con estudios previos en población general y que incluían sujetos con DM2, en los que también se ha descrito una asociación entre concentraciones elevadas de GlycA con un mayor riesgo de desarrollar IC (87). Más recientemente, este biomarcador también se ha relacionado con la variable combinada de aumento de mortalidad por cualquier causa y de reingreso por IC en una población de sujetos con IC crónica de causa no isquémica (88). Sin embargo, hasta la fecha la presente tesis doctoral es la primera en evaluar el papel de GlycA en la disfunción miocárdica subclínica en sujetos con DM1.

Es de interés subrayar el hecho que, de acuerdo con nuestros resultados, la capacidad discriminatoria del modelo PLS-DA no mejora al incluir el NTproBNP, reconocido biomarcador diagnóstico de IC, como variable de entrada, manteniéndose GlycA como la mejor variable a la hora de discriminar la presencia de disfunción miocárdica. En una línea similar, GlycA también se mantiene como la variable que mejor discrimina la presencia de disfunción miocárdica en el caso de añadir en el modelo la tasa de excreción urinaria de albúmina de 24 horas. Este es un aspecto importante y que refuerza nuestros resultados, dado que, de acuerdo con los resultados del estudio

original del que proviene nuestra cohorte de sujetos con DM1, existía una asociación entre la albuminuria y la presencia de disfunción miocárdica subclínica (92).

Aunque los mecanismos subyacentes que explican la presencia de disfunción miocárdica aún no están del todo aclarados, existe cada vez más evidencia del papel de la inflamación sistémica dentro de la etiopatogenia de la MCD (72). Reforzando este hecho, nuestros resultados sugieren que las concentraciones de GlycA están relacionadas de forma independiente con la disfunción miocárdica subclínica en sujetos con DM1.

7.5. PAPEL DE LAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS CON LA PRESENCIA DE DISFUNCIÓN CARDIACA EN SUJETOS CON DIABETES TIPO 1.

El enfoque multivariante utilizado en el segundo estudio, mediante la metodología PLS-DA, ha ayudado a identificar algunas de las variables relacionadas con las lipoproteínas proaterogénicas ricas en triglicéridos (VLDL e IDL) que, junto con GlycA, discriminan también la presencia de disfunción miocárdica subclínica en sujetos con DM1. En la misma línea, también en sujetos con DM1, otros estudios han observado una asociación positiva entre las características avanzadas de las VLDL con el grado de rigidez arterial (46) o con la presencia de arterioesclerosis preclínica (35). Asimismo, también se ha descrito su asociación, en mujeres con DM1 e historia de preeclampsia previa, con la presencia de aterosclerosis carotídea (101). En el campo de la IC, recientemente se ha encontrado una asociación entre el colesterol remanente y el riesgo a largo plazo de desarrollar IC en individuos que habían sufrido previamente un síndrome coronario agudo (102). Sin embargo, la contribución de este tipo de lipoproteínas a la cardiomiopatía de origen no isquémico se encuentra aún poco estudiada, y la presente

tesis doctoral es la primera en relacionarlas con la presencia de disfunción miocárdica subclínica en sujetos con DM1.

Cabe destacar que, de acuerdo con el análisis PLS-DA, la duración de la diabetes contribuye a la hora de discriminar la presencia de disfunción miocárdica solo una vez se ha tenido también en cuenta el aspecto inflamatorio sistémico, como se muestra en la segunda variable latente (LV2) del análisis de clasificación multivariable. Esta segunda variable latente muestra también una pérdida de asociación entre los parámetros asociados con las TRL con la presencia de disfunción miocárdica. De este hecho se desprende que el poder discriminatorio de estas variables relacionadas con las TRL se diluye en ausencia de la inflamación sistémica (mediada por GlycA), revelando así una posible interacción entre GlycA y las TRL.

7.6. POTENCIALES LIMITACIONES DE LA TESIS.

Nuestros resultados deben interpretarse en el contexto de ciertas limitaciones, que se resumen a continuación:

En primer lugar, en el grupo de sujetos con prediabetes incluidos en el primer estudio, no se puede diferenciar entre aquellos que presentan glucemia basal alterada de los que presentan intolerancia oral a la glucosa dado que no se les realizó una prueba de sobrecarga oral de glucosa. Otra limitación que debe tenerse en cuenta es que los sujetos con DM2 fueron reclutados principalmente en consultas ambulatorias, y es posible que ello implique un sesgo de selección al favorecer la inclusión de pacientes con un mejor estado de salud y menos complicaciones que la población general con DM2.

Por otro lado, en el segundo estudio de esta tesis, se apareó por edad, sexo y grado de control metabólico (Hba1c) a los sujetos con disfunción miocárdica subclínica con aquellos sin disfunción. Este hecho puede resultar en un sesgo de comparación, ya que,

según los resultados originales del estudio original *Thousand & 1*, los pacientes con disfunción miocárdica presentaban una mayor edad y duración de la diabetes que los sujetos con una función normal (92). Por lo tanto, al seleccionar sujetos similares según estos criterios, al menos un grupo puede no ser del todo representativo con respecto a la población de la cual proviene. Por otro lado, el escaso número de sujetos con disfunción sistólica incluido conlleva que los resultados obtenidos deban extrapolarse principalmente a la disfunción diastólica, que es la forma más frecuente en el grupo con disfunción miocárdica.

