

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Identificación de un perfil de riesgo cardiovascular en  
población joven y evaluación del mismo a lo largo de la edad**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Paula Julia Martínez González**

**Directora**

**Gloria Álvarez Llamas**

**Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**IDENTIFICACIÓN DE UN PERFIL DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN  
POBLACIÓN JOVEN Y EVALUACIÓN DEL MISMO A LO LARGO DE LA EDAD**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Paula Julia Martínez González

DIRECTORA

Gloria Álvarez Llamas







**A mi abuelo Julián**



# Agradecimientos

---



Me gustaría expresar en estas líneas mi agradecimiento a todas las personas que de un modo u otro han hecho posible esta Tesis Doctoral.

En primer lugar y de manera especial quería agradecerse a Gloria. Mi directora, jefa y a veces también amiga, a quien admiro profundamente por su empeño, esfuerzo y responsabilidad. Gracias por acogerme y hacerme hueco entre tus becarias. Gracias por estar ahí para corregirme en mis errores y ayudarme a crecer profesionalmente. Por confiar en mí y apoyarme para emprender un proyecto nuevo, que ojalá nos lleve a algún logro en el futuro. Por reclamar a aquellos *referees* cuando yo no podía hacerlo y demostrarme que merece la pena luchar por aquello en lo que crees. Gracias por todo lo compartido estos años.

Por supuesto, también agradezco al Instituto de Salud Carlos III y al Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz que hayan financiado esta Tesis Doctoral.

A Fernando, mi primer director y tutor, por haberme hecho formar parte de tu laboratorio. Por entrar cada día con una sonrisa y recordarnos que “lo primero, es lo primero” y que los puentes están para cogérselos. Por dejarnos disfrutar de ti en las comidas del laboratorio. Gracias y que disfrutes de tu merecida jubilación.

A Juanma, mi tutor, por tus sabios comentarios y tu buena disposición para todo aquello en lo que te he necesitado. Al personal del CAI, en especial a Lola, por haberme tratado con tanto cariño durante el tiempo que estuve allí de estancia.

A Maru, Laura, Tamara y Tatiana, por haberme hecho sentir como en casa durante mi estancia en Toledo. Y especialmente a Montse, por todo lo vivido juntas profesional y personalmente, que espero que dure muchos años más.

A Felipe de Farmacia, por nuestras largas *frikicharlas* en las que mis inquietudes por preguntar no agotaban nunca tus ganas de enseñar, ni siquiera en días festivos.

A todos los que han pasado por el laboratorio durante estos años. A Julia y Pilar por haber sido mi familia en el hospital desde el primer momento. A Aroa, por enseñarme los protocolos con alegría y dejarme esa frase de Confucio que tanto me gusta. A Marta por enseñarme a manejar “*el masas*” y ayudarme siempre que tenía problemas. A Van por haberme hecho sentir tan bien transmitiéndome tu alegría y serenidad siempre que lo he necesitado. A Carlos por tus bromas y por demostrarme que no hace falta estresarse para conseguir las cosas. A Emilio por tu sentido del humor y por las charlas en el metro de vuelta a casa. A Arancha por el tiempo en que fuimos compañeras y amigas, siendo mi apoyo en el día a día y también durante los viajes y congresos. A Alma por tus buenas palabras y apoyo siempre que me han hecho falta. A Sergio por traer tu espíritu juvenil y divertido al labo. Y cómo no, a Martita, mi “hija adoptiva”, por haberme ayudado con los *experis* complejos haciendo que las largas horas de trabajo pareciesen ocio, por la alegría que has traído mi vida y a la de mi familia, muchas gracias y espero que nos queden muchos grandes momentos por compartir.

A la gente de todos los laboratorios de la cuarta, a Amelia, a los chicos del almacén, a Jose de extracciones y al personal del banco de sangre, por haber hecho de la FJD un sitio agradable en el que trabajar.

A mis amigos Ana, Ángela, Inés, Elena y Manolo, por haber sido incondicionales y haber creído siempre en mí. Especialmente a ti Elena, por ser mi mejor amiga, mi persona y mi compañera de vida. Muchas gracias a todos, estoy deseando celebrarlo con vosotros.

A Alex, mi mejor amigo y compañero de ciencia desde los inicios. Por todas aquellas horas en las que me tuviste rotulando tubos de citometría mientras me enseñabas hasta dónde puede llegar uno con ambición, convicción y trabajo, y lo tarde que puedes salir del laboratorio cuando eres incapaz de calcular lo que se tarda en hacer cada cosa.

A mis padres, que me enseñaron a no rendirse y creer que todo es posible en esta vida.

A todos mis tíos, más bien mis hermanos, por haber llenado mi vida de historias, de alegrías y de primos. En especial a mis tías Paula y Lolisa, y mis tíos Jose y Jose Luis, por haberme aguantado en la adolescencia y no perder la paciencia consiguiendo que no me desviase del camino correcto. Gracias, siempre estaré en deuda con vosotros.

A mis primas de Madrid, Antoñita y Francis, y a sus maridos, Pedro y Esteban, por haberme acompañado a las entrevistas para las becas predoctorales y haberme hecho sentir en Madrid como en casa desde el principio.

A mis abuelos, Eugenio y Julián, por haber sido mis padres durante muchos años y enseñarme el valor del trabajo bien hecho. A mis abuelas, Adelina y Loli, por haber sido mis madres durante muchos años, mostrándome cómo es una vida dedicada a dar cariño a los que te rodean sin esperar nada a cambio. A los cuatro, por haberme puesto una sonrisa en la cara durante tantos años sin haber perdido jamás la vuestra. Ojalá fueseis eternos. Os quiero.

A mis niños, ya no tan niños, María, Saulete, Blanquita y Tomasillo. Gracias a cada uno de vosotros por todo lo que me habéis dado estos años. Gracias por llenar nuestra casa de vida, de alegría, de Beret, de rock, de rap y de himnos. Porque pese a que sois diferentes, cada uno de vosotros tiene una parte que me encanta. Gracias también a Blanca y a Tomás por haberme aguantado y apoyado durante los momentos difíciles de los dos últimos años. Os quiero.

Por último, y aunque no hay palabras suficientes, quería agradecerse a Saúl, el amor de mi vida. Gracias por todo. Por llegar justo cuando empezaba a perder la esperanza de encontrar a mi príncipe azul (aunque jamás hubiese imaginado que traería a cuatro principitos con él). Por quererme tanto y demostrármelo cada día. Por apoyarme en todo, sin reservas y de corazón. Por estar siempre pendiente de ayudar a quien lo necesite y repartir alegría allá donde vas. Por tu paciencia, comprensión y cariño durante esta última etapa. Simplemente, gracias por existir.

A todos, gracias de corazón.

# Resumen

---



## IDENTIFICACIÓN DE UN PERFIL DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN POBLACIÓN JOVEN Y EVALUACIÓN DEL MISMO A LO LARGO DE LA EDAD

La enfermedad cardiovascular (CV) es la primera causa de muerte en el mundo pese a los avances en materia de prevención. La principal causa subyacente es la aterosclerosis: una enfermedad crónica, sistémica e inflamatoria, que afecta a arterias de mediano y gran calibre. El proceso aterosclerótico cursa durante décadas de manera asintomática y silente, pudiendo resultar en un evento CV repentino con consecuencias potencialmente fatales. En los últimos años se han desarrollado varios estimadores de riesgo cardiovascular (RCV), la mayoría de ellos a corto-medio plazo (5-10 años), basados principalmente en edad, sexo, niveles de colesterol, hipertensión y tabaquismo. Sin embargo, estos estimadores tienen limitaciones ya que la mayoría de los pacientes con bajo RCV estimado a corto plazo muestran por el contrario un alto riesgo cuando se calcula a largo lo largo de la vida (*Lifetime Risk*, LTR). Por otro lado, ya que el impacto de los factores de riesgo tradicionales cambia con la edad, el uso de los estimadores actualmente disponibles en todos los grupos de edad puede ser inapropiado, particularmente considerando que éstos se desarrollan generalmente en sujetos de mediana edad. En el caso de la población joven, el RCV está particularmente subestimado al ser la edad uno de los factores que más contribuyen en estos algoritmos. Como resultado, pocos jóvenes alcanzan los umbrales establecidos para iniciar una acción terapéutica y, en consecuencia, las estrategias de prevención eficaz se retrasan. Esta limitación choca con el hecho de que el proceso aterosclerótico comienza temprano en la vida, y, por tanto, una prevención óptima debería comenzar en población joven, donde existen evidencias de aterosclerosis subclínica. En el lado opuesto, se encuentra la población de edad avanzada quien debido al riesgo achacado a su edad corre el riesgo de sobremedicación. Encontrar nuevos biomarcadores moleculares fácilmente cuantificables y capaces de estratificar el RCV de una forma más precisa de la que lo hacen actualmente los estimadores tradicionales, posibilitaría la puesta en marcha de terapias personalizadas mucho más efectivas, especialmente en población joven.

En esta Tesis Doctoral se llevó cabo un estudio multiómico (proteómico y metabolómico) en orina con el objetivo principal de identificar biomarcadores de RCV en población joven (30-50 años) y, de forma adicional, evaluarlos a lo largo de la vida, analizándolos para ello en poblaciones de mediana edad (50-70 años) y de edad avanzada (>70 años). Para el estudio se reclutaron un total de 234 sujetos y cada cohorte se dividió en tres grupos atendiendo al RCV: grupo control, grupo de riesgo y grupo con sujetos

recuperados de un evento CV, utilizando para esta clasificación los criterios clínicos apropiados según su edad.

Las aproximaciones ómicas permitieron la identificación de variaciones significativas en la abundancia de proteínas (espectrometría de masas con marcaje isobárico TMT<sup>TM</sup>) y metabolitos (resonancia magnética nuclear) sin preselección de dianas moleculares. La confirmación de las alteraciones identificadas se abordó mediante espectrometría de masas en modo dirigido (SRM-LC-MS/MS con y sin marcaje isotópico) y ELISA. De forma complementaria se llevó a cabo un análisis de biología de sistemas utilizando un algoritmo capaz de identificar procesos funcionales alterados como resultado de la suma de pequeñas alteraciones en varias de las proteínas que la componen sin necesidad de que éstas estén alteradas significativamente a nivel individual.

Los resultados obtenidos muestran cómo el proteoma y el metaboloma de la orina reflejan alteraciones moleculares específicas moduladas por el RCV y/o daño acumulado antes de sufrir un evento, los cuales pueden revertir tras él (como consecuencia del tratamiento y de la adquisición de hábitos saludables), mantenerse (riesgo residual o daño establecido) o continuar aumentando progresivamente desde el inicio de la aterosclerosis. Cabe destacar igualmente un perfil de RCV diferencial entre hombres y mujeres. Por otro lado, pese a que en algunos casos las alteraciones se mantienen con la edad, la mayoría de las moléculas identificadas ven alterada su abundancia en orina de forma diferente, sobre todo al comparar las poblaciones de mediana y avanzada edad con los más jóvenes. En este sentido, se identificaron diferentes huellas metabólicas de RCV según la edad: una específica de población joven, una compartida por mediana y avanzada edad, una de avanzada edad y una huella común a las tres cohortes de edad compuesta por TMAO y glucuronato. Dado que el TMAO es un metabolito proaterogénico que refleja RCV a cualquier edad y genera un vínculo mecanicista entre dieta, microbiota y aterosclerosis, en esta Tesis se propone como principal candidato para incorporar a los estimadores de RCV actuales, posibilitando así una estratificación más precisa.

Como principales biomarcadores moleculares que reflejan el RCV de forma específica en población joven se proponen 6 proteínas (ADX, ECP, FETUB, GDF15, GUAD y NOTCH1) y 6 metabolitos (2-hidroxitirato, GABA, guanidoacetato, hipoxantina, oxaloacetato y serina), entre los que destacan moléculas del metabolismo de las purinas precursoras del ácido úrico, intermediarios de la síntesis de glutatión y moléculas involucradas en contrarrestar el estrés oxidativo o la disfunción endotelial.

Particularmente, la combinación de las proteínas ECP, GDF15 y GUAD muestra un alto valor diagnóstico para separar a individuos jóvenes con RCV de controles sin riesgo. Por otro lado, las moléculas GUAD e hipoxantina podrían ser útiles para detectar y tratar una alteración subclínica del metabolismo de las purinas, impidiendo el aumento del estrés oxidativo, los niveles de ácido úrico y sus complicaciones asociadas.

El perfil molecular identificado en esta Tesis Doctoral se correlaciona con el LTR y podría utilizarse como modificador del RCV estimado en jóvenes aparentemente sanos incorporándose al protocolo para el manejo de la prevención de la ECV en dicha población.



# Summary

---



## IDENTIFICATION OF A CARDIOVASCULAR RISK PROFILE IN YOUNG POPULATION AND ITS EVALUATION THROUGHOUT LIFE

Cardiovascular disease is the leading cause of death worldwide despite improvements in outcomes. The predominant underlying pathology is atherosclerosis, a chronic and systemic immunoinflammatory disease of medium and large sized arteries. Formation of an atheroma plaque and progressive arterial obstruction takes place silently and asymptotically, which in many cases results in a sudden event with potentially fatal consequences. Different algorithms are available to estimate cardiovascular risk (CVR) in apparently healthy persons in the short-medium term (5-10 years), mainly based on age, gender, race, cholesterol levels, blood pressure and smoking habits. However, estimations in the short-medium term have limitations since the majority of patients with low CVR over the next 10 years show high risk at long-term if the estimation is calculated along their likely remaining lifetime (*Lifetime Risk*, LTR). The impact of traditional risk factors on cardiovascular events changes with age, and thus the application of currently available estimators to all age groups may be inappropriate, particularly when considering that they are mainly developed in middle-aged subjects. Moreover, as age is one of the most contributing factors in these algorithms, CVR is particularly underestimated in young population. As result, few young individuals reach treatment thresholds for intervention and, consequently, efficient prevention strategies are delayed. This limitation collides with the fact that the atherosclerotic process begins early in life and so optimum prevention strategies should start in young population. On the opposite side, the elderly population runs the risk of overmedication due to the weight of age in the algorithms.

In this Doctoral Thesis, a multi-omic study (proteomic and metabolomic) was carried out in urine with the main objective of identifying CVR biomarkers in the young population (30-50 years) and, additionally, evaluating them throughout life. For that purpose we analyze them also in middle-aged (50-70 years) and elderly (>70 years) populations. A total of 234 subjects were recruited for the study and each cohort was divided into three groups according to CVR: control group, risk group and group with subjects recovered from a CV event, using the appropriate clinical criteria according to their age for such classification.

Omic approaches allowed the identification of significant variations in the abundance of proteins (by TMT™ isobaric labeling mass spectrometry) and metabolites (by nuclear magnetic resonance) without preselection of molecular targets. The confirmation of the

identified alterations was approached by targeted mass spectrometry (SRM-LC-MS/MS with and without isotopic labeling) and ELISA. In a complementary way, a system biology analysis was carried out using an algorithm able to detect alterations in functional categories caused by the sum of small alterations in several proteins, being these proteins significantly altered or not individually.

The results obtained show how the urine proteome and metabolome reflect specific molecular alterations modulated by CVR and/or accumulated damage before suffering an event, which can be reversed (as a consequence of treatment and the acquisition of healthy habits), maintained (residual risk or established damage) or continue to increase progressively from the onset of atherosclerosis. It is also worth highlighting a differential CVR profile between men and women. On the other hand, despite the fact that in some cases the alterations are maintained with age, most of the molecules identified show altered abundance in urine differently between age cohorts, especially when comparing middle-aged and elderly populations with the younger. In this sense, different metabolic fingerprints of CVR were identified according to age: one specific to the young population, one shared by middle age and elderly, one specific of the elderly and a common fingerprint for the three age cohorts composed of TMAO and glucuronate. Since TMAO is a proatherogenic metabolite that reflects CVR at any age and generates a mechanistic link between diet, microbiota and atherosclerosis, in this Doctoral Thesis it is proposed as the main candidate to be incorporated into current CVR estimators, thus allowing a more precise stratification.

As main molecular biomarkers that specifically reflect CVR in the young population, 6 proteins (ADX, ECP, FETUB, GDF15, GUAD and NOTCH1) and 6 metabolites (2-hydroxybutyrate, GABA, guanidoacetate, hypoxanthine, oxaloacetate and serine) are proposed. Among them, molecules of the metabolism of purine precursors of uric acid, intermediates of glutathione synthesis and molecules involved in counteracting oxidative stress or endothelial dysfunction stand out. In particular, the combination of ECP, GDF15 and GUAD proteins shows a high diagnostic value to separate young individuals with CVR from controls without risk. Additionally, GUAD and hypoxanthine could be useful for detecting and treating a subclinical alteration of purine metabolism, so preventing an increase in oxidative stress, uric acid levels and their associated complications.

The molecular profile here identified correlates with the LTR and could be used as a modifier of the estimated CVR in apparently healthy young people, incorporating it into the protocol for the management of CVD prevention in this population.