8. CONCLUSIONES

A continuación, se presentan las principales conclusiones de la presente tesis doctoral:

1. En los sujetos con normoglucesmia, sin tratamiento hipolipemiente y sin ECV clínica:

- Existe un incremento en el conjunto de parámetros lipídicos asociados a aterogenicidad, analizados en el test avanzado de lipoproteínas, que se asocia de forma directa con la edad. Este hecho es especialmente marcado cuando se compara el grupo de sujetos jóvenes con el de mediana edad.
- En el subgrupo de sujetos que presentan un perfil lipídico convencional que podría considerarse dentro de la normalidad, el análisis del perfil lipoproteico avanzado permite detectar a aquellos sujetos que presentan un perfil lipoproteico alterado, el cual se ha descrito asociado a un mayor riesgo de ECV aterogénica.
- Los índices de adiposidad corporal (IMC) y de adiposidad visceral (perímetro de cintura, FLI) se asocian con un perfil lipoproteico proaterogénico.

2. Existe un incremento gradual en los parámetros lipoproteicos aterogénicos que ocurre de forma paralela al grado de deterioro del metabolismo glucémico.

3. Los sujetos con DM2 presentan un incremento de las concentraciones séricas de parámetros lipoproteicos aterogénicos, más allá de los parámetros lipídicos convencionales, que podrían contribuir a explicar en parte el riesgo incrementado de ECV de estos sujetos.

4. En sujetos con DM1 y sin enfermedad cardiovascular clínica conocida, la inflamación sistémica (mediada GlycA) y las TRL (VLDL e IDL) son los parámetros más fuertemente asociados a la presencia de disfunción miocárdica subclínica. Los resultados obtenidos orientan a un papel fundamental de este tipo de lipoproteínas y de la inflamación sistémica en la patogenia de la disfunción miocárdica subclínica en sujetos con DM1.

9. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Los resultados obtenidos en los trabajos que forman parte de esta tesis dan pie a un amplio abanico de posibles trabajos de investigación futuros. A continuación, se destacan algunas de estas futuras líneas:

1. Evaluar el efecto de diferentes tratamientos hipolipemiantes sobre el perfil lipoproteico avanzado de los sujetos con diabetes, y conocer cómo ello podría traducirse en una reducción del número de eventos cardiovasculares.
2. Analizar cómo la reversión de la diabetes hacia la normoglucemia puede traducirse también en cambios en el perfil lipoproteico avanzado, tornándose éste en un perfil menos desfavorable tras la remisión de la diabetes.
3. Reconsiderar los criterios de elegibilidad para el uso de tratamiento con estatinas en función de la concentración de partículas lipoproteicas, más allá del perfil lipídico convencional, evaluando si dicha estrategia puede conllevar a una reducción de eventos.
4. Evaluar si las concentraciones de GlycA pueden suponer un valor pronóstico en la MCD, valorando su relación con diferentes resultados relevantes para la persona: mortalidad cardiovascular, ingreso hospitalario por IC, y consultas a urgencias, entre otros.
5. Por último, si bien cada vez hay más evidencia científica del papel de la inflamación sistémica en la patogénesis de la IC en general, y más concretamente de la MCD, se necesitan más estudios para determinar si alguna estrategia terapéutica que reduzca la inflamación sistémica pueda tener un efecto beneficioso sobre la evolución de estas patologías.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017 Aug 21;38(32):2459-2472.
2. Silverman MG, Ference BA, Im K, Wiviott SD, Giugliano RP, Grundy SM, et al. Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2016 Sep 27;316(12):1289-97.
3. Fulcher J, O'Connell R, Voysey M, Emberson J, Blackwell L, Mihaylova B, et al. Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: Meta-analysis of individual data from 174 000 participants in 27 randomised trials. *Lancet*. 2015 Apr 11;385(9976):1397-405.
4. Masana L. The Zero-LDL Hypothesis. Towards Extremely Low LDL Concentrations. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2018 Jul;71(7):591-592.
5. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 Jun;18(6):499-502.
6. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005 Oct 8;366(9493):1267-78.
7. Ferrari R, Aguiar C, Alegria E, Bonadonna RC, Cosentino F, Elisaf M, et al. Current