# Abreviaturas

---



|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>2-DE</b>           | Electroforesis bidimensional  |
| <b>2D-RMN</b>         | Resonancia magnética nuclear bidimensional                                |
| <b>ACN</b>            | Acetonitrilo  |
| <b>ADX</b>            | Adrenodoxina  |
| <b>AMBIC</b>          | Bicarbonato amónico (del inglés, <i>ammonium bicarbonate</i> )            |
| <b>ANX10</b>          | Anexina A10   |
| <b>APOA2</b>          | Apolipoproteína A2  |
| <b>ATRN</b>           | Atractina   |
| <b>AUC</b>            | Área bajo la curva (del inglés, <i>Area Under Curve</i> )                 |
| <b>B3AT</b>           | Intercambiador aniónico de banda 3  |
| <b>bFGF</b>           | Factor de crecimiento de fibroblastos básico                              |
| <b>BHMT1</b>          | Betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1                                 |
| <b>BHMT2</b>          | Betaína-homocisteína S-metiltransferasa 2                                 |
| <b>CAP7</b>           | Azurocidina   |
| <b>CHCA</b>           | Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico                                   |
| <b>CK-MB</b>          | Creatina quinasa MB   |
| <b>Col/HDL</b>        | Relación colesterol total/colesterol HDL                                  |
| <b>COSY</b>           | Correlación homonuclear $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$                       |
| <b>CTL2</b>           | Proteína 2 similar al transportador de colina                             |
| <b>CV</b>             | Cardiovascular  |
| <b>d.e.</b>           | Desviación estándar   |
| <b>d<sub>2</sub>O</b> | Óxido de deuterio   |
| <b>DM</b>             | Diabetes mellitus   |
| <b>DTT</b>            | Ditiotreitol  |
| <b>ECP</b>            | Proteína catiónica del eosinófilo   |
| <b>ECV</b>            | Enfermedad cardiovascular   |
| <b>eNO</b>            | Óxido nítrico endotelial  |
| <b>eNOS</b>           | Óxido nítrico sintasa endotelial  |
| <b>ESI</b>            | Ionización por electrospray (del inglés, <i>Electrospray Ionization</i> ) |
| <b>FDR</b>            | Tasa de falsos positivos  |
| <b>FETUB</b>          | Fetuina B   |
| <b>FGE</b>            | Filtrado glomerular estimado  |
| <b>FID</b>            | <i>Free induction decay</i>   |
| <b>FMO</b>            | Monooxigenasas que contienen flavina hepáticas                            |
| <b>GABA</b>           | Ácido gamma-aminobutírico   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>GBD</b>      | <i>Global Burden of Disease</i>  |
| <b>GC</b>       | Cromatografía de gases (del inglés, <i>Gas Chromatography</i> )  |
| <b>GDF15</b>    | Factor de diferenciación del crecimiento 15  |
| <b>GUAD</b>     | Guanidino desaminasa   |
| <b>HDL</b>      | Lipoproteína de alta densidad  |
| <b>HLA-A</b>    | Cadena alfa del antígeno de histocompatibilidad  |
| <b>HMDB</b>     | <i>Human metabolome database</i>   |
| <b>HTAR</b>     | Hipertensión arterial resistente   |
| <b>HSQC</b>     | Correlación heteronuclear $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$   |
| <b>IAA</b>      | Iodoacetamida  |
| <b>IAM</b>      | Infarto agudo de miocardio   |
| <b>IBP7</b>     | Proteína de unión del factor semejante a la insulina 7   |
| <b>ICAM-1</b>   | Molécula de adhesión intracelular 1  |
| <b>IL-1</b>     | Interleuquina 1  |
| <b>IPSP</b>     | Inhibidor plasmático de la serín proteasa  |
| <b>IS</b>       | Estándar interno, del inglés, <i>internal standard</i>   |
| <b>KPCA</b>     | Proteína kinasa A  |
| <b>LC-MS/MS</b> | Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (del inglés, <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> ) |
| <b>LDL</b>      | Lipoproteínas de baja densidad   |
| <b>LDLox</b>    | LDL oxidado  |
| <b>LTR</b>      | Riesgo estimado a lo largo de la vida (del inglés, <i>Lifetime Risk</i> )  |
| <b>M&amp;M</b>  | Material y métodos   |
| <b>MALDI</b>    | Ionización láser asistida por matriz (del inglés, <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> )                           |
| <b>MASP2</b>    | Lectina serín proteasa de unión a manano 2   |
| <b>MCCV</b>     | Validación cruzada de Monte Carlo  |
| <b>MCP-1</b>    | Proteína quimiotáctica de monocitos 1  |
| <b>M-CSF</b>    | Factor estimulante de macrófagos   |
| <b>MS</b>       | Espectrometría de masas (del inglés, <i>Mass Spectrometry</i> )  |
| <b>NO</b>       | Óxido nítrico  |
| <b>NOTCH1</b>   | Proteína homóloga al locus neurogénico notch 1   |
| <b>OMS</b>      | Organización Mundial de la Salud   |
| <b>PAS</b>      | Presión arterial sistólica   |
| <b>PCA</b>      | Análisis de componentes principales  |
| <b>PCYOX</b>    | Prenilcisteína oxidasa 1   |
| <b>PDGF</b>     | Factor de crecimiento derivado de las plaquetas  |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>PDL3</b>                    | Fosfolipasa D3  |
| <b>PEPA</b>                    | Pepsinógeno A   |
| <b>PEPC</b>                    | Pepsinógeno C   |
| <b>PLS1</b>                    | Fosfolípido escramblasa 1   |
| <b>PLS-DA</b>                  | Análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante   |
| <b>PODXL</b>                   | Podocalixina  |
| <b>PPBI</b>                    | Fosfatasa alcalina intestinal   |
| <b>PRDX3</b>                   | Tiorredoxina mitocondrial   |
| <b>QQQ</b>                     | Triple cuadrupolo   |
| <b>RCV</b>                     | Riesgo cardiovascular   |
| <b>RD</b>                      | Tiempo de relajación (del inglés, <i>Relaxation delay</i> )   |
| <b>RMN</b>                     | Resonancia magnética nuclear  |
| <b>ROS</b>                     | Especies reactivas del oxígeno  |
| <b>SBT</b>                     | Sistema de biología triangular  |
| <b>sCR</b>                     | Creatinina sérica   |
| <b>SDCBP2</b>                  | Sintetina 2   |
| <b>SDS-PAGE</b>                | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ) |
| <b>SM</b>                      | Síndrome metabólico   |
| <b>SRM</b>                     | Monitorización de reacciones seleccionadas (del inglés, <i>Selected reaction monitoring</i> )   |
| <b>TEAB</b>                    | Tampón bicarbonato de trietilamonio   |
| <b>TFA</b>                     | Ácido trifluoroacético  |
| <b>TICN2</b>                   | Testican  |
| <b>TMA</b>                     | Trimetilamina   |
| <b>TMT</b>                     | Etiqueta de masa en tándem (del inglés, <i>Tandem mass tag</i> )  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Factor de necrosis tumoral  |
| <b>TOCSY</b>                   | Correlación homonuclear total $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$   |
| <b>TOF</b>                     | Tiempo de vuelo (del inglés, <i>Time Of Flight</i> )  |
| <b>TPP1</b>                    | Tripeptidil peptidasa 1   |
| <b>TRFL</b>                    | Lactoferrina  |
| <b>TSP</b>                     | 3-trimetilsilil [2,2,3,3-2H] propionato sódico  |
| <b>u.a.</b>                    | Unidades arbitrarias  |
| <b>VCAM-1</b>                  | Molécula de adhesión de la célula vascular  |



# Índice

---



|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b>   | <b>13</b> |
| <b>SUMMARY</b>   | <b>19</b> |
| <b>ABREVIATURAS</b>  | <b>23</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | <b>35</b> |
| <b>1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR</b>  | <b>37</b> |
| <b>1.1. DESARROLLO Y PREVALENCIA</b>   | <b>37</b> |
| <b>1.2. ATROSCLOSIS: Causa principal de las enfermedades cardiovasculares</b>  | <b>39</b> |
| <b>2. ESTIMACIÓN DEL RIESGO CARDIOVASCULAR</b>   | <b>45</b> |
| <b>2.1. SISTEMAS DE EVALUACIÓN A CORTO-MEDIO PLAZO</b>   | <b>45</b> |
| <b>2.2. RIESGO CARDIOVASCULAR ESTIMADO A LO LARGO DE LA VIDA: <i>Lifetime Risk</i></b>   | <b>47</b> |
| <b>2.3. POBLACIÓN JOVEN: PRIORIDAD ENTRE OTROS GRUPOS RELEVANTES DE ESTUDIO</b>  | <b>47</b> |
| <b>2.4. NUEVOS AVANCES EN LOS SISTEMAS DE CÁLCULO: <i>¿El principio de un cambio?</i></b>  | <b>49</b> |
| <b>3. MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA PRÁCTICA CLÍNICA</b>   | <b>51</b> |
| <b>4. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES MEDIANTE ESTRATEGIAS ÓMICAS: <i>Aproximaciones Generales</i></b>   | <b>52</b> |
| <b>4.1. APROXIMACIÓN PROTEÓMICA</b>  | <b>54</b> |
| <b>4.2. APROXIMACIÓN METABOLÓMICA</b>  | <b>57</b> |
| <b>4.3. FASES DEL PROCESO DE IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES</b>   | <b>60</b> |
| <b>5. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR: <i>Revisión actual</i></b>  | <b>61</b> |
| <b>6. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN POBLACIÓN JOVEN</b>  | <b>64</b> |
| <b>HIPÓTESIS</b>   | <b>65</b> |
| <b>OBJETIVOS</b>   | <b>69</b> |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>  | <b>73</b> |
| <b>1. SELECCIÓN DE PACIENTES</b>   | <b>75</b> |
| <b>2. RECOGIDA DE MUESTRAS</b>   | <b>76</b> |
| <b>3. ESTRATEGIA MULTIÓMICA DISEÑADA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO ORGÁNICO ESTABLECIDO EN POBLACIÓN JOVEN Y SU EVALUACIÓN A LO LARGO DE LA EDAD</b> | <b>77</b> |
| <b>4. APROXIMACIÓN PROTEÓMICA</b>  | <b>78</b> |
| <b>4.1. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES PROTEICAS ASOCIADAS A RIESGO CARDIOVASCULAR EN POBLACIÓN JOVEN MEDIANTE ANÁLISIS CUANTITATIVO DIFERENCIAL CON MARCAJE TMT™</b>                                      | <b>79</b> |
| 4.1.1. Preparación de las muestras y digestión proteica  |           |
| 4.1.2. Marcaje isobárico mediante TMT™   |           |
| 4.1.3. Identificación y análisis mediante LC-MS/MS   |           |
| <b>4.2. SELECCIÓN DE PROTEÍNAS CANDIDATAS A BIOMARCADOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR O DE DAÑO EN POBLACIÓN JOVEN</b>  | <b>83</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.3. IDENTIFICACIÓN DE CATEGORÍAS FUNCIONALES ALTERADAS POR RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO EN POBLACIÓN JOVEN MEDIANTE ANÁLISIS DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS</b>   | 84        |
| <b>4.4. IDENTIFICACIÓN DE DIFERENCIAS ENTRE EL PROTEOMA DE HOMBRES Y MUJERES DE POBLACIÓN JOVEN Y SU RESPUESTA AL RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO</b>   | 84        |
| <b>4.5. CONFIRMACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DIRIGIDA DE UN PANEL DE PROTEÍNAS SELECCIONADAS COMO CANDIDATAS A MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN POBLACIÓN JOVEN</b>  | 85        |
| 4.5.1. Análisis mediante SRM-LC-MS/MS  |           |
| 4.5.1.1. Preparación de las muestras y digestión proteica  |           |
| 4.5.1.2. Digestión <i>in silico</i> y sintonización  |           |
| 4.5.1.3. Análisis dirigido por SRM-LC-MS/MS  |           |
| 4.5.1.4. Análisis estadístico  |           |
| 4.5.2. Análisis mediante ELISA   |           |
| <b>4.6. CONFIRMACIÓN MEDIANTE CUANTIFICACIÓN DIRIGIDA DE UN SEGUNDO PANEL DE PROTEÍNAS SELECCIONADAS COMO CANDIDATAS A BIOMARCADOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO EN POBLACIÓN JOVEN Y EVALUACIÓN DE LAS MISMAS A LO LARGO DE LA EDAD</b> | 89        |
| 4.6.1. Preparación de las muestras y digestión proteica en gel   |           |
| 4.6.2. Digestión <i>in silico</i> y sintonización  |           |
| 4.6.3. Adición de péptidos sintéticos con marcaje isotópico  |           |
| 4.6.4. Análisis dirigido por SRM-LC-MS/MS  |           |
| 4.6.5. Análisis estadístico  |           |
| <b>5. APROXIMACIÓN METABOLÓMICA</b>  | <b>93</b> |
| <b>5.1. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES ASOCIADAS A RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO EN EL PERFIL METABÓLICO DE LA ORINA EN POBLACIÓN JOVEN MEDIANTE ANÁLISIS CUANTITATIVO DIFERENCIAL POR RMN</b>  | 94        |
| 5.1.1. Preparación de muestras y adquisición de espectros de <sup>1</sup> H RMN  |           |
| 5.1.2. Análisis estadístico de los datos de <sup>1</sup> H RMN   |           |
| 5.1.3. Identificación de metabolitos mediante RMN bidimensional  |           |
| <b>5.2. SELECCIÓN DE METABOLITOS PREVIAMENTE ASOCIADOS A RIESGO CARDIOVASCULAR PARA SU EVALUACIÓN A LO LARGO DE LA EDAD</b>  | 97        |
| <b>5.3. CONFIRMACIÓN MEDIANTE CUANTIFICACIÓN DIRIGIDA DE LOS METABOLITOS SELECCIONADOS COMO CANDIDATOS A MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO EN POBLACIÓN JOVEN Y EVALUACIÓN DE LOS MISMOS A LO LARGO DE LA EDAD</b>                | 97        |
| 5.3.1. Preparación de las muestras   |           |
| 5.3.2. Sintonización de las condiciones óptimas de análisis de los metabolitos seleccionados   |           |
| 5.3.3. Análisis por SRM-LC/MS-MS   |           |
| 5.3.4. Análisis estadístico  |           |

|   |            |
|---|------------|
| <b>RESULTADOS I</b>   | <b>101</b> |
| <b>EL PROTEOMA DE LA ORINA REFLEJA RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO ORGÁNICO CON ALTERACIONES QUE VARÍAN A LO LARGO DE LA EDAD</b>                                |            |
| <b>1. EXISTE UN SUBPROTEOMA EN ORINA DE POBLACIÓN JOVEN QUE VARÍA CON EL RIESGO CARDIOVASCULAR Y EL DAÑO ORGÁNICO ESTABLECIDO TRAS SUFRIR UN EVENTO AGUDO</b> | <b>105</b> |
| <b>2. CATEGORÍAS FUNCIONALES ALTERADAS EN POBLACIÓN JOVEN EN FUNCIÓN DEL RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO</b>   | <b>110</b> |
| 2.1. CATEGORÍAS FUNCIONALES CON ALTERACIONES ASOCIADAS A RIESGO CARDIOVASCULAR QUE REVIERTEN TRAS SUFRIR UN EVENTO AGUDO                                      | 111        |
| 2.2. CATEGORÍAS FUNCIONALES CON ALTERACIONES ASOCIADAS A RIESGO CARDIOVASCULAR QUE CONTINÚAN PROGRESANDO TRAS SUFRIR UN EVENTO AGUDO                          | 112        |
| 2.3. CATEGORÍAS FUNCIONALES ALTERADAS TRAS SUFRIR UN EVENTO AGUDO   | 112        |
| <b>3. SEIS BIOMARCADORES PROTEICOS EN ORINA REFLEJAN SIGNIFICATIVAMENTE EL RIESGO CARDIOVASCULAR EN POBLACIÓN JOVEN</b>                                       | <b>114</b> |
| 3.1. LOS VALORES DE LOS 6 BIOMARCADORES SE CORRELACIONAN CON EL RIESGO ESTIMADO A LO LARGO DE LA VIDA   | 117        |
| 3.2. UN PANEL DE 3 PROTEÍNAS MUESTRA EL MEJOR VALOR DIAGNÓSTICO   | 118        |
| <b>4. EL REFLEJO DEL RIESGO CARDIOVASCULAR Y EL DAÑO ORGÁNICO EN EL PROTEOMA DE LA ORINA VARÍA A LO LARGO DE LA EDAD</b>                                      | <b>122</b> |
| <b>5. EL PROTEOMA DE LA ORINA MUESTRA DIFERENCIAS ENTRE HOMBRES Y MUJERES EN SU RESPUESTA AL RIESGO CARDIOVASCULAR</b>  | <b>129</b> |
| <br>  |            |
| <b>RESULTADOS II</b>  | <b>133</b> |
| <b>EL METABOLOMA DE LA ORINA REFLEJA RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO ORGÁNICO CON ALTERACIONES QUE VARÍAN A LO LARGO DE LA EDAD</b>                              |            |
| <b>1. ALTERACIONES DEL PERFIL METABÓLICO EN LA ORINA DE POBLACIÓN JOVEN ASOCIADAS A RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO ORGÁNICO ESTABLECIDO</b>                     | <b>137</b> |
| <b>2. EL PERFIL METABÓLICO DEL RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA ORINA VARÍA A LO LARGO DE LA EDAD</b>  | <b>141</b> |
| 2.1. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR ESPECÍFICA DE POBLACIÓN JOVEN   | 142        |
| 2.1.1. Evaluación del poder diagnóstico de los metabolitos biomarcadores de riesgo cardiovascular en población joven  |            |
| 2.1.2. Los valores de 5 de los biomarcadores se correlacionan con el riesgo estimado a lo largo de la vida  |            |
| 2.2. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR COMÚN ENTRE LAS POBLACIONES DE MEDIANA Y AVANZADA EDAD  | 146        |
| 2.3. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN EDAD AVANZADA  | 149        |
| 2.4. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR MANTENIDA A LO LARGO DE LA VIDA   | 150        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>DISCUSIÓN</b>   | <b>153</b> |
| <b>1. LOS BIOMARCADORES PROTEICOS DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO IDENTIFICADOS EN POBLACIÓN JOVEN APOYAN UNA INTERVENCIÓN TEMPRANA</b>  | <b>156</b> |
| <b>2. EVALUACIÓN DE LOS BIOMARCADORES PROTEICOS DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO DE POBLACIÓN JOVEN A LO LARGO DE LA EDAD</b>   | <b>164</b> |
| <b>3. PATRÓN MOLECULAR DIFERENCIAL ENTRE HOMBRES Y MUJERES</b>   | <b>166</b> |
| <b>4. EL PERFIL METABÓLICO DEL RIESGO CARDIOVASCULAR DIFIERE CON LA EDAD</b>   | <b>170</b> |
| <b>4.1. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR ESPECÍFICA DE POBLACIÓN JOVEN</b>   | <b>170</b> |
| <b>4.2. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR MANTENIDA A LO LARGO DE LA EDAD</b>   | <b>173</b> |
| <b>4.3. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR COMÚN ENTRE LAS POBLACIONES DE MEDIANA Y AVANZADA EDAD</b>  | <b>174</b> |
| <b>4.4. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN EDAD AVANZADA</b>  | <b>175</b> |
| <b>5. INTEGRACIÓN MULTIÓMICA DE LOS BIOMARCADORES MOLECULARES DE RIESGO CARDIOVASULAR Y/O DAÑO HALLADOS EN POBLACIÓN JOVEN</b>   | <b>177</b> |
| <b>6. PERFIL MOLECULAR DE RIESGO CARDIOVASCULAR ASOCIADO AL RIESGO ESTIMADO A LO LARGO DE LA VIDA: POSIBLE HERRAMIENTA DE ESTRATIFICACIÓN PARA LA TOMA DE DECISIONES EN POBLACIÓN JOVEN APARENTEMENTE SANA</b> | <b>180</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>  | <b>185</b> |
| <b>LIMITACIONES</b>  | <b>189</b> |
| <b>PERSPECTIVAS DE FUTURO</b>  | <b>193</b> |
| <b>ANEXOS</b>  | <b>197</b> |
| <b>Anexo I. ESTUDIO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL RESISTENTE</b>   | <b>199</b> |
| <b>Anexo II. MATERIAL SUPLEMENTARIO</b>  | <b>207</b> |
| <b>Anexo III. PUBLICACIONES PERTENECIENTES A ESTA TESIS DOCTORAL</b>   | <b>211</b> |
| <b>Anexo IV. CV DE LA DOCTORANDA DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS</b>   | <b>249</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>  | <b>257</b> |