- practice in identifying and treating cardiovascular risk, with a focus on residual risk associated with atherogenic dyslipidaemia. *Eur Heart J Suppl.* 2016 Apr 12;18(Suppl C):C2-C12.
8. Singh A, Collins BL, Gupta A, Fatima A, Qamar A, Biery D, et al. Cardiovascular Risk and Statin Eligibility of Young Adults After an MI: Partners YOUNG-MI Registry. *J Am Coll Cardiol.* 2018 Jan 23;71(3):292-302.
 9. Hernández-Mijares A, Ascaso JF, Blasco M, Brea A, Díaz A, Mantilla T, et al. Residual cardiovascular risk of lipid origin. Components and pathophysiological aspects. *Clin Investig Arterioscler.* 2019 Mar-Apr;31(2):75-88.
 10. Hoogeveen RC, Ballantyne CM. Residual Cardiovascular Risk at Low LDL: Remnants, Lipoprotein(a), and Inflammation. *Clin Chem.* 2021 Jan 8;67(1):143-153.
 11. Nordestgaard BG. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: New Insights From Epidemiology, Genetics, and Biology. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):547-63.
 12. Duran EK, Aday AW, Cook NR, Buring JE, Ridker PM, Pradhan AD. Triglyceride-Rich Lipoprotein Cholesterol, Small Dense LDL Cholesterol, and Incident Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2020 May 5;75(17):2122-2135.
 13. Batt KV, Patel L, Botham KM, Suckling KE. Chylomicron remnants and oxidised low density lipoprotein have differential effects on the expression of mRNA for genes involved in human macrophage foam cell formation. *J Mol Med (Berl).* 2004 Jul;82(7):449-58.
 14. Sniderman AD, Thanassoulis G, Glavinovic T, Navar AM, Pencina M, Catapano A, et al. Apolipoprotein B Particles and Cardiovascular Disease: A Narrative Review. *JAMA Cardiol.* 2019 Dec 1;4(12):1287-1295.
 15. Huh JH, Han K, Cho YK, Roh E, Kang JG, Lee SJ, et al. Remnant cholesterol and

- the risk of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a nationwide longitudinal cohort study. *Cardiovasc Diabetol*. 2022 Nov 2;21(1):228.
16. Castañer O, Pintó X, Subirana I, Amor AJ, Ros E, Hernáez Á, et al. Remnant Cholesterol, Not LDL Cholesterol, Is Associated With Incident Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Dec 8;76(23):2712-2724.
 17. Johannesen CDL, Mortensen MB, Langsted A, Nordestgaard BG. Apolipoprotein B and Non-HDL Cholesterol Better Reflect Residual Risk Than LDL Cholesterol in Statin-Treated Patients. *J Am Coll Cardiol*. 2021 Mar 23;77(11):1439-1450.
 18. SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J*. 2021 Jul 1;42(25):2439-2454.
 19. Valensi P, Avignon A, Sultan A, Chanu B, Nguyen MT, Cosson E. Atherogenic dyslipidemia and risk of silent coronary artery disease in asymptomatic patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:104.
 20. Vergès B. Abnormal hepatic apolipoprotein B metabolism in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2010 Aug;211(2):353-60.
 21. Coppack SW, Evans RD, Fisher RM, Frayn KN, Gibbons GF, Humphreys SM, et al. Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal. *Metabolism*. 1992 Mar;41(3):264-72.
 22. Adiels M, Boren J, Caslake MJ, Stewart P, Soro A, Westerbacka J, et al. Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Aug;25(8):1697-703.
 23. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*. 2003 Jun;46(6):733-49.
 24. Wang X, Bucala R, Milne R. Epitopes close to the apolipoprotein B low density lipoprotein receptor-binding site are modified by advanced glycation end products.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:7643-7.
25. Curtiss LK, Witztum JL. Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CI, and E are glycosylated in hyperglycemic diabetic subjects. *Diabetes*. 1985 May;34(5):452-61.
 26. Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, Soran H, Durrington PN. Glycation of LDL in non-diabetic people: Small dense LDL is preferentially glycated both in vivo and in vitro. *Atherosclerosis*. 2009;202:162-8.
 27. Sánchez-Quesada JL, Pérez A. Modified lipoproteins as biomarkers of cardiovascular risk in diabetes mellitus. *Endocrinol Nutr*. 2013 Nov;60(9):518-28.
 28. Chait A, Wight TN. Interaction of native and modified low-density lipoproteins with extracellular matrix. *Curr Opin Lipidol*. 2000 Oct;11(5):457-63.
 29. Lamarche B, Rashid S, Lewis GF. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. *Clin Chem Acta*. 1999 Aug;286(1-2):145-61.
 30. Kontush A, Chapman MJ. Why is HDL functionally deficient in type 2 diabetes? *Curr Diab Rep*. 2008 Feb;8(1):51-9.
 31. Mallol R, Rodriguez MA, Brezmes J, Masana LL, Correig X. Human serum/plasma lipoprotein analysis by NMR: application to the study of diabetic dyslipidemia. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2013 Apr;70:1-24.
 32. Boren J, Williams KJ. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr Opin Lipidol*. 2016 Oct;27(5):473-83.
 33. Mora S. Advanced lipoprotein testing and subfractionation are not (yet) ready for routine clinical use. *Circulation*. 2009 May 5;119(17):2396-404.
 34. 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-Apr;5(2):105-13.

35. Serés-Noriega T, Ortega E, Giménez M, Perea V, Boswell L, Mariaca K, et al. Advanced lipoprotein profile identifies atherosclerosis better than conventional lipids in type 1 diabetes at high cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2023 Apr 5;S0939-4753(23)00144-8.
36. Lawler PR, Akinkuolie AO, Chu AY, Shah SH, Kraus WE, Craig D, et al. Atherogenic Lipoprotein Determinants of Cardiovascular Disease and Residual Risk Among Individuals With Low Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *J Am Heart Assoc.* 2017 Jul 21;6(7):e005549.
37. Degoricija V, Klobučar I, Potočnjak I, Terešak SD, Vidović L, Pregartner G, et al. Cholesterol Content of Very-Low-Density Lipoproteins Is Associated with 1-Year Mortality in Acute Heart Failure Patients. *Biomolecules.* 2022 Oct 21;12(10):1542.
38. Vroegindewey MM, Van den Berg VJ, Oemrawsingh RM, Kardys I, Asselbergs FW, Van der Harst P, et al. High-frequency metabolite profiling and the incidence of recurrent cardiac events in patients with post-acute coronary syndrome. *Biomarkers.* 2020 May;25(3):235-240.
39. Johnson CS. Diffusion Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Principles and Applications. *Prog Nucl Mag Res. Sp.* 1999;34:203-56.
40. 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 ¹H NMR spectroscopy. *J Lipid Res.* 2015 Mar;56(3):737-746.
41. Bothwell JHF, Griffin JL. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2011 May; 86(2):493-510.
42. 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.

43. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clin Chem*. 1992 Sep;38(9):1632-8.
44. Pintó X, Masana L, Civeira F, Real J, Ibarretxe D, Candas B, et al. Consensus document of an expert group from the Spanish Society of Arteriosclerosis (SEA) on the clinical use of nuclear magnetic resonance to assess lipoprotein metabolism (Liposcale®). *Clin Investig Arterioscler*. 2020 Sep-Oct;32(5):219-229.
45. Teis A, Castelblanco E, Cediel G, Amigó N, Julve J, Ribalta J, et al. 1H-magnetic resonance spectroscopy lipoprotein profile in patients with chronic heart failure versus matched controls. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2021 Oct 26;S1885-5857(21)00285-1.
46. Llauradó G, Amigó N, Fuertes-Martín R, Romero A, Cano A, Albert L, et al. Measurement of Serum N-Glycans in the Assessment of Early Vascular Aging (Arterial Stiffness) in Adults With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2022 Oct 1;45(10):2430-2438.
47. Julve J, Rossell J, Correig E, Rojo-Lopez MI, Amigó N, Hernández M, et al. Predictive Value of the Advanced Lipoprotein Profile and Glycated Proteins on Diabetic Retinopathy. *Nutrients*. 2022 Sep 22;14(19):3932.
48. Insenser M, Moncayo S, Martínez-García MA, Fernández-Durán E, Samino S, Álvarez-Blasco F, et al. 2D Diffusion-Ordered 1 H-NMR Spectroscopy Lipidomic Profiling after Oral Single Macronutrient Loads: Influence of Obesity, Sex, and Female Androgen Excess. *Mol Nutr Food Res*. 2020 May;64(9):e1900928.
49. Pichler G, Amigo N, Tellez-Plaza N, Pardo-Cea MA, Dominguez-Lucas A, Marrachelli VG, et al. LDL particle size and composition and incident cardiovascular disease in a South-European population: The Hortega-Liposcale

- Follow-up Study. *Int J Cardiol.* 2018 Aug 1;264:172-178.
50. Girona J, Amigó N, Ibarretxe N, Plana N, Rodríguez-Borjabad C, Heras M, et al. HDL Triglycerides: A New Marker of Metabolic and Cardiovascular Risk. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 27;20(13):3151.
51. Amor AJ, Pinyol M, Solà E, Catalan M, Cofán M, Herreras Z, et al. Relationship between noninvasive scores of nonalcoholic fatty liver disease and nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities: A focus on atherogenic dyslipidemia. *J Clin Lipidol.* 2017 Mar-Apr;11(2):551-561.e7.
52. Mehta NN, Dey AK, Maddineni R, Kraus WE, Huffman KM. GlycA measured by NMR spectroscopy is associated with disease activity and cardiovascular disease risk in chronic inflammatory diseases. *Am J Prev Cardiol.* 2020;4:100120.
53. Otvos JD, Shalurova I, Wolak-Dinsmore J, Connelly MA, Mackey RH, Stein JH, et al. GlycA: A Composite Nuclear Magnetic Resonance Biomarker of Systemic Inflammation. *Clin Chem.* 2015 May;61(5):714-23.
54. Fuertes-Martín R, Correig X, Vallvé JC, Amigó N. Title: Human Serum/Plasma Glycoprotein Analysis by ¹H-NMR, an Emerging Method of Inflammatory Assessment. *J Clin Med.* 2020 Jan 27;9(2):354.
55. Fuertes-Martín R, Correig X, Vallvé JC, Amigó N. Characterization of ¹H NMR Plasma Glycoproteins as a New Strategy To Identify Inflammatory Patterns in Rheumatoid Arthritis. *J Proteome Res.* 2018 Nov 2;17(11):3730-3739.
56. Connelly MA, Otvos JD, Shalurova I, Playford MP, Mehta NN. GlycA, a novel biomarker of systemic inflammation and cardiovascular disease risk. *J Transl Med.* 2017;15:219.
57. Moncayo S, Insenser M, Martínez-García MA, Fuertes-Martín R, Amigó-Grau N, Álvarez-Blasco F, et al. Acute-phase glycoprotein profile responses to different oral macronutrient challenges: Influence of sex, functional hyperandrogenism and