# Introducción

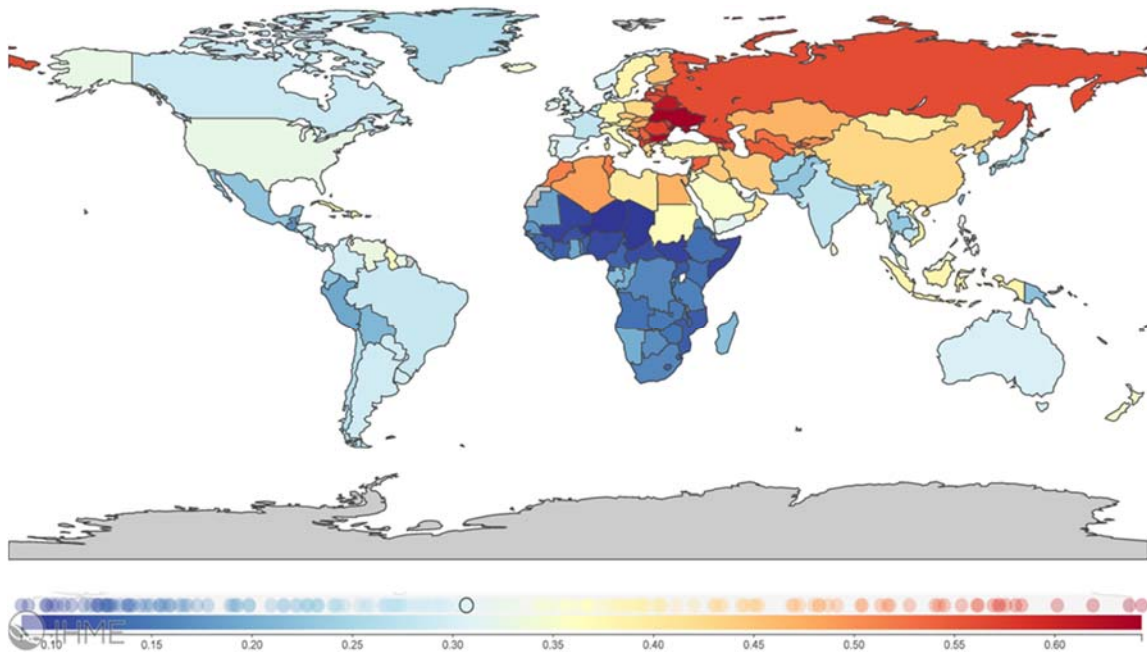
---



## 1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

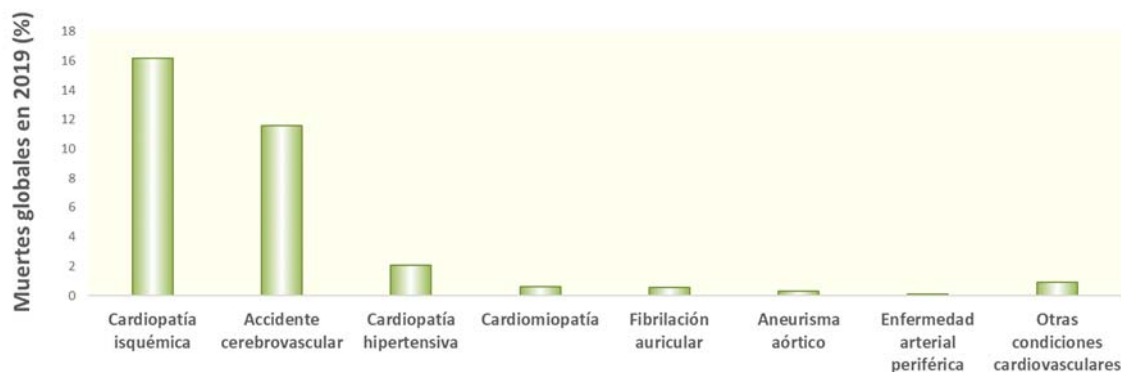
### 1.1. DESARROLLO Y PREVALENCIA

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son, desde hace 20 años, la principal causa de morbilidad y mortalidad en los países más desarrollados y presentan una creciente prevalencia en los países en vías de desarrollo (**Figura 1**). Según los últimos datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2015 las ECV ocasionaron el 31% de las muertes registradas en el mundo, las cuales aumentaron hasta casi el 33% en 2019 según el *Global Burden of Disease* (GBD). Estos datos evidencian la necesidad de intensificar rápidamente su prevención, diagnóstico y tratamiento.



**Figura 1.** Representación del porcentaje de muertes totales por enfermedad cardiovascular en cada país durante el año 2019. Muertes en individuos de ambos sexos a cualquier edad. Riesgo expresado en porcentaje mediante la escala de colores mostrada. Figura obtenida de *GBD Compare*.

El porcentaje de muertes en el mundo durante el año 2019 por ECV se representa en la **Figura 2**. La principal causa subyacente de la mayoría de las ECV es la aterosclerosis: una enfermedad crónica, sistémica e inflamatoria, que afecta a arterias de mediano y gran calibre. Se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima de las arterias con pérdida de la elasticidad, debido al desarrollo de múltiples lesiones focales (placas de ateroma), formadas por la acumulación de células inflamatorias, lipoproteínas y tejidos fibrosos [1]. El proceso aterosclerótico cursa durante décadas de manera asintomática y silente, pudiendo complicarse mediante la erosión o la rotura de la placa y la formación de un trombo en su superficie, provocando isquemia, necrosis y estrechamiento en el paso sanguíneo, lo que en muchos casos resulta en un evento cardiovascular (CV) repentino con consecuencias potencialmente fatales como accidente cerebrovascular (ictus) o infarto agudo de miocardio (IAM) [2].

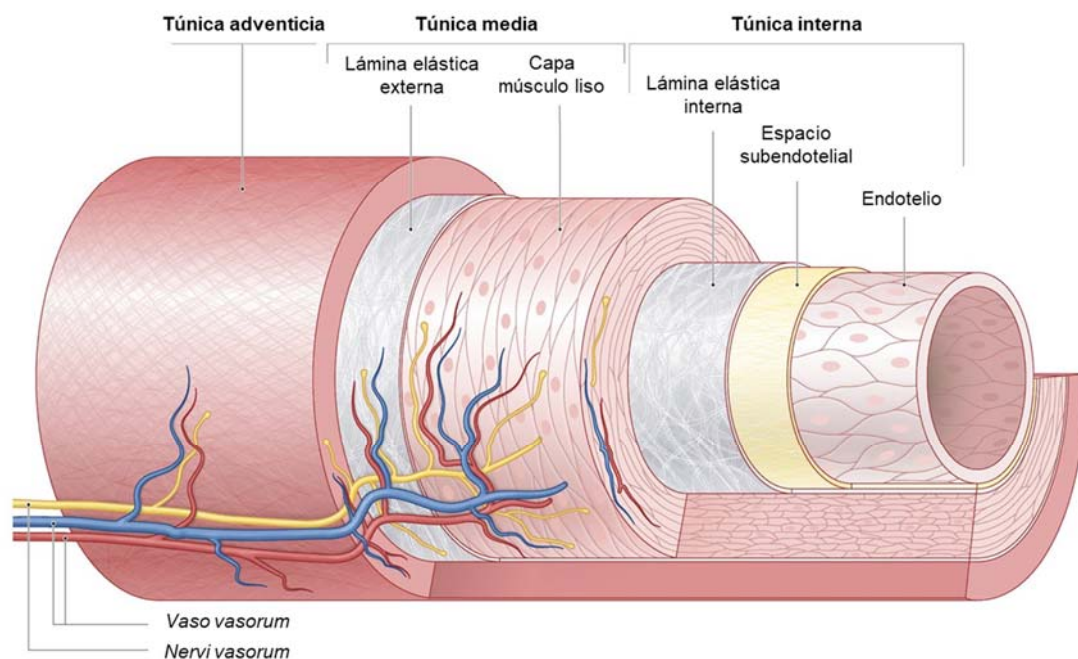


**Figura 2. Representación de las muertes por enfermedad cardiovascular a nivel mundial en el año 2019.** Datos obtenidos de *Global Burden of Disease*. Figura Adaptada de *Nat Rev Dis Primers* 2019 Aug 16;5(1):56.

Hay que destacar que muchas muertes por accidente cerebrovascular pueden no estar causadas directamente por la aterosclerosis sino por otros factores como la hipertensión. De manera similar, no todos los casos de cardiomiopatía son el resultado de daño isquémico y algunos casos de fibrilación auricular pueden no estar asociados con la aterosclerosis [3].

## 1.2. ATEROSCLEROSIS: Causa principal de las enfermedades cardiovasculares

La pared de la arteria sana tiene una estructura trilaminar (**Figura 3**). La capa más externa, la túnica adventicia, contiene terminaciones nerviosas (*nervi vasorum*), mastocitos y microvasos que nutren la capa media (*vaso vasorum*). La túnica media consta de una lámina elástica externa, seguida de una capa de músculo liso con células en reposo y una matriz extracelular bien organizada que comprende elastina, colágeno y otras macromoléculas. La capa más interna o túnica íntima está sostenida por la membrana elástica interna, seguida por un espacio subendotelial formado por tejido conjuntivo que lleva hasta el endotelio, el cual está en contacto directo con el flujo sanguíneo. El endotelio está constituido por miles de millones de células endoteliales que recubren en forma de monocapa el interior de venas, arterias y capilares, y su función no se limita a contener la sangre, sino que además modula el tono vascular, regula el paso de células y fluidos hacia los tejidos, controla la coagulación sanguínea y participa en la generación de nuevos vasos.



**Figura 3. Histología de la arteria sana.** Las arterias se componen de tres capas concéntricas, de fuera hacia el lumen: túnica adventicia, túnica media y túnica íntima.

Aunque a menudo se utilicen como sinónimos, arteriosclerosis y aterosclerosis son procesos diferentes. Mientras que la arteriosclerosis es un engrosamiento y endurecimiento arterial difuso, con mayor o menor depósito de calcio, asociado a la edad y que no puede prevenirse, la aterosclerosis es un engrosamiento y endurecimiento arterial acompañado de depósito de lípidos, que se produce de forma focal (preferencialmente en bifurcaciones y curvas) y sistémica (corazón, cerebro, riñón, aorta abdominal y miembros inferiores) y que se puede prevenir. Además, la aterosclerosis puede desarrollarse de tres formas diferentes: una forma crónica o fisiológica (asociada exclusivamente a la edad), una intermedia o multifactorial (asociada a varios factores de riesgo) y otra acelerada (asociada a determinadas patologías crónicas como hipercolesterolemia familiar con inicio en la infancia, diabetes mellitus tipo 2, lupus eritematoso sistémico o hipertensión arterial severa) [4]. En cualquiera de los casos, la aterosclerosis siempre es precedida y acompañada por un proceso de alteración del endotelio conocido como disfunción endotelial, llegando a considerarse el inicio de la aterosclerosis como una respuesta sobredimensionada ante esa agresión sufrida en el endotelio, que puede dar lugar a un proceso de remodelación del vaso y formación de placa de ateroma como consecuencia del proceso inflamatorio desencadenado [5].

### **Disfunción endotelial**

Las fuerzas de corte laminar constantes que ejerce el flujo sanguíneo sobre la pared vascular proporcionan efectos ateroprotectores, provocando un aumento de la producción de óxido nítrico endotelial (eNO), inhibiendo la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria en la superficie de la célula endotelial, y estimulando a la misma para que produzca la enzima antioxidante superóxido dismutasa [6]. Sin embargo, el flujo alterado en sitios como ramas arteriales, bifurcaciones y curvas de la arteria, estimula la señalización proinflamatoria, aumenta la expresión en el endotelio de moléculas específicas de adhesión, e incluso parece que acelera la senescencia endotelial a través de una vía dependiente de p53-p21 [7]. Concretamente, la célula endotelial aumenta la expresión de moléculas específicas como la selectina E, la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de la célula vascular (VCAM-1), produciendo como consecuencia la adherencia y migración al espacio subendotelial de los monocitos y, en menor medida, linfocitos T [1]. Como resultado, se produce una disfunción endotelial y el desarrollo subsiguiente de lesiones ateroscleróticas en esas zonas [8].

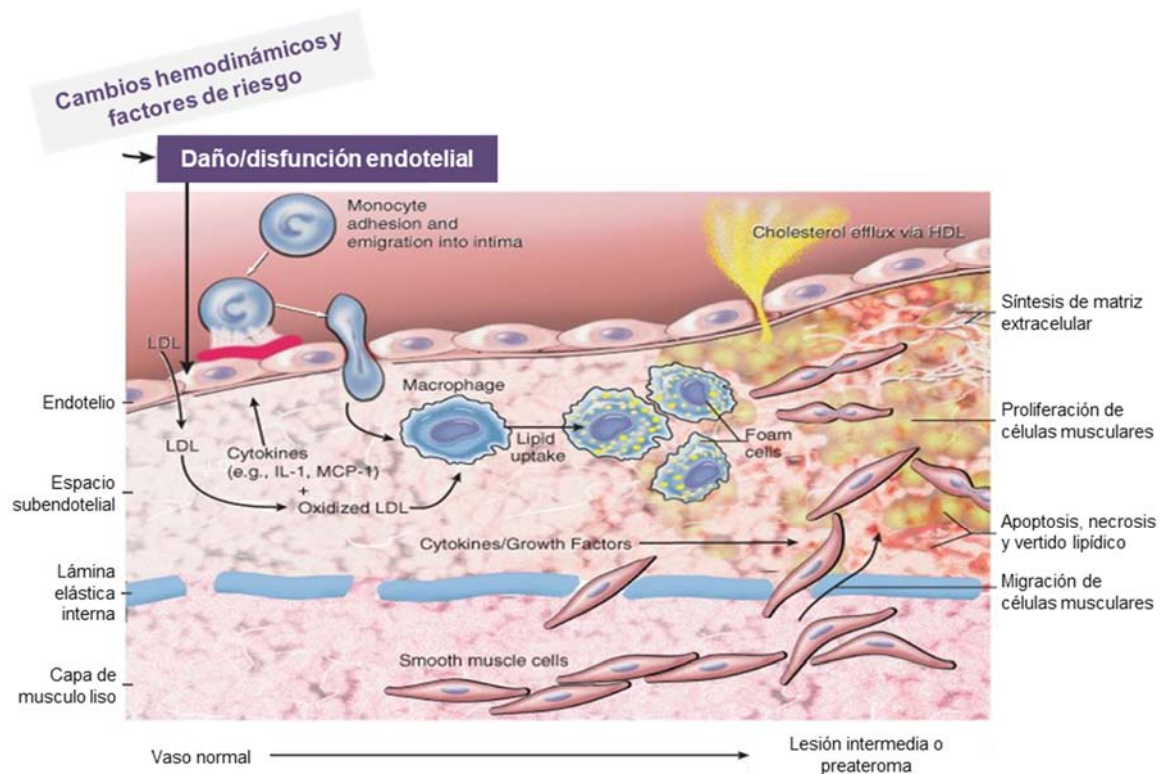
## Depósito de lípidos

Junto a la disfunción endotelial y como elemento esencial del proceso aterosclerótico, se encuentra el depósito de lípidos. El nivel de colesterol plasmático es probablemente el único factor de riesgo capaz de impulsar el desarrollo de la aterosclerosis incluso en ausencia de otros factores de riesgo conocidos [9]. Las moléculas de LDL circulante penetran al espacio subendotelial donde son oxidadas (LDLox) por acción de enzimas como la mieloperoxidasa, óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y/o 15-lipooxigenasa [10, 11]. Además, se ha descrito que las células endoteliales presentan receptores *scavengers* SREC-I (capaces de internalizar cualquier tipo de LDL modificada por oxidación, acetilación o glicosilación) y LOX-1 (que captan de forma exclusiva a la LDLox) [12]. En cualquier caso, y como parte del proceso de disfunción endotelial, la LDL terminará como LDLox en el lecho vascular predisponiendo a una situación citotóxica, proinflamatoria, quimiotáctica y proaterogénica. Una vez que los monocitos y los linfocitos T alcanzan la íntima, las LDLox y otras sustancias asociadas con la aterogénesis van a participar en la transformación del monocito a macrófago y su posterior activación [13]. Estos macrófagos fagocitarán la LDLox mediante los receptores CD36 y SR-A, acumulándola en su citoplasma y confiriéndole un aspecto de células espumosas [1]. Por su parte, los macrófagos activados liberan especies reactivas del oxígeno (ROS) con gran capacidad para oxidar a las LDL que continúan llegando al interior del vaso. Tanto la LDLox del espacio subendotelial, como la fagocitada por las células espumosas, puede ser exportada al hígado mediante lo que se conoce como transporte inverso del colesterol, en el que están implicados la HLD y los transportadores ABC [14]. Sin embargo, cuando entra más LDLox de la que sale, surge la acumulación de lípidos y de células espumosas, cuya presencia masiva en la íntima constituye la primera lesión macroscópicamente visible conocida como estría grasa [13].

Por otro lado, además de la influencia del ambiente hemodinámico local y el depósito de lípidos, se sabe que el endotelio es “agredido” por múltiples factores de riesgo como hipertensión, diabetes, tabaquismo o sexo masculino y, aunque los mecanismos responsables no están bien establecidos todavía, parece que podrían aumentar la aterogenicidad de las LDL o aumentar la susceptibilidad de la pared [1].