- obesity. *Clin Nutr.* 2021;40(3):1241-1246.
58. Bourgonje AR, Van der Vaart A, Gruppen EG, Van Goor H, Bakker SJL, Connelly MA, et al. Plasma levels of GlycA, a pro-inflammatory glycoprotein biomarker, associate with an increased risk of microvascular complications in patients with type 2 diabetes (Zodiac-62). *Endocrine.* 2023 Feb 9.
59. Amigó N, Fuertes-Martín R, Malo AI, Plana N, Ibarretxe D, Girona J, et al. Glycoprotein Profile Measured by a 1H-Nuclear Magnetic Resonance Based on Approach in Patients with Diabetes: A New Robust Method to Assess Inflammation. *Life (Basel).* 2021 Dec 16;11(12):1407.
60. Akinkuolie AO, Buring JE, Ridker PM, Mora S. A novel protein glycan biomarker and future cardiovascular disease events. *J Am Heart Assoc.* 2014 Sep 23;3(5):e001221.
61. Duprez DA, Otvos J, Sanchez OA, Mackey RH, Tracy R, Jacobs DR. Comparison of the Predictive Value of GlycA and Other Biomarkers of Inflammation for Total Death, Incident Cardiovascular Events, Noncardiovascular and Noncancer Inflammatory-Related Events, and Total Cancer Events. *Clin Chem.* 2016 Jul;62(7):1020-31.
62. Nichols GA, Hillier TA, Erbey JR, Brown JB. Congestive heart failure in type 2 diabetes: prevalence, incidence, and risk factors. *Diabetes Care.* 2001;24:1614–9.
63. From AM, Leibson CL, Bursi F, Redfield MM, Weston SA, Jacobsen SJ, et al. Diabetes in heart failure: prevalence and impact on outcome in the population.. *Am J Med.* 2006;119:591–9.
64. McHugh K, DeVore AD, Wu J, Matsouaka RA, Fonarow GC, Heidenreich PA, et al. Heart failure with preserved ejection fraction and diabetes: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(5):602–11.

65. Federmann M, Hess OM. Differentiation between systolic and diastolic dysfunction. *Eur Heart J*. 1994 Dec;15 Suppl D:2-6.
66. Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 2014;57(4):660–71.
67. Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD (FALTA PARTE TÍTULO). *Eur Heart J*. 2013;34(39):3035–87.
68. Dandamudi S, Slusser J, Mahoney DW, Redfield MM, Rodeheffer RJ, Chen HH. The prevalence of diabetic cardiomyopathy: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *J Card Fail*. 2014 May;20(5):304-9.
69. Gøtzsche O, Darwish A, Gøtzsche L, Hansen LP, Sørensen KE. Incipient cardiomyopathy in young insulin-dependent diabetic patients: a seven-year prospective Doppler echocardiographic study. *Diabet Med*. 1996;13(9):834–40.
70. Rosengren A, Vestberg D, Svensson AM, Kosiborod M, Clements M, Rawshani A, et al. Long-term excess risk of heart failure in people with type 1 diabetes: a prospective case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015 Nov;3(11):876-85.
71. Westermeier F, Riquelme JA, Pavez M, Garrido V, Díaz A, Verdejo HE, et al. New Molecular Insights of Insulin in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Physiol*. 2016 Apr 12;7:125.
72. Riehle C, Bauersachs J. Of mice and men: models and mechanisms of diabetic cardiomyopathy.. *Basic Res Cardiol*. 2018;114(1):2.
73. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol*. 2016 Mar;12(3):144-53.
74. Battiprolu PK, Gillette TG, Wang ZV, Lavandero S, Hill JA. Diabetic Cardiomyopathy: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Drug Discov Today Dis*

- Mech. 2010;7(2):e135-e143.
75. Evangelista I, Nuti R, Picchioni T, Dotta F, Palazzuoli A. Molecular Dysfunction and Phenotypic Derangement in Diabetic Cardiomyopathy. *J Mol Sci.* 2019;20(13):3264.
 76. Borghetti G, von Lewinski D, Eaton DM, Sourij H, Houser SR, Wallner M. Diabetic Cardiomyopathy: Current and Future Therapies. *Beyond Glycemic Control. Front Physiol.* 2018;9:1514.
 77. Tan Y, Zhang Z, Zheng C, Wintergerst KA, Keller BB, Cai L. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17:585–607.
 78. Spillmann F, Linthout SV, Tschöpe C. Cardiac effects of HDL and its components on diabetic cardiomyopathy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2012;12(2):132–47.
 79. Herrero P, Peterson LR, McGill JB, Matthew S, Lesniak D, Dence C, et al. Increased myocardial fatty acid metabolism in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(3):598–604.
 80. Wang J, Song Y, Wang Q, Kralik PM, Epstein PN. Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. *Rev Diabet Stud.* 2006 Fall;3(3):108-17.
 81. Adameova A, Dhalla NS. Role of microangiopathy in diabetic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev.* 2014 Jan;19(1):25-33.
 82. Widyantoro B, Emoto N, Nakayama K, Anggrahini DW, Adiarto S, Iwasa N et al. Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition. *Circulation.* 2010 Jun 8;121(22):2407-18.
 83. Ceradini DJ, Yao D, Grogan RH, Callaghan MJ, Edelstein D, Brownlee M and Gurtner GC. Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-