## Inflamación, proliferación y fibrosis

El endotelio disfuncional, los macrófagos activados y las células espumosas liberan una gran variedad de moléculas: mitógenos como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina 1 (IL-1); y proteínas quimiotácticas como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) [13]. Estas moléculas inducen el reclutamiento de nuevos monocitos y linfocitos T y provocan que las células musculares de la capa media pasen de fenotipo contráctil a proliferativo-secretor, las cuales migran al espacio subendotelial para proteger el endotelio, donde ayudan al macrófago en la fagocitosis de LDLox y secretan citoquinas, factores de crecimiento y una nueva matriz extracelular. A nivel histológico, la estría grasa se transforma en una lesión con mayor número de células rodeadas de lípidos y algunas fibras, conocida como lesión intermedia o preateroma, a partir de la cual se puede desencadenar el desarrollo de lesiones más avanzadas potencialmente capaces de dar sintomatología [2]. La **Figura 4** representa el proceso aterosclerótico en sus primeras fases tal y como se ha descrito en párrafos anteriores.



**Figura 4.** Representación del inicio del proceso aterosclerótico. Adaptada de Elsevier © 2005.

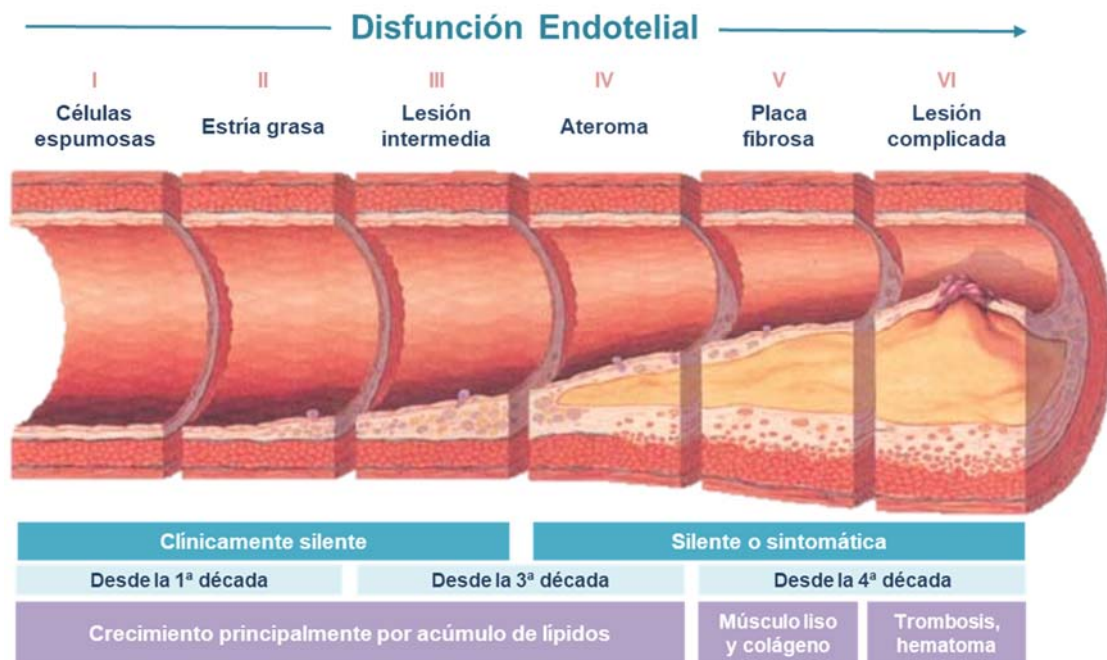
### **Progresión de la lesión aterosclerótica**

El aumento de la proliferación celular, inflamación y fibrosis, junto con la apoptosis de macrófagos, células musculares y linfocitos T, provocan un gran aumento de los lípidos extracelulares que rodean la lesión dando lugar al ateroma, que avanzará hasta formar un núcleo lipídico rodeado por una capa fibrosa protectora constituyendo lo que se conoce como placa de ateroma [2]. Al mismo tiempo, aumenta la rigidez de la pared arterial y disminuyen su elasticidad y su capacidad de poder dilatarse ante situaciones que requieran un mayor aporte de sangre al corazón. Conforme aumenta el tamaño de la placa, el diámetro del lumen va disminuyendo. La obstrucción progresiva de la arteria conlleva una disminución del flujo sanguíneo que a su vez puede provocar una isquemia. Si el aporte sanguíneo al tejido miocárdico es insuficiente pero no absoluto se denomina angina, mientras que si la falta de oxígeno es total se produce la muerte por necrosis del tejido miocárdico la cual es irreversible y recibe el nombre de IAM (en el caso de las arterias coronarias) o ictus (en el caso de la arteria carótida) [13].

La modificación de los factores de riesgo CV (RCV) que contribuyeron al desarrollo de la placa (colesterol elevado, hipertensión, diabetes, tabaquismo, obesidad o sedentarismo) puede detener su crecimiento [15]. La placa de ateroma puede mantenerse estable de manera indefinida sin llegar a causar nunca síntoma alguno (angina silente), pero también puede ocurrir que, a partir de un determinado grado de obstrucción, la persona comience a presentar síntomas de angina relacionados con una mayor exigencia en el aporte de sangre al corazón (p. ej., ante un determinado nivel de esfuerzo físico) aunque no llegue a producirse nunca una situación de amenaza vital (angina estable). Sin embargo, la aterosclerosis coronaria también puede evolucionar hacia situaciones clínicas más comprometidas, como los síndromes coronarios agudos, que incluyen la angina inestable y el IAM, en los cuales la placa de ateroma no permanece estable sino que se produce un evento trombo-oclusivo en el sitio de depósito de la placa [1]. El trombo generado puede ocluir por completo la arteria (IAM) o aumentar de forma muy significativa el porcentaje de estenosis que presentaba el vaso cuando la placa aún no se había roto, pero sin llegar a ocluirlo por completo (angina inestable). Aproximadamente en el 75% de las enfermedades coronarias fatales los trombos se originan por la rotura de la placa y el resto por erosión de la misma pero sin llegar a romperse [16, 17]. Aunque no se comprende muy bien por qué unas placas se rompen y otras no, dentro de las placas con evolución inestable se diferencian varios niveles de vulnerabilidad y riesgo, atendiendo a la presencia de determinadas características histológicas que las predisponen a sufrir

complicaciones como rotura, microfragmentación y trombosis. En las lesiones post-rotura, el núcleo necrótico ocupa aproximadamente de un tercio a la mitad del área total de placa, mientras que en la mayoría de las placas vulnerables no rotas ocupa menos de un cuarto de la lesión, sugiriendo que la expansión progresiva del núcleo necrótico precede a la rotura de la placa [18]. Además, estas lesiones se caracterizan por tener una fina capa fibrosa que contiene pocas células musculares lisas y muchos macrófagos, angiogénesis, inflamación adventicia y remodelación externa [1]. La hemorragia intraplaca se ha identificado como un paso crítico que conduce a la expansión del núcleo necrótico, donde la acumulación de eritrocitos dentro del núcleo conduce a un aumento del contenido de colesterol libre e infiltración excesiva de macrófagos [19]. En cualquier caso, la rotura de la placa expone a leucocitos, plaquetas y factores sanguíneos circulantes al material trombogénico del interior de la misma conduciendo a la formación de trombos [3]. Los mecanismos involucrados en la formación de trombos como consecuencia de la erosión de la placa se están investigando [20].

A nivel histológico, la Asociación Americana del Corazón clasifica las lesiones ateroscleróticas en 6 tipos bien definidos conocidos como las Fases de Stary [2], las cuales se representan en la **Figura 5**.



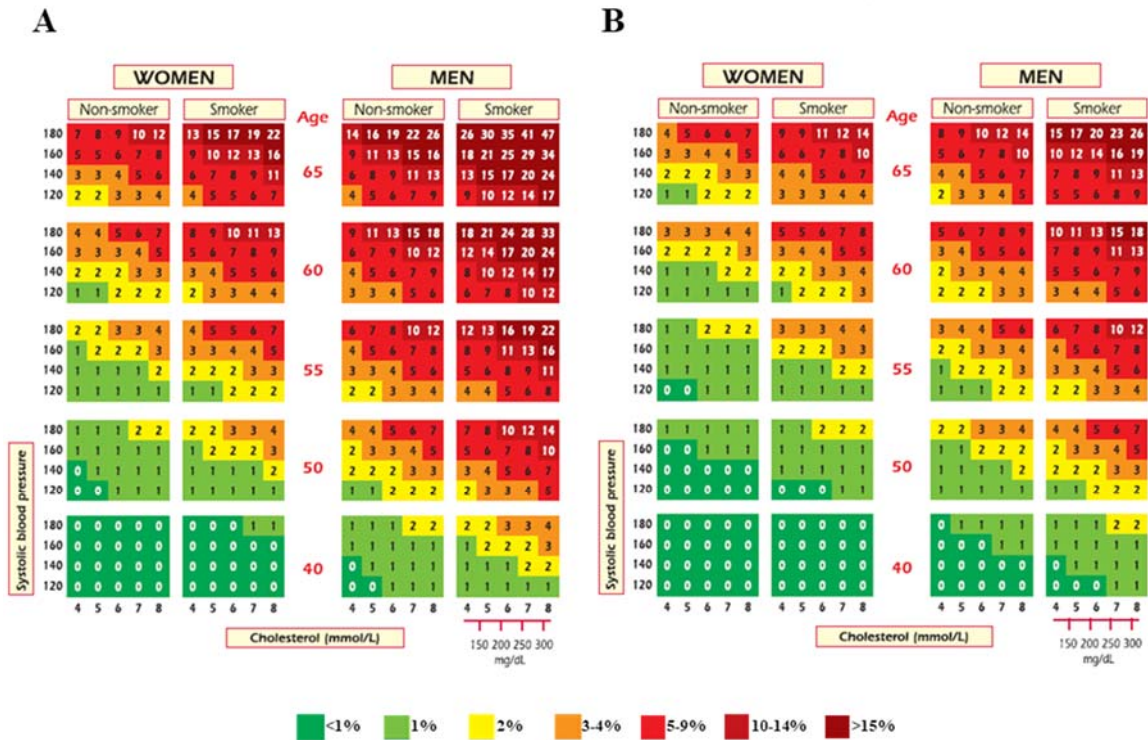
**Figura 5. Evolución histológica del proceso aterosclerótico.** El proceso comienza en la primera década de la vida junto con la disfunción endotelial. La lesión se divide en 6 tipos o Fases de Stary, pudiendo mostrar sintomatología a partir de la IV. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355-74.

## 2. ESTIMACIÓN DEL RIESGO CARDIOVASCULAR

### 2.1. SISTEMAS DE EVALUACIÓN A CORTO-MEDIO PLAZO

La evaluación del riesgo de desarrollar futuras complicaciones cardiovasculares se considera una excelente estrategia para el diagnóstico precoz y manejo de las ECV, posibilitando así la toma de decisiones en materia de prevención y tratamiento. El RCV, al igual que la aterosclerosis, presenta una etiología multifactorial que se produce como resultado de la interacción entre factores no modificables (edad, sexo, raza y antecedentes familiares) y factores de riesgo modificables como: hiperlipidemia, hipertensión, tabaquismo, obesidad o diabetes [21]. El efecto de esta interacción es complejo, ya que la existencia de varios factores de forma simultánea no suma sino multiplica considerablemente el riesgo de padecer una ECV. Por este motivo, las guías actuales sobre la prevención de la ECV en la práctica clínica recomiendan la evaluación del riesgo global generado por el conjunto de los factores de RCV presentes en el individuo, en lugar de considerar el riesgo provocado por un factor de forma individual [21–23]. Siguiendo esta recomendación, en los últimos años se han desarrollado diversos sistemas de evaluación del RCV. La mayoría de ellos estiman el riesgo de sufrir un evento CV mortal en los próximos 10 años, mediante el uso de ecuaciones basadas en la presencia de factores de RCV tradicionales en individuos aparentemente sanos y desarrolladas mediante estudios prospectivos llevados a cabo en diferentes cohortes de población. Entre estos sistemas cabe destacar Framingham [24], SCORE [25], QRISK<sup>®</sup>2 [26], ASSIGN [27], PROCAM [28], Reynolds [29] y CUORE [30].

Desde el año 2003 hasta septiembre de 2021 las directrices europeas sobre la prevención de la ECV en la práctica clínica que dictan la Sociedad Europea de Cardiología (referidas de ahora en adelante como guías europeas) han recomendado de modo particular el uso del SCORE, el cual se desarrolló en base a datos obtenidos de 12 cohortes de población europeas [25]. El sistema SCORE (del inglés, *Systematic Coronary Risk Evaluation*) estima el riesgo a 10 años de padecer un evento aterosclerótico fatal, basándose en los siguientes factores: edad, sexo, tabaquismo, presión arterial sistólica (PAS) y colesterol total. Además, incluye tablas de estimación diferentes para los países europeos considerados de alto o bajo RCV, las cuales se muestran en las **Figuras 6A y 6B** respectivamente.



**Figura 6. Tablas SCORE.** Estimación del riesgo de sufrir un evento CV fatal en un plazo de 10 años para individuos de 40 a 69 años pertenecientes a países europeos considerados de alto (6A) o bajo (6B) riesgo. Riesgo expresado en porcentaje mediante la escala de colores mostrada (de 0 a > 15 %). Figura adaptada de *Eur Heart J.* 2003 Jun;24(11):987-1003.

En la **Figura 6** se observa cómo el sexo y la edad son las variables que más peso tienen en el cálculo del SCORE ya que, por ejemplo, si nos fijamos en la tabla calculada para los países europeos considerados de alto riesgo (**Figura 6A**), un individuo varón de 40 años, fumador, con PAS de 180 mmHg y colesterol 6 mmol/L (200-250 mg/dL) tendría un 3% de riesgo de sufrir un evento CV fatal en un plazo de 10 años frente al 0% que tendría una mujer de sus mismas características. Además, coincide con el riesgo estimado (3%) para un varón de 60 años, no fumador, con PAS de 120 mmHg y colesterol 4 mmol/L (< 150 mg/dL), es decir, sin más factores de RCV que su edad. Del mismo modo, puede comprobarse el efecto multiplicador generado entre los factores de RCV al que se hacía referencia antes ya que, por ejemplo, para un varón de 55 años con PAS 160 mmHg como único factor de RCV se estima un riesgo del 4%, el cual aumentaría al 8% en el caso de que también fuese fumador y alcanzaría un 16% si además tuviese niveles de colesterol de 8 mmol/L (> 300 mg/dL).

Pese a los avances en materia de prevención que ha supuesto la implantación del uso de estos sistemas de evaluación de RCV, el valor predictivo de estos estimadores es limitado

en la práctica clínica y sigue siendo insuficiente, tal y como lo demuestran los datos de prevalencia ofrecidos por la OMS y el GBD. Una de las limitaciones más importantes que presentan estos sistemas, es que solamente evalúan el riesgo de mortalidad por evento CV en lugar del RCV total (fatal y no fatal), el cual lógicamente es mayor. Como posible solución a este problema, las guías europeas publicadas en 2016 sugieren que el riesgo de ECV total podría calcularse a partir del riesgo de mortalidad por ECV utilizando un multiplicador fijo ( $3\times$ ) [21]. Sin embargo, el uso de un multiplicador fijo aplicado al riesgo de mortalidad por ECV a los 10 años para estimar el riesgo de ECV total es controvertido, ya que conduce a una subestimación grave del riesgo sobre todo en los grupos de edad más jóvenes y en las mujeres [31, 32]. Por otro lado, los algoritmos normalmente se desarrollan en poblaciones de mediana edad, y dado que el impacto de los factores de RCV cambia a lo largo de la vida [33, 34], el uso de estos estimadores en todos los grupos de edad podría ser inapropiado o cuando menos presentar limitaciones [35, 36].

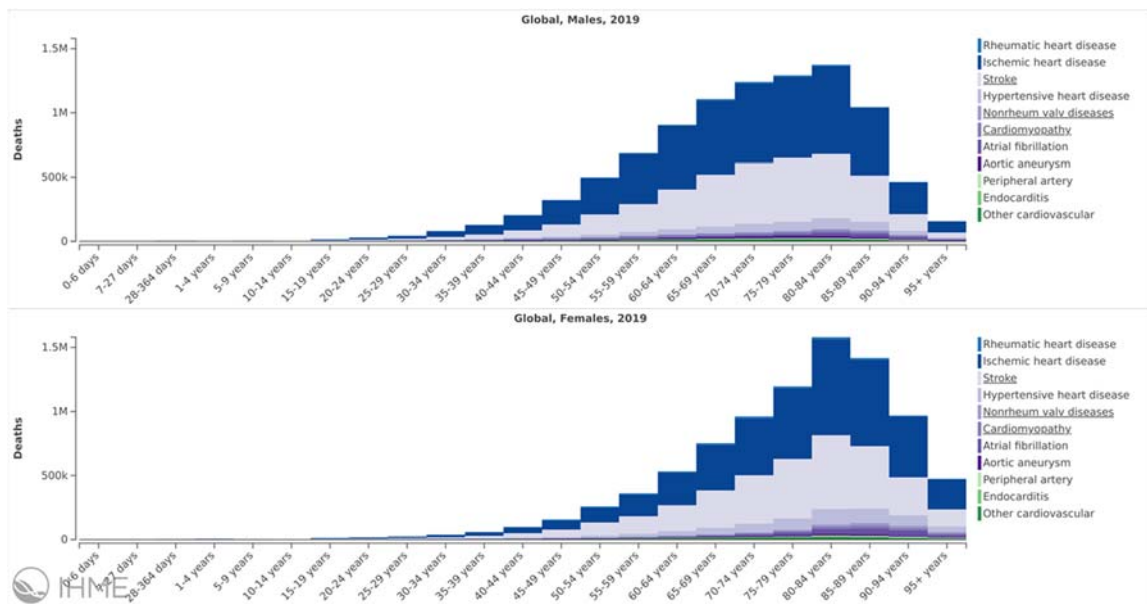
## **2.2. RIESGO CARDIOVASCULAR ESTIMADO A LO LARGO DE LA VIDA: *Lifetime Risk***

Frente a la estimación del riesgo a sufrir un evento CV fatal en los próximos 10 años, aparece la estimación de sufrirlo a lo largo de la vida o *Lifetime Risk* (LTR). El LTR se calcula mediante el estimador QRISK<sup>®</sup>, cuyo cálculo se basa en los siguientes factores: edad, sexo, tabaquismo, índice de masa corporal, relación colesterol total/colesterol HDL (Col/HDL) y PAS, no mostrando en este caso la edad tanto peso como sucede en el sistema SCORE.