- induced new vessel formation in diabetic mice. *J Biol Chem.* 2008 Apr 18;283(16):10930-8.
84. Ritchie RH, Zerenturk EJ, Prakoso D, Calkin AC. Lipid metabolism and its implications for type 1 diabetes-associated cardiomyopathy. *J Mol Endocrinol.* 2017;58(4):R225–40.
85. Xu X, Luo Z, He Y, Shan J, Guo J, Li J. Application of untargeted lipidomics based on UHPLC-high resolution tandem MS analysis to profile the lipid metabolic disturbances in the heart of diabetic cardiomyopathy mice. *J Pharm Biomed Anal.* 2020 Oct 25;190:113525.
86. Shirazi LF, Bissett J, Romeo F, Mehta JL. Role of Inflammation in Heart Failure. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19(6):27.
87. 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: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Heart Fail.* 2020 Aug;13(8):e007067.
88. Cediël G, Teis T, Codina C, Julve J, Domingo M, Santiago-Vacas E, et al. GlycA and GlycB as Inflammatory Markers in Chronic Heart Failure. *Am J Cardiol.* 2022 Oct 15;181:79-86.
89. Perman JC, Boström P, Lindbom M, Lidberg U, StÅhlman M, Hägg D, et al. The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2625–40.
90. Lee HC, Lin YH. The Pathogenic Role of Very Low Density Lipoprotein on Atrial Remodeling in the Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):891.
91. ADA. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. In *Standards of Medical Care in Diabetes-2016.* *Diabetes Care.* 2016;39:S13-S22.

92. Jensen MT, Sogaard P, Andersen HU, Bech J, Hansen TF, Galatius S, et al. Prevalence of systolic and diastolic dysfunction in patients with type 1 diabetes without known heart disease: the Thousand & one Study. *Diabetologia*. 2014;57(4):672–80.
93. Balling M, Afzal S, Varbo A, Langsted A, Smith GD, Nordestgaard BG. VLDL Cholesterol Accounts for One-Half of the Risk of Myocardial Infarction Associated With apoB-Containing Lipoproteins. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Dec 8;76(23):2725-2735.
94. Johansen M Ø, Vedel-Krogh S, Nielsen SF, Afzal S, Smith GD, Nordestgaard BG. Per-Particle Triglyceride-Rich Lipoproteins Imply Higher Myocardial Infarction Risk Than Low-Density Lipoproteins: Copenhagen General Population Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 Jun;41(6):2063-2075.
95. Prats-Urbe A, Sayols-Baixeras S, Fernández-Sanlés A, Subirana I, Carreras-Torres R, Vilahur G, et al. High-density lipoprotein characteristics and coronary artery disease: a Mendelian randomization study. *Metabolism*. 2020 Nov; 112:154351.
96. Lorenzo C, Hartnett S, Hanley AJ, Rewers MJ, Wagenknecht LE, Karter AJ, et al. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance have distinct lipoprotein and apolipoprotein changes: the insulin resistance atherosclerosis study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Apr;98(4):1622-30.
97. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Shalurova I, Cupples LA, Parise H, et al. Sex and age differences in lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: the Framingham Study. *Clin Chem*. 2004;7:1189–1200.
98. El Khoudary SR, Brooks MM, Thurston RC, Matthews KA. Lipoprotein subclasses and endogenous sex hormones in women at midlife. *J Lipid Res*. 2014 Jul;55(7):1498-504.
99. Guardiola M, Solà R, Vallvé JC, Girona J, Godàs G, Heras M, et al. Body mass

- index correlates with atherogenic lipoprotein profile even in nonobese, normoglycemic, and normolipidemic healthy men. *J Clin Lipidol.* 2015;9:824–831.
100. Bell JA, Richardson TG, Wang Q, Sanderson E, Palmer T, Walker W, et al. Effects of general and central adiposity on circulating lipoprotein, lipid, and metabolite levels in UK Biobank: A multivariable Mendelian randomization study. *Lancet Reg Health Eur.* 2022 Jul 6;21:100457.
101. Amor AJ, Vinagre I, Valverde M, Urquizu X, Meler E, López E, et al. Nuclear magnetic resonance lipoproteins are associated with carotid atherosclerosis in type 1 diabetes and pre-eclampsia. *Diabetes Metab Res Rev.* 2021;37(1):e3362.
102. Cordero A, Alvarez-Alvarez B, Escribano D, García-Acuña JM, Cid-Alvarez B, Rodríguez-Mañero M, et al. Remnant cholesterol in patients admitted for acute coronary syndromes. *Eur J Prev Cardiol.* 2023 Mar 1;30(4):340-348.

11. ANEXOS

11.1. MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL PRIMER ARTÍCULO.

Disponible en el acceso web: <http://dx.doi.org/10.1016/j.recesp.2021.02.013>

Table 1 of the supplementary data. Reference values of lipid profile in normoglycemic healthy control subjects separated by sex.