## **2.3. POBLACIÓN JOVEN: PRIORIDAD ENTRE OTROS GRUPOS RELEVANTES DE ESTUDIO**

Tanto en las guías europeas publicadas en 2016 [21] como en su actualización de 2019 [23], jóvenes (<50 años), ancianos, mujeres y grupos étnicos han sido descritos como grupos relevantes de estudio por considerarse los grupos de población cuya estimación de RCV podría contar con más limitaciones al emplear los estimadores habituales. Como ya se ha comentado, el que los estimadores se desarrollen principalmente en poblaciones de mediana edad y el hecho de que el impacto de los factores de RCV cambie a lo largo de la vida podría hacer inapropiado el uso de forma generalizada de estos estimadores. En la misma línea, los estimadores actuales están adaptados a diferentes poblaciones europeas, pero no a los diferentes grupos étnicos dentro de estas poblaciones entre los que

también hay diferencias. Como consecuencia, las guías europeas recomiendan desde hace años que se realicen adaptaciones locales para el SCORE y otros sistemas, implementando el uso de modificadores específicos para cada raza o población. Un problema similar existe con la estimación en mujeres, quienes son minoría durante el desarrollo de los algoritmos debido a que tradicionalmente han presentado una menor incidencia de ECV y que además lo hacen con un desfase de diez años (Figura 7). Sin embargo, en los últimos años se ha observado un aumento de la incidencia de ECV en la mujer, llegando incluso a superar a la del hombre (34,58% vs 31,37% según los datos del GBD en 2019), lo que ha llevado al estudio y consideración de factores de RCV característicos de la mujer tales como preeclampsia, síndrome del ovario poliquístico o diabetes gestacional [23].



**Figura 7. Muertes por enfermedad cardiovascular en función de la edad y el sexo.** Figura obtenida de *GBD Compare*.

En el caso de la población joven, el RCV es particularmente subestimado al ser la edad uno de los factores que más contribuyen en estos algoritmos. Como resultado, pocos jóvenes alcanzan los umbrales establecidos para iniciar una acción terapéutica y, en consecuencia, las estrategias de prevención eficaz se retrasan. Esta limitación choca con el hecho de que el proceso aterosclerótico comienza temprano en la vida y, por tanto, una prevención óptima debería comenzar en población joven donde existen evidencias de aterosclerosis subclínica [37, 38]. Se ha demostrado que la adquisición de hábitos

saludables por parte de la población joven disminuye el riesgo de sufrir eventos CV en el futuro [15], lo que también apoya que las estrategias de prevención deben comenzar temprano. Sin embargo, no sería prudente iniciar estrategias muy estrictas en todos los jóvenes, ya que no todos ellos van a desarrollar ECV. Intervenir en la fase preclínica de la aterosclerosis es por tanto crucial para prevenir eventos CV, surgiendo la necesidad de métodos diagnósticos que permitan evaluar la enfermedad en estadios tempranos y hacer más precisa la estratificación del riesgo real en la población joven y de forma individualizada.

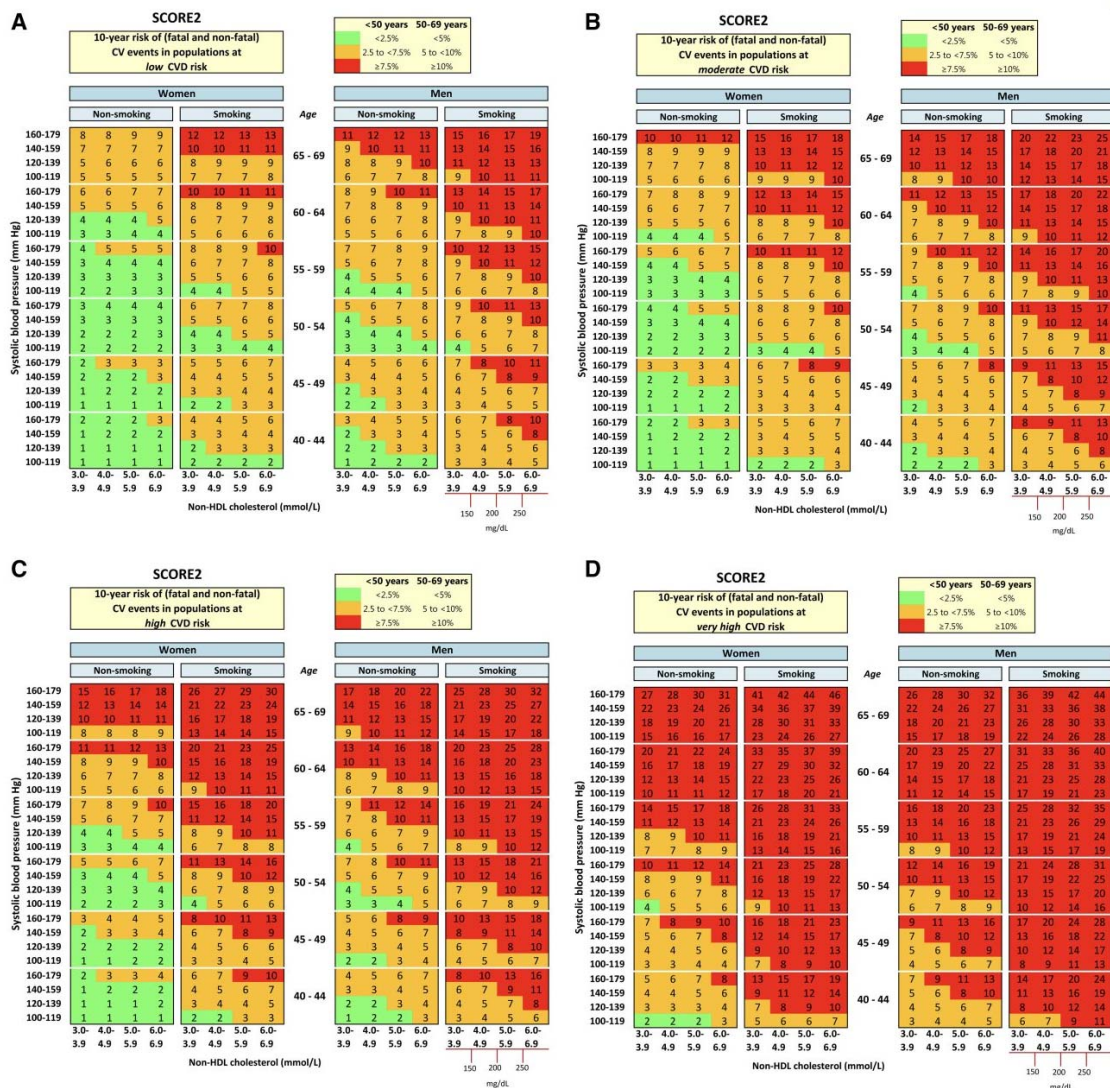
En el otro extremo, la vejez es un factor de RCV importante. Sin embargo, individuos de la misma edad cronológica pueden diferir considerablemente con respecto a su estado de salud general, lo que limita la capacidad predictiva de la edad cronológica por sí misma para determinar riesgo global de ECV [39]. Es un hecho que los factores de RCV tradicionales subestiman la supervivencia en los ancianos [40] y esto puede resultar en un problema de sobremedicación [41].

La identificación de nuevos biomarcadores moleculares que permitan estratificar el RCV de una forma más precisa de la que lo hacen actualmente los factores de riesgo tradicionales, y el estudio de las diferentes poblaciones por separado, ayudarían a conseguir una intervención temprana personalizada a nivel clínico-preventivo posibilitando la puesta en marcha de terapias individualizadas mucho más efectivas. Del mismo modo, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas podría ayudar a mejorar la evolución de este tipo de pacientes.

#### **2.4. NUEVOS AVANCES EN LOS SISTEMAS DE CÁLCULO: *¿El principio de un cambio?***

Dada las grandes limitaciones presentes en los sistemas de evaluación de RCV, se han desarrollado nuevas versiones de algunos de ellos en base a las necesidades de los grupos más relevantes de estudio. En 2017 se publicó QRISK<sup>®</sup>3, una modificación de QRISK<sup>®</sup>2 que junto a los factores de riesgo tradicionales incluye factores de riesgo novedosos como migraña, periodontitis, enfermedad mental severa, lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide o disfunción eréctil [42]. En julio de 2021 se publicó una actualización del sistema SCORE, el SCORE2, para estimar el riesgo de ECV fatal y no fatal a 10 años en personas europeas de entre 40-69 años sin ECV previa ni diabetes [43], a diferencia del SCORE que sólo estimaba el riesgo de ECV fatal. Además, al recalibrar el modelo han

clasificado a los países en cuatro estratos: bajo, moderado, alto y muy alto (Figura 8). Por otro lado, y como novedad, se ha publicado un sistema para la estimación en personas mayores de 70 años, el SCORE2OP (del inglés, *Systematic Coronary Risk Evaluation 2 in Older Persons*) [44]. En septiembre de 2021 se publicaron las nuevas guías europeas sobre la prevención de la ECV en la práctica clínica, las cuales recomiendan el uso de SCORE2 como sustituto del antiguo SCORE e incorporan el SCOREOP [45].



**Figura 8. Tablas SCORE2.** Estimación del riesgo de sufrir un evento CV fatal y no fatal en un plazo de 10 años para individuos de 40 a 69 años pertenecientes a países europeos considerados de bajo (8A), moderado (8B), alto (8C) o muy alto (8D) riesgo. Riesgo expresado en porcentaje mediante la escala de colores mostrada en la leyenda de la figura. Figura adaptada de *Eur Heart J.* 2021 Jul 1; 42(25):2439–2454.

La **Tabla 1** muestra la comparación del riesgo estimado mediante los sistemas SCORE, SCORE2, QRISK®3 y LTR para individuos jóvenes de una determinada condición

clínica. En ella se observa que la mayoría de los pacientes que presentan un riesgo bajo de desarrollar ECV a corto o medio plazo tienen, por el contrario, un elevado riesgo de desarrollarla a largo plazo cuando la estimación se realiza a lo largo de la vida. Parece, por tanto, que el LTR podría estar más cerca de estimar el RCV total (fatal y no fatal) de lo que lo están los actuales sistemas de estimación de riesgo a 10 años. Pese a que las guías europeas de 2016 decían que no había evidencias de que el LTR pudiese ser utilizado para indicar el inicio de un tratamiento farmacológico preventivo [21], y que sólo debería utilizarse como herramienta de comunicación y concienciación de pacientes de alto riesgo, las nuevas guías de 2021 lo han incluido en su protocolo para el manejo de la prevención de ECV en personas aparentemente sanas [45].

**Tabla 1**  
**Comparación del riesgo cardiovascular estimado obtenido mediante los sistemas SCORE, SCORE2, QRISK<sup>®</sup>3 y LTR para individuos jóvenes de una determinada condición clínica**

| INFORMACIÓN CLÍNICA            |  |        |             | SCORE | SCORE2 | QRISK <sup>®</sup> 3 | LTR  |
|--------------------------------|--|--------|-------------|-------|--------|----------------------|------|
| <b>Edad</b><br><b>48 años</b>  | Col. Total = 236<br>Col/HDL = 4,68<br>PAS = 120 ± 10 | Mujer  | No fumadora | 0     | 1      | 2,1                  | 29,4 |
|                                |  |        | Fumadora    | 0     | 3      | 4,4                  | 30,6 |
| <b>Altura</b><br><b>173 cm</b> |  | Hombre | No fumador  | 0     | 3      | 3,8                  | 35,8 |
|                                |  |        | Fumador     | 0     | 6      | 7,6                  | 37,2 |
| <b>Peso</b><br><b>85 kg</b>    | Col. Total = 350<br>Col/HDL = 5,8<br>PAS = 180 ± 30  | Mujer  | Sin migraña | 0     | 3      | 12,2                 | 45,2 |
|                                |  |        | Con migraña | 0     | 3      | 15,5                 | 45,2 |
|                                |  | Hombre | Sin migraña | 2     | 4      | 21,7                 | 50,7 |
|                                |  |        | Con migraña | 2     | 4      | 25,8                 | 50,7 |

Valores de riesgo expresados en %, colesterol total (Col. Total) en mg/dL y presión arterial sistólica (PAS) en mmHg ± d.e. de al menos las 2 últimas medidas. Col/HDL: relación colesterol total/colesterol HDL. Condición de fumador utilizada para el cálculo > 20 cigarros al día. LTR: *Lifetime Risk* o riesgo estimado a lo largo de la vida calculado con QRISK<sup>®</sup>

### 3. MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Además de los valores de lípidos en sangre (colesterol total, HDL, LDL) considerados uno de los principales factores de RCV, en la práctica clínica se utilizan algunos marcadores sanguíneos diagnósticos y pronósticos de ECV [46]. Entre ellos se distinguen marcadores inespecíficos como la proteína C reactiva y el fibrinógeno, ambos marcadores de inflamación [47], o la mioglobina y la creatina quinasa MB (CK-MB) que indican daño

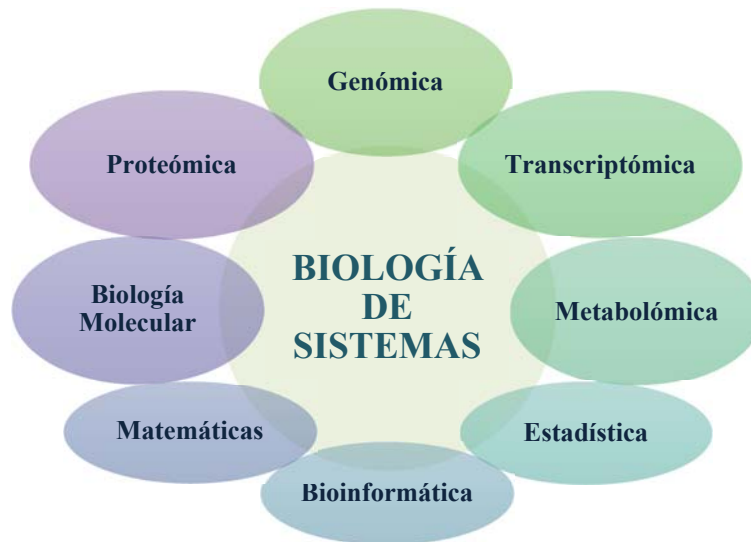
tisular cardiaco [48]. También existen marcadores cardioespecíficos entre los que destacan las troponinas cardíacas I y T que se utilizan para valorar la existencia de necrosis en el corazón [49–51], o el péptido natriurético B que indica daño en el ventrículo izquierdo [52]. Junto al uso de estos marcadores, las guías europeas recomiendan el uso de marcadores de imagen como modificadores de la estimación del riesgo para pacientes con RCV aterosclerótico intermedio (según herramientas estándar de predicción), pero desaconsejan su uso como medida de *screening*. Concretamente estos marcadores son presencia de calcio en las arterias coronarias, ultrasonido carotídeo, rigidez arterial, índice tobillo-brazo y ecocardiografía.

Dado que el uso combinado de todos estos marcadores junto con los sistemas actuales de predicción de RCV sigue siendo insuficiente, cada vez ha ido surgiendo un mayor interés por el uso y el descubrimiento de nuevos marcadores en biopsia líquida que ayuden a identificar de forma simple, rápida y precisa a aquellos pacientes que tengan un mayor riesgo de sufrir un problema CV y una peor evolución clínica, lo cual podría ser especialmente útil en personas sin factores de riesgo conocidos que de otro modo pasarían inadvertidas.

#### **4. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES MEDIANTE ESTRATEGIAS ÓMICAS: *Aproximaciones Generales***

Un marcador biológico o biomarcador es una característica biológica que puede ser medida de forma objetiva y que proporciona información sobre procesos fisiológicos, el desarrollo de procesos patológicos o sobre la respuesta frente a un tratamiento farmacológico, entre otros. Indicadores biológicos tales como la medida de la temperatura corporal o de la presión arterial son utilizados de forma rutinaria en la práctica clínica desde finales de los siglos XVII y XIX respectivamente. La eclosión de las ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica o metabolómica), ha facilitado la identificación de potenciales biomarcadores moleculares, los cuales se corresponden con variaciones en la estructura, en la secuencia o en los niveles de expresión de genes, proteínas o metabolitos. Las aproximaciones ómicas proporcionan un conocimiento holístico, considerando para ello el mayor número de variables posibles para posteriormente extraer la información verdaderamente útil de ellas y trabajar en su conjunto. El uso de aproximaciones ómicas permite diseñar los experimentos sin pre-selección de moléculas

diana, proporcionando así un abordaje sin sesgo y llevando a cabo una evaluación global de todos los sistemas y moléculas de un organismo implicados en el desarrollo de la patología de interés de forma simultánea, entendiéndolo como un todo y enmarcado en lo que se conoce como biología de sistemas (**Figura 9**).

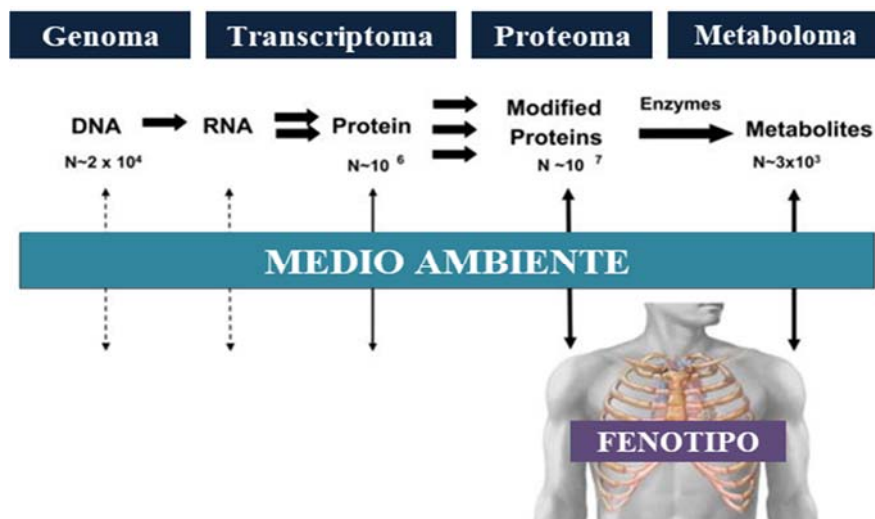


**Figura 9.** Representación de la rama multidisciplinar que integra la Biología de Sistemas.

Las estrategias basadas en biología de sistemas, cuyo desarrollo se vio impulsado por la aparición de las tecnologías ómicas, suponen un cambio de paradigma al abordar los estados biológicos (salud y enfermedad) como un todo y no como el análisis de sus partes por separado. La combinación de varias aproximaciones ómicas proporciona por tanto una visión molecular de la patología de interés, permitiendo en algunos casos la integración de información procedente tanto del genotipo como del fenotipo. De este modo, podemos aproximarnos al concepto de medicina personalizada con diferentes aplicaciones como: facilitar el diagnóstico de pacientes con una patología concreta e incluso estratificar dichos individuos en subgrupos clasificados por ejemplo por gravedad (**biomarcadores diagnósticos**); predecir la posibilidad de desarrollar una patología antes de que se produzcan síntomas de la misma (**biomarcadores predictivos**); proporcionar información sobre el posible curso de la patología, anticipando los posibles cambios en el curso de la enfermedad, así como su posible prolongación en el tiempo (**biomarcadores pronósticos**); predecir cómo responderá un paciente frente a un

tratamiento concreto, pudiendo de esta forma evitar tratamientos ineficaces o que produzcan reacciones adversas, con anterioridad a la puesta en marcha de dicho tratamiento (**biomarcadores de respuesta**) [53].

Dado el carácter complejo del conjunto de interacciones fisiopatológicas que subyacen al desarrollo de la lesión aterosclerótica, el abordaje multidisciplinar y sin sesgo que caracteriza a las estrategias ómicas las convierte en una potente herramienta de predicción de riesgo, posibilitando investigar sin pre-selección de candidatos todas aquellas moléculas cuyos niveles de expresión se vean alterados a lo largo del desarrollo de aterosclerosis [54]. Frente a la genómica, la proteómica y la metabolómica presentan la ventaja de medir cambios epigenéticos y ser un fiel reflejo del fenotipo y la situación real de un organismo en cada momento [55] (**Figura 10**).



**Figura 10.** Integración de diferentes ómicas y su relación con el fenotipo. Adaptada de *J Am Coll Cardiol.* 2008 Jul 8;52(2):117-23.

#### 4.1. APROXIMACIÓN PROTEÓMICA

El rápido despegue de las aproximaciones ómicas comenzó con la genómica y la secuenciación completa del genoma humano (Proyecto Genoma Humano, 2003). Por analogía con el concepto de genoma, uniendo los términos de “proteína” y “genoma”, Mark Wilkins en 1994 acuñó el término “proteoma” para describir al conjunto de proteínas expresadas en un organismo o sistema biológico en un momento determinado y bajo unas condiciones concretas. El proteoma es dinámico, existiendo un enorme

número de proteomas y subproteomas que coexisten en un mismo individuo fruto de los cambios que se producen en el entorno del genoma, ya que, por ejemplo, las alteraciones que se producen en la secuencia de ADN y los cambios epigenéticos, pueden llevar a la síntesis de proteínas con modificaciones estructurales o a una síntesis aumentada o disminuida de la misma. Debido a las importantes funciones que desempeñan las proteínas en el organismo, su mal funcionamiento, ausencia o sobreexpresión, se pueden traducir en el desarrollo de diferentes patologías. A su vez, el curso de enfermedades altera los niveles de aquellas proteínas implicadas en los procesos funcionales asociados, por lo que, de un modo u otro, las proteínas se presentan como potenciales biomarcadores de enfermedad. El Proyecto del Proteoma Humano tiene como objeto elaborar el mapa completo de todas las proteínas presentes en los seres humanos, mediante la descripción y caracterización de las proteínas codificadas en cada cromosoma, y el estudio del papel de las proteínas implicadas en la patología humana [56].

La proteómica estudia el proteoma y se presenta como un reto de mayor complejidad que el estudio del genoma debido a diferentes motivos. En primer lugar, el número de proteínas es mucho más elevado que el de genes. Frecuentemente nos enfrentamos a un amplio rango dinámico lineal dentro de una matriz biológica, es decir, algunas proteínas aparecen en concentraciones muy elevadas (mg/mL) mientras que otras lo hacen en concentraciones muy pequeñas (pg/mL), siendo precisamente estas proteínas menos abundantes las de mayor interés por la dificultad que entraña su identificación. A ello se suma que las proteínas sufren modificaciones post-traduccionales fundamentales para que la proteína realice correctamente su función biológica, pero que suponen una diversidad estructural que complica técnicamente su estudio.

El desarrollo de la espectrometría de masas (MS, del inglés *Mass Spectrometry*) fue uno de los avances determinantes para el auge actual del empleo de la proteómica. La **Figura 11** muestra el flujo general de trabajo en un experimento de análisis proteómico por MS, el cual puede llevarse a cabo a nivel de proteína o de péptido. El término *shotgun*, acuñado por Walters en 2001, hace referencia al análisis *bottom-up* muy comúnmente empleado en un experimento de análisis proteómico, que incluye una digestión enzimática de las proteínas, generalmente con tripsina, y posterior análisis de identificación y cuantificación peptídica.

De modo general, la metodología empleada en un experimento de análisis proteómico incluye como paso clave la preparación de la muestra, siendo uno de los procesos más

importantes del que dependerán la calidad y relevancia de los datos obtenidos. Tras la extracción proteica de su matriz biológica original, la solubilización se realiza mediante el uso de diferentes agentes químicos (agentes caotrópicos, detergentes, agentes reductores, agentes alquilantes) y/o procesos mecánicos y/o físicos. Una vez solubilizadas las proteínas de interés y digeridas, si fuera el caso, se pueden llevar a cabo métodos de fraccionamiento a nivel proteico o peptídico tal que permitan reducir la complejidad del proteoma de la muestra a analizar con el objetivo de aumentar la cobertura de la identificación. Dicho fraccionamiento se puede hacer *off-line* o en línea, mediante técnicas electroforéticas o cromatográficas, destacando entre las primeras la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), la electroforesis bidimensional (2-DE) o la electroforesis capilar.



**Figura 11. Flujo general de trabajo en un experimento de alto rendimiento de proteómica.** 2-DE: electroforesis bidimensional, ESI: ionización por electroespray, MALDI: desorción/ionización láser asistida por matriz, MS: espectrometría de masas, SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, TOF: analizador tiempo de vuelo, QQQ: triple cuadrupolo.

En función de la configuración técnica del espectrómetro de masas, sus prestaciones analíticas son diferentes en lo que refiere a sensibilidad, selectividad, precisión y exactitud de masa, entre otras. El espectrómetro de masas consta fundamentalmente de tres partes: una fuente de ionización a través de la cual se introduce la muestra, un analizador que separa los iones en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ), y un detector que registra los iones que lo alcanzan y traduce la señal en un espectro de abundancia en relación a  $m/z$ . Las dos fuentes de ionización comúnmente utilizadas son la que emplea desorción/ionización láser asistida por matriz o MALDI (del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y la fuente de ionización por electroespray o ESI (del inglés

*Electrospray Ionization*). En función del tipo de analizador, podremos llevar a cabo una cuantificación no dirigida o dirigida, siendo los más empleados la trampa iónica, el analizador tiempo de vuelo (TOF, del inglés *Time Of Flight*), cuadrupolo simple, triple cuadrupolo (QQQ) y orbitrap.

En cuanto a la identificación proteica existen dos estrategias básicas: huella peptídica para muestras simples o proteínas purificadas, que se lleva a cabo generalmente por cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas (LC-MS, del inglés *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*), y análisis por MS en tándem (LC-MS/MS) para mezclas complejas, donde es necesario fragmentar los péptidos en el analizador y posteriormente analizar dichos fragmentos. En cualquier caso, la identificación siempre se realiza mediante el empleo de motores de búsqueda y bases de datos informáticas.

Esta información puede consultarse en más detalle en el Manual de Proteómica publicado por la Sociedad Española de Proteómica [57].

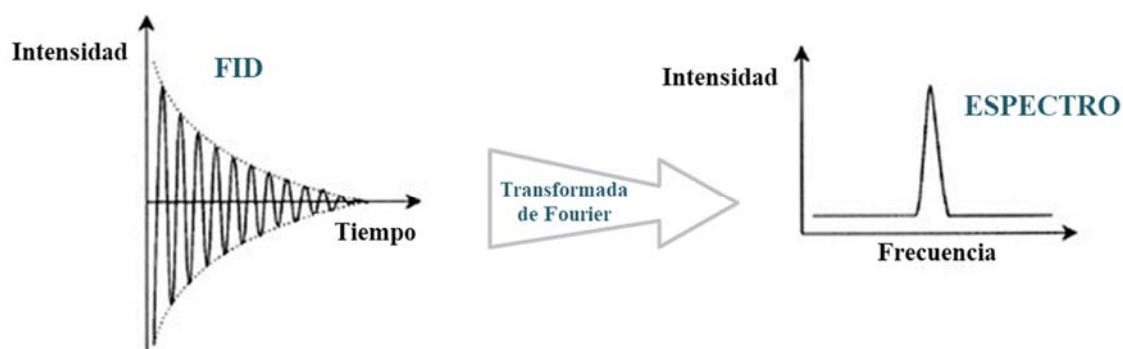
## **4.2. APROXIMACIÓN METABOLÓMICA**

Podemos definir el metaboloma como la “fotografía” del conjunto de metabolitos presentes en la célula bajo unas condiciones determinadas. Los metabolitos son compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en el organismo como resultado de la ingesta o de las reacciones químicas que en él se producen. La metabolómica investiga los niveles de estos metabolitos en células, tejidos o fluidos biológicos como sangre y orina. Mediante el estudio de la concentración de los diferentes metabolitos presentes en el cuerpo humano se pueden obtener patrones o perfiles metabólicos, los cuales pueden verse alterados durante procesos patológicos, respuesta a fármacos u otros tipos de estrés. Comparando estos perfiles entre individuos se pueden identificar, por tanto, a aquellos metabolitos que pueden actuar como indicadores moleculares de un proceso biológico o condición de estudio. Frente a los 30.000 genes o al millón de proteínas objeto de estudio de la genómica y proteómica respectivamente, se estima que existen en torno a 2.400 metabolitos endógenos, lo que supone una ventaja de partida frente al resto de aproximaciones ómicas.

El flujo de trabajo de un experimento de análisis metabolómico es similar al comentado para un análisis proteómico. La principal diferencia radica en lo referente a la preparación de la muestra, ya que en el caso de los metabolitos es más sencilla. Aunque dependerá de la naturaleza de la matriz y de la técnica a utilizar, generalmente consiste en realizar una

etapa de extracción de los metabolitos (en fase sólida o en fase líquida), eliminación de las proteínas presentes (p. ej., por precipitación con disolventes orgánicos), eliminación de posibles interferentes (p. ej., por purificación por cromatografía) y, en ocasiones, concentración (p. ej., por evaporación a sequedad en un sistema concentrador). Al igual que en un análisis proteómico, el análisis metabolómico se puede abordar mediante un enfoque dirigido o no dirigido también por LC-MS/MS. Por la propia naturaleza lipídica de algunos metabolitos, es frecuente también realizar la separación por cromatografía de gases (GC, del inglés *Gas Chromatography*).

Por su parte, la resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica muy utilizada para la identificación de biomarcadores por ser muy robusta y versátil, permitiendo la medida de un gran número de metabolitos de forma fiable y reproducible, partiendo de una preparación de muestra muy sencilla y no destructiva. La RMN proporciona información estructural detallada tanto de compuestos puros como de mezclas heterogéneas siempre y cuando estén presentes átomos como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ , cuyos núcleos sean magnéticamente activos. Para obtener un espectro de RMN se coloca una pequeña cantidad de la muestra a estudiar en un tubo de vidrio que se sitúa dentro del campo magnético del equipo de RMN, con lo que tales núcleos magnéticos adquirirán una oscilación conocida como precesión de Larmor. A continuación, se somete la muestra a un breve pulso de ondas de radio con frecuencia resonante con dicha precesión nuclear de Larmor, con lo cual se excitan simultáneamente todos los núcleos de un mismo tipo. Tras esta excitación, los núcleos volverán a su estado inicial emitiendo en forma de radiofrecuencia la energía absorbida. La intensidad de esta radiofrecuencia emitida disminuye con el tiempo, a medida que se relajan los núcleos excitados en su vuelta al estado inicial. Esta radiofrecuencia decadente se registra en lo que se conoce como señal FID (del inglés, *free induction decay*). Un ordenador recoge la intensidad de esta señal respecto al tiempo de registro, y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, mediante lo que se conoce como transformada de Fourier (**Figura 12**). El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RMN. Así pues, un espectro de RMN es una gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra.



**Figura 12.** Representación de la transformada de Fourier.

Las variaciones en las frecuencias de absorción de RMN, que tienen lugar debido a distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de desplazamientos químicos (unidades  $\delta$  ó ppm), cuyo valor se expresa con respecto al de un compuesto de referencia que se añade a la muestra. La escala más común de desplazamiento químico es la escala  $\delta$  (delta) en la que la absorción del compuesto de referencia se define como 0.00  $\delta$ . En teoría en un espectro sencillo (de un compuesto puro) el valor del desplazamiento químico, el patrón de la señal y su intensidad relativa nos permiten su identificación. En muestras complejas, es necesario realizar experimentos de RMN bidimensional (2D-RMN) para lograr una identificación inequívoca de los metabolitos evitando errores asociados a la existencia de solapamientos de señales en RMN monodimensional. Entre estos experimentos se encuentran el de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY), el cual correlaciona las señales de los núcleos  $^1\text{H}$  directamente acoplados a un enlace; de correlación homonuclear total  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (TOCSY) que proporciona correlaciones entre los núcleos  $^1\text{H}$  que forman parte de un sistema de espines; y de correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC) el cual presenta una mayor resolución permitiendo correlacionar las señales de los carbonos  $^{13}\text{C}$  con las de los protones  $^1\text{H}$  unidos directamente.

La principal limitación de la RMN es su limitada sensibilidad y capacidad de resolución para muestras biológicas complejas en comparación con la MS.

### 4.3. FASES DEL PROCESO DE IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES

El proceso de identificación de biomarcadores mediante aproximaciones ómicas se representa en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Representación de las etapas del proceso de identificación de nuevos biomarcadores moleculares mediante aproximaciones ómicas.

Durante la primera etapa o **FASE DE DESCUBRIMIENTO**, se emplean técnicas de identificación y cuantificación masiva (no dirigida), en las que los candidatos (proteínas o metabolitos) a analizar no son preseleccionados de antemano. Se consiguen identificar cientos o miles de candidatos en un solo experimento generando así una gran cantidad de información cuyo estudio puede resultar tan complejo como fructífero. En esta primera fase de descubrimiento se emplean cohortes de población pequeñas, aunque representativas, que van aumentando en las etapas posteriores de confirmación y validación. Debido al elevado número de candidatos a biomarcador que surgen en esta fase de descubrimiento, es necesario realizar un **PASO INTERMEDIO DE SELECCIÓN DE CANDIDATOS** para tratar de dar prioridad a la investigación de aquellas moléculas que muestren más posibilidades de tener una utilidad clínica real. La fiabilidad de los datos, su reproducibilidad, su robustez y su potencial valor clínico, son algunos de los criterios que se deben contemplar en esta etapa de priorización, en la que se suelen emplear análisis bioinformático y de biología de sistemas. A partir de ahí, se llevan a cabo una o varias **FASES DE CONFIRMACIÓN** clínica y/o técnica, en las que

se evalúan las moléculas diana seleccionadas en una cohorte de población más grande y, a ser posible, independiente de la usada durante la fase de descubrimiento, utilizando para ello técnicas de cuantificación dirigida y por ello diferentes a las empleadas en la fase de descubrimiento. Posteriormente, se procede a una **FASE DE VALIDACIÓN CLÍNICA**. Pese a que no existe un baremo objetivo que mida el nivel de validación del biomarcador necesario para su uso en la práctica clínica, lo que sí se va consiguiendo durante este proceso de validación es un aumento en la robustez del mismo, la cual irá aumentando a medida que se desarrollen ensayos clínicos que demuestren la utilidad clínica real del biomarcador, su especificidad y su seguridad. Dado que el proceso resulta en una tarea larga y costosa, la inversión y la estricta colaboración entre clínicos asistenciales e investigadores son imprescindibles para evitar el desequilibrio actual entre la producción científica de biomarcadores y su uso en la clínica.

## **5. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR: *Revisión actual***

Pese a que de momento las guías clínicas europeas son reticentes a incluir el uso generalizado de biomarcadores moleculares junto con los sistemas actuales de predicción de riesgo (aunque sí recomiendan el uso de alguno de ellos en subgrupos específicos de pacientes), se ha demostrado que la adición de biomarcadores a los actuales sistemas de evaluación de RCV mejora la predicción. En este sentido, un estudio longitudinal en individuos con una edad media al inicio de 71 años con o sin ECV, encontró que la adición simultánea de biomarcadores de anomalías cardiovasculares y renales (troponina I, péptido natriurético B, cistatina C y proteína C reactiva), mejora sustancialmente la estratificación del riesgo de muerte por causas cardiovasculares más allá de la de un modelo basado únicamente sobre factores de riesgo establecidos [58]. De manera similar, recientemente se ha demostrado que una huella metabolómica caracterizada en gran parte por intermediarios de la oxidación de ácidos grasos mejora la predicción de eventos cardiovasculares en la población de edad avanzada [59]. En esta línea, recientemente se ha desarrollado un modelo de aprendizaje automático (EN-PESA) para predecir la presencia y extensión de la aterosclerosis subclínica en individuos jóvenes asintomáticos, basándose en variables rutinarias, cuantitativas y de fácil medición [37]. Como resultado, el modelo ha determinado que la combinación de la edad, la PAS, la ingesta dietética y el análisis de 10 variables rutinarias en sangre y orina (Col/HDL, leucocitos, hemoglobina,

vitamina B12, LDL, fósforo, PAS, isoprostanos/creatinina, etanol y ácido úrico) predicen el riesgo de ECV, posibilitando que jóvenes asintomáticos se beneficien de las pruebas de imagen o del tratamiento farmacológico.