	Men n 177		Women n 241		P value*
Variable	Median [25th-75th]	Mean ± standard deviation	Median [25th-75th]	Mean ± standard deviation	
Total cholesterol, mg/dL	190 [170-217]	192 ± 36.4	187 [164-215]	190 ± 33.8	.518
HDL-C, mg/dL	52.0 [44.9-61.0]	54.5 ± 14.9	63.0 [53.0-72.0]	63.4 ± 15.3	<.001
LDL-C, mg/dL	118 [96.2-135]	118 ± 29.5	108 [88.0-129]	110 ± 28.2	.010
Triglycerides, mg/dL	89.5 [68.8-131]	114 ± 114	76.0 [56.0-98.0]	82.5 ± 37.4	.001
VLDL particles, nmol/L	39.1 [27.5-60.5]	49.5 ± 42.2	30.8 [23.9-43.0]	36.2 ± 18.9	<.001
Large, nmol/L	1.00 [0.75-1.44]	1.21 ± 0.92	0.84 [0.64-1.06]	0.92 ± 0.41	<.001
Medium, nmol/L	4.07 [2.70-5.95]	5.26 ± 7.65	3.22 [2.39-4.80]	3.73 ± 1.98	.010
Small, nmol/L	33.7 [23.5-52.9]	43.0 ± 34.6	26.6 [20.6-37.4]	31.5 ± 17.0	<.001
VLDL-Z, nm	42.1 [42.0-42.3]	42.1 ± 0.23	42.2 [42.0-42.3]	42.2 ± 0.21	.143
Cholesterol content, mg/dL	9.85 [5.39-16.8]	12.4 ± 11.7	7.30 [4.21-11.2]	8.82 ± 6.13	<.001
Triglyceride content, mg/dL	57.0 [40.0-84.6]	71.8 ± 68.5	44.9 [35.2-60.6]	52.0 ± 26.0	<.001

LDL particles, nmol/L	1319 [1140-1504]	1340 ± 279	1256 [1078-1441]	1264 ± 259	.005
Large, nmol/L	181 [160-212]	185 ± 37.2	189 [162-209]	188 ± 33.7	.466
Medium, nmol/L	391 [302-493]	411 ± 144	411 [332-508]	423 ± 128	.393
Small, nmol/L	735 [634-828]	744 ± 141	638 [560-733]	653 ± 128	<.001
LDL-Z, nm	20.9 [20.8-21.1]	20.9 ± 0.28	21.1 [21.0-21.3]	21.1 ± 0.22	<.001
Cholesterol content, mg/dL	129 [111-149]	130 ± 28.2	124 [107-143]	126 ± 26.0	.092
Triglyceride content, mg/dL	15.5 [11.8-19.0]	15.9 ± 5.09	15.7 [12.6-19.1]	16.1 ± 4.75	.684
HDL particles, μmol/L	26.5 [23.3-29.6]	27.1 ± 5.50	30.8 [27.0-34.5]	31.2 ± 6.19	<.001
Large, μmol/L	0.25 [0.22-0.28]	0.26 ± 0.05	0.28 [0.24-0.31]	0.28 ± 0.05	<.001
Medium, μmol/L	8.16 [7.23-9.46]	8.53 ± 2.11	10.1 [8.90-11.5]	10.5 ± 2.27	<.001
Small, μmol/L	18.1 [15.6-20.3]	18.4 ± 4.01	20.2 [17.5-23.3]	20.5 ± 4.45	<.001
HDL-Z, nm	8.21 [8.17-8.25]	8.21 ± 0.06	8.23 [8.20-8.28]	8.24 ± 0.06	<.001
Cholesterol content, mg/dL	51.0 [44.6-59.1]	52.4 ± 11.7	60.0 [52.6-69.7]	61.6 ± 13.1	<.001
Triglyceride content, mg/dL	11.2 [9.31-13.4]	12.0 ± 4.95	13.6 [11.4-16.5]	14.4 ± 4.72	<.001
Non-HDL particles	1333 [1162-1537]	1362 ± 284	1260 [1077-1443]	1268 ± 265	.001
Total particles/HDL particles	51.5 [43.4-60.6]	52.7 ± 13.4	41.2 [33.7-51.0]	43.1 ± 11.9	<.001

LDL particles/HDL particles	49.3 [42.0-58.4]	50.8 ± 12.9	40.3 [32.9-49.9]	41.9 ± 11.4	<.001
------------------------------------	------------------	-------------	------------------	-------------	-------

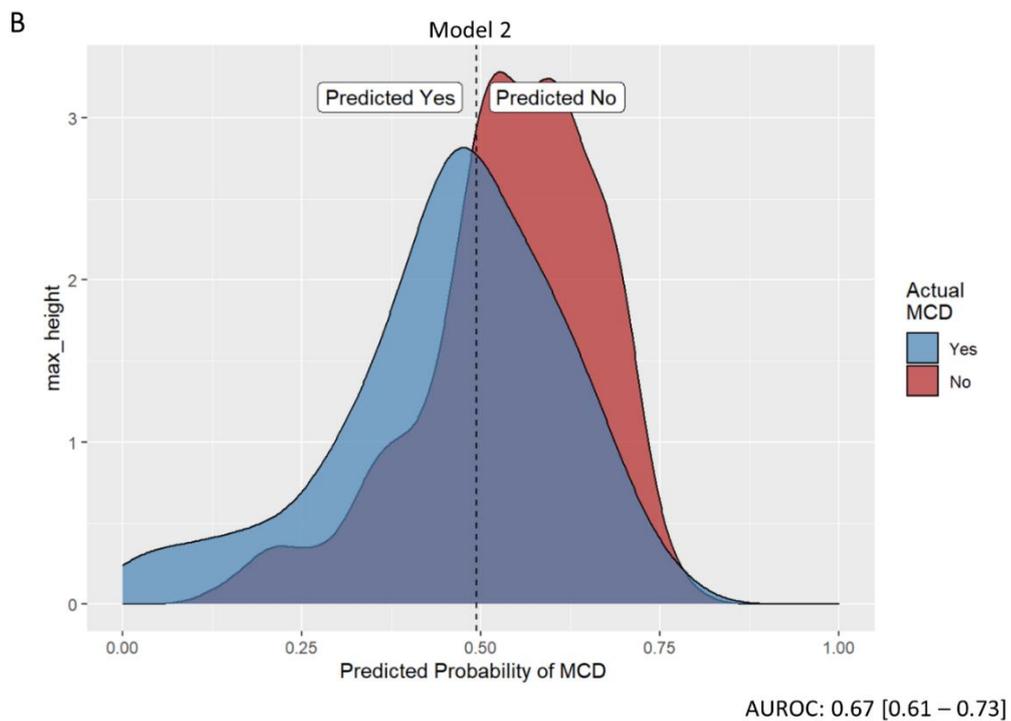
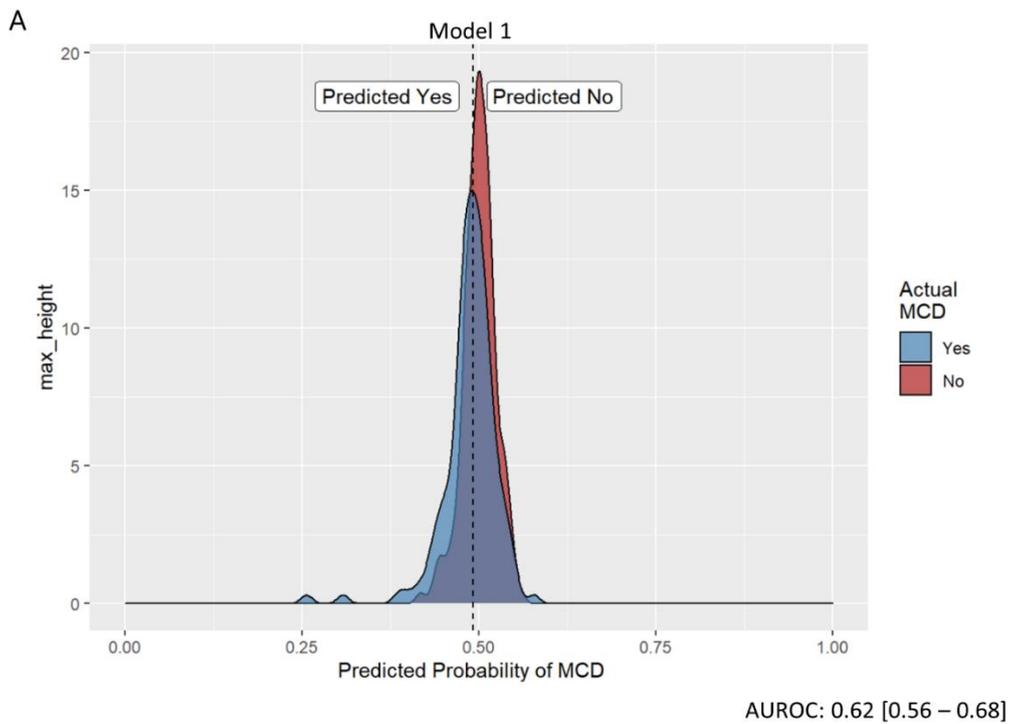
**P* value for mean

11.2. MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL SEGUNDO ARTÍCULO.

Disponible en el acceso web:

<https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-022-01652-z>

Descarga directa con el enlace: <https://ndownloader.figstatic.com/files/38343265>



Supplementary Fig. 1 Comparison of the distribution of the predicted probabilities showing the classification performance of the presence of MCD between two different models, being the x-axis the predicted probabilities for both classes and the y-axis the count of observations. **A:** Model 1 includes classical risk variables (age, sex, eGFR, NTproBNP, BMI, diabetes duration and systolic blood pressure >140mmHg). **B:** Model 2 includes classical risk variables and the NMR-assessed biomarkers. The inclusion of NMR parameters significantly increased the AUROC from 0.62 [0.56 – 0.68] to 0.67 [0.61 – 0.73], with a NRI considering NMR-assessed parameters of 21%. MCD: myocardial dysfunction, BMI: body mass index, NMR: nuclear magnetic resonance, AUROC: area under the ROC curve, NRI: net reclassification improvement.