Durante los últimos años, la proteómica y la metabolómica han permitido el descubrimiento de un gran número de biomarcadores asociados a diferentes ECV, como también ampliar el conocimiento sobre los mecanismos subyacentes al desarrollo de estas patologías [54, 60–62], incluyendo aterosclerosis [63], síndrome metabólico [64] y síndrome cardiorenal [65]. Un estudio reciente ha identificado una huella multiómica en plasma asociada a la dislipidemia aterogénica compuesta por 15 metabolitos (inhibidores y sustratos de NOS, glutamina, taurina, homocisteína, metionina, 1-metilnicotinamida, alanina e hidroxiprolina) y 9 proteínas (proteína C reactiva, proproteína convertasa subtilisina / kexina tipo 9, apolipoproteína C-III, ICAM-1, angiotensinógeno, paraoxonasa-1, fetuina B, proteína S dependiente de vitamina K y biglicano) [66]. También mediante una aproximación proteómica, se han hallado recientemente 5 proteínas diagnósticas de IAM (antitrombina-III, complemento C3,  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida 1, serotransferrina y catepsina Z) las cuales también sirven como marcadores pronósticos a lo largo de la enfermedad indicando si hay una buena respuesta al tratamiento [67]. Un estudio prospectivo identificó un panel de proteínas de la orina que predice la enfermedad coronaria arterial independientemente de la edad y el sexo en pacientes hipertensos con aterosclerosis [68]. Otro estudio proteómico en orina, en el que se incluyeron 60 pacientes sometidos a una angiografía coronaria electiva para la investigación de la angina estable y 66 pacientes que iban a ser intervenidos para una revascularización coronaria, identificó la asociación del polipéptido CAD238 con la severidad de la enfermedad coronaria arterial [69]. Con el uso de las aproximaciones multiómicas, recientemente se ha descrito una red de interacciones entre el microbioma intestinal, las proteínas GGT, TBIL, T4 y el metaboloma de la orina en la aterosclerosis carotídea [70]. Mediante una aproximación metabolómica, un estudio identificó en la orina 22 biomarcadores potenciales relacionados con hiperlipidemia, relacionados con el metabolismo de aminoácidos, metabolismo de ácidos grasos, metabolismo de nucleótidos, metabolismo de hormonas esteroideas y metabolismo de la flora intestinal, y se determinó que su posible patogénesis estaba relacionada con reacción inflamatoria y estrés oxidativo [71].

Pese a que se han descrito biomarcadores individuales, a menudo el poder diagnóstico de los mismos aumenta sustancialmente cuando se combinan en paneles. Por ejemplo, un estudio que ha identificado un perfil metabólico diferencial compuesto por 28 metabolitos que pueden ser útiles para el diagnóstico eficaz del síndrome coronario agudo, describe diferentes combinaciones de ellos con las que se consigue el mayor valor pronóstico [72]. Del mismo modo se ha identificado un panel de biomarcadores proteicos en sangre recomendado para la predicción, el pronóstico y la prevención personalizados de las complicaciones asociadas con el aneurisma aórtico abdominal [73]. Por otro lado, pese a que algunos marcadores sirvan para la población en general, el uso de algunos de ellos puede estar indicado para, por ejemplo, solo una franja de edad, o presentar umbrales diferentes según el sexo del paciente. En este sentido, un estudio sobre marcadores proteicos de RCV detectó marcadores sólo para hombres o mujeres y otros que sólo funcionaban para sujetos mayores o menores de 63 años. Además, concluía que la combinación de 5 de ellos (hormona T4 libre, glucosa, triglicéridos, HDL y LDL) presentaba una sensibilidad mucho mayor para predecir ECV que la del modelo de biomarcadores individuales [74].

Mediante el uso de aproximaciones proteómicas y metabolómicas, nuestro laboratorio ha identificado previamente potenciales marcadores de patología cardiovascular y enfermedad renal. Identificamos huellas metabólicas específicas en la orina que reflejan el desarrollo de aterosclerosis y síndrome coronario agudo / recuperación del paciente [75], y el RCV de los sujetos con cirugía de *bypass* coronario programada [76]. También hemos identificado alteraciones importantes que ocurren directamente en el tejido arterial con reflejo en plasma mediante MS de imagen o *MSImaging* [77], y huellas moleculares específicas en orina y plasma asociadas al desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos [78–82].

## **6. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN POBLACIÓN JOVEN**

En el escenario actual surge la necesidad de encontrar marcadores que posibiliten la estimación del riesgo total de desarrollar una ECV, de una forma más precisa de la que lo hacen los factores de RCV tradicionales utilizados hasta ahora y que estiman solamente el riesgo de sufrir un evento CV fatal. Además, es necesario identificar marcadores específicos para cada población de edad ya que el uso generalizado parece no ser apropiado para todas ellas. Particularmente, y teniendo en cuenta que la aterosclerosis comienza a edades tempranas de la vida cursando de forma asintomática y silente, es de vital importancia mejorar la estratificación del RCV en población joven, con el objetivo de permitir llevar a cabo las estrategias de prevención más indicadas para cada individuo y de la manera más pronta posible. Por otro lado, y ante la limitación que supone la falta de acceso directo, por ejemplo, a tejido sano y con afectación incipiente por placa de ateroma en individuos asintomáticos, resulta necesario buscar muestras alternativas para la búsqueda de potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas. Por ello, es de especial interés la búsqueda de nuevos marcadores moleculares en fluidos biológicos que permitan un diagnóstico poco o nada invasivo, y que puedan incluso llegar a ser medidos de forma rutinaria en personas sanas durante el momento preclínico de la aterosclerosis. Junto con la sangre, la orina ha demostrado un enorme potencial en el descubrimiento de potenciales marcadores de procesos fisiopatológicos en general [83–86], y relacionados con la ECV en particular [67–69, 71], permitiendo evadir el problema de rango dinámico lineal que presentan las proteínas del plasma y posibilitando la obtención de muestra por un método nada invasivo. Además, teniendo en cuenta que corazón y riñones constituyen un binomio de interacción bidireccional llamado síndrome cardiorrenal, la orina se presenta como una fuente rica de potenciales marcadores de ECV [87].

# Hipótesis

---



Hipotetizamos que el proteoma y el metaboloma de la orina reflejan el RCV mostrando alteraciones que varían a lo largo de la edad y en función del sexo. Particularmente, creemos que la identificación de biomarcadores moleculares en la orina de población joven (30-50 años) podría servir para mejorar la estimación actual del RCV particularmente en esta franja de edad.



# Objetivos

---



## OBJETIVO PRINCIPAL

Teniendo en cuenta el contexto clínico presentado en la introducción de la presente Tesis Doctoral, el objetivo fundamental propuesto para este trabajo fue: **Identificar un perfil molecular en orina que estratifique el RCV en población joven pudiendo complementar los estimadores habituales en la práctica clínica.**

## OBJETIVOS PARTICULARES

Para llevar a cabo el objetivo principal planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar alteraciones proteicas y metabólicas asociadas al RCV y al daño orgánico establecido tras sufrir un evento CV agudo en orina de población joven (30-50 años).
2. Evaluar si esas alteraciones se mantienen o varían en poblaciones de mediana edad (50-70 años) y edad avanzada (>70 años).
3. Identificar un patrón molecular de respuesta al RCV y/o daño orgánico establecido diferencial entre hombres y mujeres.

## OBJETIVO COMPLEMENTARIO

De forma complementaria a nuestro objetivo principal, nos propusimos estudiar un grupo particular de pacientes con elevado RCV como son los pacientes con hipertensión arterial resistente, con el objetivo de identificar un perfil molecular en orina que nos ayude a entender los mecanismos subyacentes de esta patología y a predecir la falta de respuesta a su tratamiento farmacológico (**Anexo 1**).



# Material y Métodos

---



## 1. SELECCIÓN DE PACIENTES

Para llevar a cabo el objetivo principal de esta Tesis Doctoral, se reclutaron un total de 234 sujetos. Con objeto de representar a la población general, se seleccionaron individuos en un amplio rango de edad, posibilitando así el estudio de tres cohortes bien diferenciadas: población joven, población de mediana edad y población de edad avanzada. A su vez, estas cohortes se dividieron en tres grupos atendiendo al RCV: **grupo "Control" (C)**, **grupo de "Riesgo" (R)** y **grupo "Evento" (E)**, utilizando para esta clasificación criterios clínicos definidos tal que reflejen la situación poblacional mayoritaria según su edad, los cuales se detallan a continuación para cada cohorte de estudio.

La cohorte de **POBLACIÓN JOVEN (30-50 años)** fue reclutada por Ibermutuamur (Madrid), incluyendo el número de sujetos por grupo que se detalla: (C)=33, (R)=25, y (E)=25. El grupo control estaba compuesto por sujetos sanos sin medicación. El grupo de riesgo estaba formado por individuos con factores de RCV incluyendo: filtrado glomerular estimado (FGE)  $< 100 \text{ mL/min/1,73 m}^2$  y/o albuminuria (cociente albúmina/creatinina  $> 30 \text{ mg/g}$ ), junto con al menos uno de: hipertensión arterial, tratamiento antihipertensivo, hiperglucemia (glucosa en sangre  $> 110 \text{ mg/dL}$ ) o síndrome metabólico ([88]). El grupo evento incluía pacientes que hubiesen sufrido un ictus o IAM en los 3 años anteriores.

La cohorte de **MEDIANA EDAD (50-70 años)** se reclutó en la Unidad de Hipertensión del Hospital 12 de Octubre (Madrid) incluyendo el número de sujetos por grupo que se detalla: (C)=28, (R)=23, y (E)=25. El grupo control estaba compuesto por individuos con hipertensión arterial; el grupo de riesgo incluía sujetos hipertensos con FGE en el rango de  $20\text{-}60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$  y/o albuminuria definida como en el caso anterior; y el grupo evento incluía pacientes que hubiesen sufrido un ictus o un IAM en los 3 años anteriores.

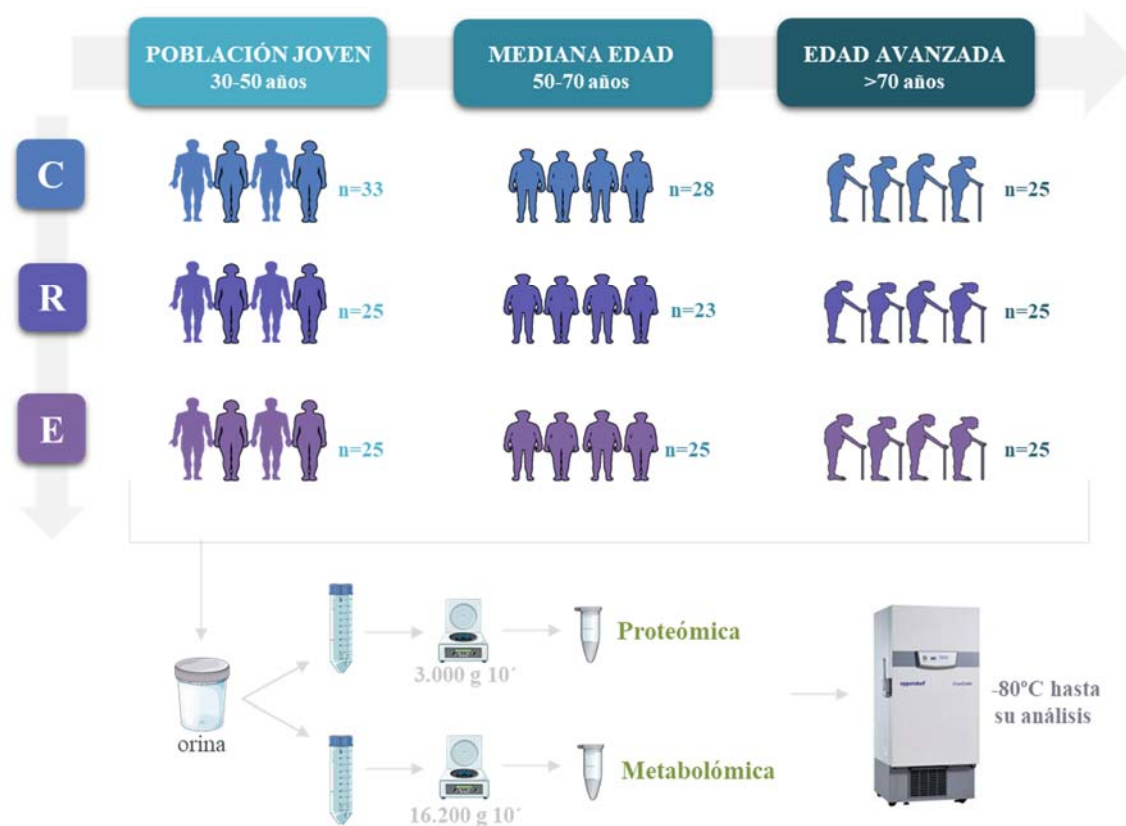
La cohorte de **EDAD AVANZADA (>70 años)** fue reclutada en el Hospital Virgen del Valle (Toledo) incluyendo el número de sujetos por grupo que se detalla: (C)=25, (R)=25 y (E)=25. El grupo control estaba compuesto por individuos con FGE  $> 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ; el grupo de riesgo incluía individuos con FGE en el rango de  $20\text{-}60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ; y el grupo evento incluía pacientes que hubiesen sufrido un ictus o un IAM en los 3 años anteriores.

Todos los sujetos incluidos en el estudio fueron evaluados con historia clínica detallada, examen físico y perfil bioquímico. El riesgo de sufrir un evento CV a lo largo de la vida

o LTR se estimó con la calculadora <https://qrisk.org/lifetime/> (QRISK®). El cálculo del FGE se realizó empleando la ecuación MDRD en <http://www.mdrd.com>. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Ibermutuamur, Hospital 12 de Octubre, Hospital Virgen del Valle y Hospital Fundación Jiménez Díaz, según correspondiese, y se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado por escrito antes de la inclusión.

## 2. RECOGIDA DE MUESTRAS

Siguiendo los protocolos previamente establecidos en nuestro laboratorio, las muestras de orina se recogieron en recipientes estériles y fueron inmediatamente trasladadas desde los diferentes centros hasta el laboratorio de Inmunología y Proteómica del IIS-Fundación Jiménez Díaz. Tal y como se representa en la **Figura 14**, para el análisis proteómico la orina se centrifugó a 3.000 g durante 10 min, y para el metabolómico a 16.200 g durante 10 min, siendo en ambos casos alicuotada y almacenada a -80°C hasta su análisis.



**Figura 14.** Representación de la selección de pacientes, clasificados en función de su edad y riesgo cardiovascular, y de la toma de muestra y su procesamiento. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV.

### 3. ESTRATEGIA MULTIÓMICA DISEÑADA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO ORGÁNICO ESTABLECIDO EN POBLACIÓN JOVEN Y SU EVALUACIÓN A LO LARGO DE LA EDAD

Para la consecución de los objetivos se diseñó una estrategia multiómica compuesta de un estudio proteómico y otro metabolómico, basada en la identificación de perfiles moleculares asociados a RCV o daño orgánico establecido tras sufrir un evento CV agudo en orina de población joven. Ambas aproximaciones incluían en el flujo de trabajo una primera fase de descubrimiento de biomarcadores mediante técnicas de identificación y cuantificación no dirigida (TMT-LC-MS/MS o RMN), seguida de una o varias fases de confirmación mediante técnicas de cuantificación dirigida como ELISA o LC-MS/MS empleando metodología SRM (del inglés, *Selected Reaction Monitoring*), utilizando para ello cohortes de población diferentes en cada caso, tal y como se detalla en la **Figura 15**.

Una vez identificados los marcadores de RCV y daño en población joven, se evaluaron mediante las mismas técnicas de cuantificación dirigida en poblaciones de mediana y avanzada edad para ver si las dianas moleculares alteradas modulan o se mantienen a lo largo de la edad.



**Figura 15.** Flujos de trabajo llevados a cabo durante la aproximación proteómica y metabolómica. RMN: resonancia magnética nuclear, SRM-LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem en modo dirigido, TMT-10plex™-LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con marcaje isobárico TMT™.

## 4. APROXIMACIÓN PROTEÓMICA

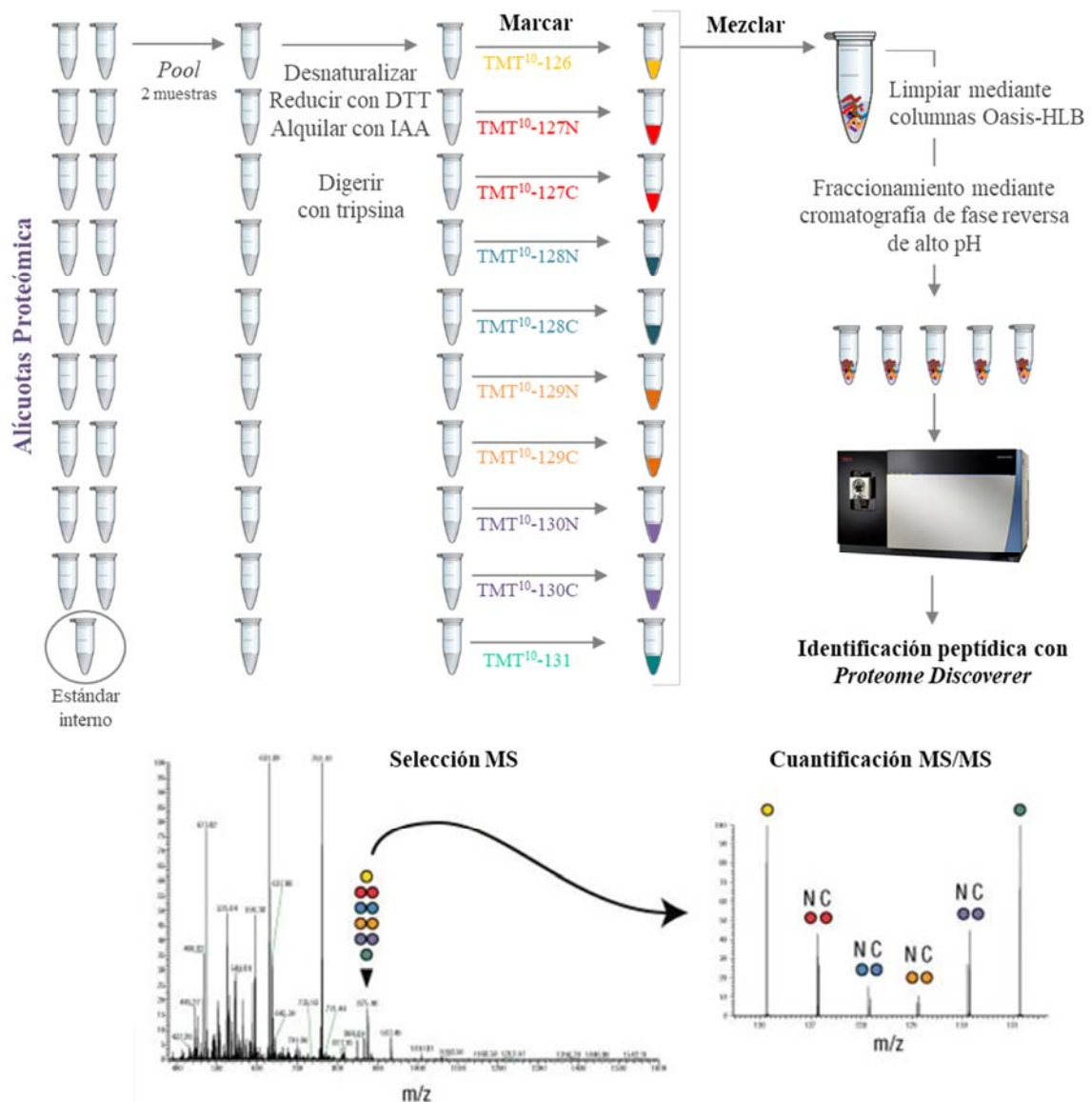
Los objetivos y el flujo de trabajo seguido durante la aproximación proteómica se representan en la **Figura 16** y se detallan a continuación.



**Figura 16.** Representación esquemática de los objetivos y del flujo de trabajo seguidos durante la aproximación proteómica. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. SRM-LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem en modo dirigido, TMT-10plex™-LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con marcaje isobárico TMT™.

#### 4.1. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES PROTEICAS ASOCIADAS A RIESGO CARDIOVASCULAR EN POBLACIÓN JOVEN MEDIANTE ANÁLISIS CUANTITATIVO DIFERENCIAL CON MARCAJE TMT™

El análisis cuantitativo diferencial de las proteínas presentes en la orina de la población joven se llevó a cabo en colaboración con la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). El flujo de trabajo llevado a cabo durante dicho análisis se representa en la **Figura 17**.



**Figura 17.** Representación del flujo de trabajo realizado durante el análisis cuantitativo diferencial de las proteínas presentes en la orina de población joven para cada experimento TMT™. Figura adaptada de Thermo Fisher. DTT: ditioneitol , IAA: iodoacetamida , TMT: Tandem Mass Tag.

#### 4.1.1. Preparación de las muestras y digestión proteica

Durante la fase de descubrimiento se analizó cuantitativamente el proteoma de la orina de 30 sujetos de la cohorte de población joven (n: (C)=10, (R)=8 y (E)=12). Tras cuantificar la proteína total por el método de Bradford, se crearon varios *pools* de 150 µg de proteína que incluían la combinación de 75 µg de proteína de dos individuos del mismo grupo clínico y sexo. En total, se analizaron de 4 a 6 réplicas biológicas de cada grupo clínico: C1-C5, R1-R4 y E1-E6.

Las proteínas se desnaturalizaron añadiendo buffer de lisis (dodecilsulfato sódico (SDS) 2% en Tris-HCl 50 mM pH 7,5) con ditioneitol (DTT) 50 mM con objeto de reducir los puentes disulfuro creados entre los residuos de cisteína, hirviéndolas a 100°C durante 5 min. Tras una incubación de 40 min a 56°C, las muestras se pasaron por filtros de centrífuga de 10 kDa siguiendo las indicaciones del fabricante (NanoSep 10k Omega, Pall Life Sciences) para retirar los restos de DTT. Seguidamente, para bloquear las cisteínas reducidas, las proteínas se alquilaron con iodoacetamida (IAA) 50 mM en una solución de urea 7 M en Tris-HCl 0,1 M a pH 8,5 mediante incubación de 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente. El exceso de agente alquilante y de SDS se retiró mediante 3 lavados con solución de urea 7 M, seguidos de otros 3 lavados adicionales con bicarbonato amónico (AMBIC, del inglés, ammonium bicarbonate) 50mM. Las proteínas se digirieron durante la noche a 37°C con tripsina modificada (Promega) en AMBIC 50 mM a una relación de proteína: tripsina 40:1 (p/p). Los péptidos resultantes se recogieron mediante dos ciclos de centrifugación con AMBIC 50 mM y cloruro de sodio 0,5 M. La mezcla de péptidos se acidificó añadiendo ácido trifluoroacético (TFA) hasta una concentración final del 1% y los péptidos se desalaron en columnas Oasis-HLB (Waters), con posterior evaporación total del disolvente, permaneciendo las muestras a -20°C hasta el marcaje.

#### 4.1.2. Marcaje isobárico mediante TMT™

Para el marcaje se utilizaron 2 *kits* TMT-10plex™ (del inglés, *Tandem Mass Tag*, Thermo Fisher) donde además de los 15 *pools* de muestras (C1-C5, R1-R4 y E1-E6), se añadió un estándar interno (IS, del inglés, *internal standard*) presente en ambos experimentos para poder compararlos entre sí. El IS se formó con una mezcla equitativa de todas las muestras (n=30) y se utilizó como valor de referencia para los análisis cuantitativos. En la versión TMT-10plex™ existen 10 posibles reactivos marcadores que permiten comparar hasta diez muestras (o *pools* de muestras) en el mismo experimento: 126,

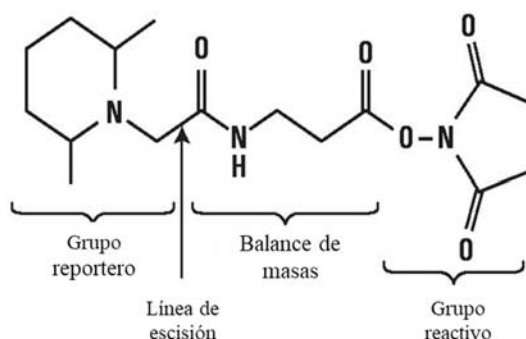
127N, 127C, 128N, 128C, 129N, 129C, 130N, 130C y 131. El diseño experimental utilizado para el marcaje queda reflejado la **Tabla 2**.

**Tabla 2**  
Diseño experimental utilizado para el marcaje isobárico por TMT-10plex™

| Marcador | 126 | 127N | 127C | 128N | 128C | 129N | 129C | 130N | 130C | 131 |
|----------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| TMT 1    | C1  | C4   | –    | R2   | R4   | E2   | E5   | E6   | E1   | IS  |
| TMT 2    | C2  | C3   | C5   | R1   | R3   | –    | –    | E3   | E4   | IS  |

C1-C5: *pooles* del grupo control, R1-R4: *pooles* del grupo factor de riesgo, E1-E6: *pooles* del grupo con evento CV, IS: estándar interno.

Estos reactivos marcadores están formados por un grupo reactivo que se une a grupos amino, un grupo reportero y un grupo de balance de masas (**Figura 18**). El grupo reactivo, que es idéntico en todos los marcadores, reacciona con el grupo amino de los residuos de lisina y el extremo N-terminal de todos los péptidos. El grupo reportero presenta una masa diferente en cada marcador, y el grupo de balance de masas se utiliza para igualar la masa total, de manera que la suma de los pesos moleculares de las tres partes de cada reactivo es constante. De este modo, ya que los diez marcadores reactivos son isobáricamente iguales, los péptidos marcados con cualquiera de ellos tienen el mismo peso molecular y, por tanto, cuando se mezclan en un único tubo se comportan igual desde el punto de vista cromatográfico, se detectan como un pico único en el espectro MS y se fragmentan a la vez.



**Figura 18.** Estructura de los marcadores TMT™.

Durante la fragmentación, el enlace entre el grupo reportero y el grupo balance de masas se rompe fácilmente, por lo que en los espectros MS/MS en la zona de bajo peso molecular se detectan diez iones diferentes correspondientes a las masas de los diez grupos reporteros, mientras que en la zona de más alto peso molecular se detecta una secuencia única igual para las diez muestras. La intensidad de dichos iones permite la cuantificación relativa de las diez especies marcadas, mientras que la secuencia permite la identificación del péptido.

Para un marcaje isobárico estable, los péptidos trípticos resultantes se disolvieron en tampón bicarbonato de trietilamonio (TEAB) 100 mM. Tras determinar la concentración de péptidos midiendo los enlaces amida con el sistema Direct Detect (Millipore), se marcó la misma cantidad de péptidos de cada muestra utilizando los reactivos TMT-10plex™ de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una vez parada la reacción, se mezclaron todas las muestras marcadas en un único tubo (por cada *kit*) y se realizó otro paso de limpieza mediante columnas Oasis-HLB. Para aumentar la cobertura del proteoma e incrementar el número de identificaciones, las muestras marcadas con TMT™ se dividieron en 5 fracciones mediante cromatografía de fase reversa de alto pH (*kit* de fraccionamiento de péptidos en fase reversa de alto pH, Pierce) y se concentraron nuevamente por evaporación del disolvente hasta sequedad, permaneciendo a -20°C hasta su análisis.

#### **4.1.3. Identificación y análisis mediante LC-MS/MS**

Los péptidos marcados se solubilizaron en solución de carga (acetonitrilo (ACN) 2% en TFA 0,2%) y se inyectaron en el sistema LC-MS/MS utilizando una nano-columna C-18 de fase reversa (75 µm I.D. x 50 cm, 2 µm particle size, Acclaim PepMap RSLC, 100 C18; Thermo Fisher) en un gradiente continuo de ACN compuesto de diferentes etapas: 0-30% B en 360 min, 30-90% B en 3 min (A=ácido fórmico 1%; B=ACN 90%, ácido fórmico 1%). Se utilizó una velocidad de flujo de 200 nL/min para la elución de los péptidos de la nano-columna a una aguja de “nano-spray” emisora para la ionización en tiempo real y fragmentación del péptido en un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion (Thermo Fisher).

Para la identificación peptídica, los espectros se analizaron con Proteome Discoverer (versión 2.1.0.81, Thermo Fisher Scientific) utilizando SEQUEST-HT (Thermo Fisher Scientific). Para las búsquedas en la base de datos de UniProt que contiene todas las secuencias de humanos y contaminantes (14 de mayo de 2016; 70611 entradas), los parámetros se seleccionaron de la siguiente manera: digestión con tripsina con un máximo

de 2 puntos de corte no efectuados permitidos; tolerancia de masa de 2 Da para precursores y 0,02 Da para fragmentos; carbamidometil cisteína y modificaciones TMT™ en N-terminal y residuos de Lys como modificaciones fijas, y oxidación de metionina como modificación variable.

La identificación de péptidos se realizó mediante el método de razón de probabilidades [89]. La tasa de falsos positivos (FDR) se calculó utilizando bases de datos invertidas, y el método refinado [90] con un filtrado adicional para la tolerancia de la masa del precursor de 15 ppm [91]. Solamente se consideraron los péptidos identificados con un FDR igual o inferior al 1% para cuantificar la abundancia relativa de cada proteína a partir de las intensidades de los iones reporteros. El análisis estadístico de los datos cuantitativos se realizó utilizando el modelo estadístico WSPP [92, 93]. En este modelo, las relaciones log<sub>2</sub> de proteínas se expresan como variables estandarizadas, es decir, en unidades de desviación estándar de acuerdo con sus varianzas estimadas (valores  $Zq$ ).

#### **4.2. SELECCIÓN DE PROTEÍNAS CANDIDATAS A BIOMARCADOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR O DE DAÑO EN POBLACIÓN JOVEN**

Con objeto de identificar marcadores de RCV o daño, válidos para la población joven de ambos sexos, este análisis se centró en aquellas proteínas que mostraban alteraciones comunes en hombres y mujeres. Atendiendo a criterios de sensibilidad y robustez, se seleccionaron las proteínas que habían sido identificadas con al menos dos péptidos únicos en ambos experimentos de TMT™ y que mostraban niveles homogéneos entre las réplicas biológicas de cada grupo clínico (C, R y E). Tras calcular un valor promedio  $Zq$  para cada grupo clínico (correspondiente a la media de los valores  $Zq$  de sus réplicas biológicas), se consideraron proteínas diferencialmente expresadas aquellas que mostraban diferencias de  $Zq$  entre grupos  $\geq |1,5|$  (prueba t de Student,  $p < 0,05$ ).

### **4.3. IDENTIFICACIÓN DE CATEGORÍAS FUNCIONALES ALTERADAS POR RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO EN POBLACIÓN JOVEN MEDIANTE ANÁLISIS DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS**

#### **Análisis cuantitativo de las proteínas identificadas mediante SBT**

El análisis del conjunto de proteínas identificadas y cuantificadas se realizó mediante un novedoso algoritmo, el sistema de biología triangular (SBT), desarrollado específicamente para el análisis de respuestas de proteínas coordinadas en experimentos de proteómica cuantitativa de alto rendimiento [92]. Este algoritmo correlaciona el comportamiento de un grupo de proteínas dentro de una categoría (proceso biológico) en términos de su abundancia relativa. Es por ello que los cambios pueden detectarse en procesos biológicos funcionales mucho más allá de las respuestas de las proteínas a nivel individual y aun cuando ninguna de ellas presente una variación individual significativa entre grupos. Como resultado de este comportamiento coordinado, se asigna un valor  $Z$  a cada categoría ( $Z_{cat}$ ). Para identificar los procesos biológicos significativamente alterados en función del RCV o del daño, se calculó el valor promedio  $Z_{cat}$  para cada categoría funcional en cada grupo clínico. Tras realizar las comparaciones intergrupales (R vs C, E vs R y E vs C), se seleccionaron aquellas que mostraban diferencias significativas entre los grupos (prueba t de Student,  $p < 0,05$ ). Las variaciones en la abundancia de categorías funcionales anotadas se visualizaron comparando los gráficos de frecuencia acumulada (sigmoide) de la variable estandarizada con la de la distribución normal [93].

### **4.4. IDENTIFICACIÓN DE DIFERENCIAS ENTRE EL PROTEOMA DE HOMBRES Y MUJERES DE POBLACIÓN JOVEN Y SU RESPUESTA AL RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO**

Paralelamente se realizó un estudio con el objetivo de determinar si existen diferencias entre el proteoma de la orina de hombres y de mujeres pertenecientes al mismo grupo clínico (C, F y E) y, además, evaluar si sus proteomas se ven alterados de forma diferente como consecuencia del RCV o daño orgánico establecido tras sufrir un evento CV agudo (variación intergrupar). Para ambos objetivos, se reanalizó el total de proteínas previamente identificadas mediante TMT-10plex™-LC-MS/MS, considerando esta vez durante los análisis a hombres y mujeres como poblaciones independientes. Del mismo modo que cuando se estudió en la población conjunta, la diferencia significativa se asumió como una variación de  $Z_q \geq |1,5|$  entre los valores promedio de  $Z_q$  de los grupos comparados en cada caso (prueba t de Student,  $p$  valor  $< 0,05$ ), aunque en esta ocasión,

se incluyeron para el análisis todas las proteínas que hubiesen sido identificadas por 2 péptidos en al menos un experimento TMT™.

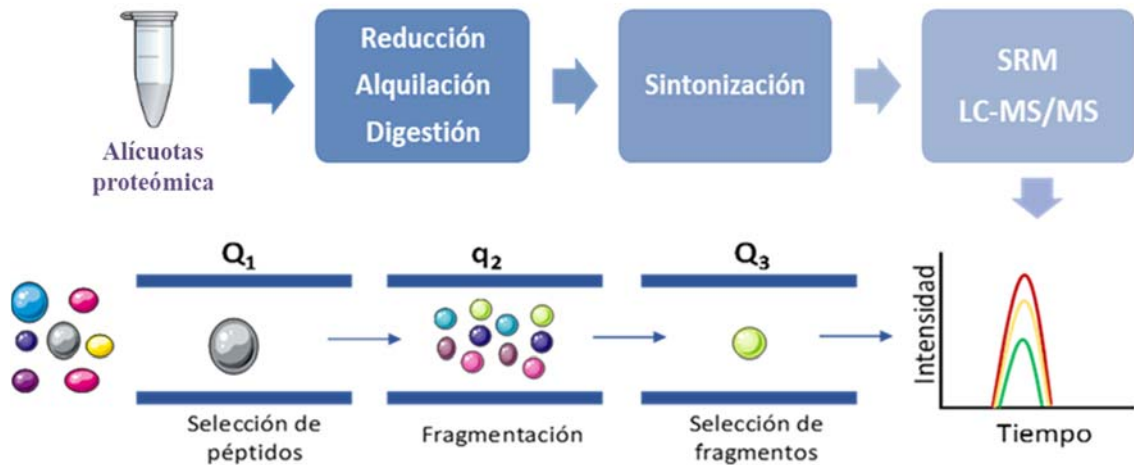
#### **4.5. CONFIRMACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DIRIGIDA DE UN PANEL DE PROTEÍNAS SELECCIONADAS COMO CANDIDATAS A MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN POBLACIÓN JOVEN**

Como se detallaba en la **Figura 16**, tras identificar las alteraciones proteicas significativas asociadas a RCV durante la fase de descubrimiento, se llevó a cabo una primera fase de confirmación de proteínas diana seleccionadas como posibles marcadores de RCV en población joven. Las técnicas empleadas para dicha confirmación fueron SRM-LC-MS/MS y ensayos ELISA, utilizando en ambos casos cohortes de población joven diferentes a la utilizada durante el descubrimiento e incluyendo también a ésta durante el análisis.

##### **4.5.1. Análisis mediante SRM-LC-MS/MS**

Para este análisis por SRM-LC-MS/MS se incorporaron 44 sujetos (n: (C)=15, (R)=16 y (E)=13) a la cohorte reclutada para la fase de descubrimiento (n: (C)=10, (R)=8 y (E)=12), llevando a cabo el análisis en un total de 74 individuos jóvenes (n: (C)=25, (R)=24 y (E)=25).

El método de SRM requiere la selección previa de péptidos proteotípicos (específicos de cada proteína) y transiciones (masa del ión precursor → masa del ión fragmento) pertenecientes a las proteínas de interés. El espectrómetro de masas triple cuadrupolo empleado permite un doble filtrado de las masas: en el primer cuadrupolo (Q1) se seleccionan las masas precursoras correspondientes a los péptidos de interés, que serán fragmentados en el siguiente compartimento (Q2) dando lugar a iones producto que serán filtrados en un tercer cuadrupolo (Q3) donde serán analizados. Este sistema proporciona una alta reproducibilidad, sensibilidad y especificidad en el análisis. El flujo de trabajo realizado en el análisis mediante SRM queda resumido en la **Figura 19**.



**Figura 19.** Flujo de trabajo realizado durante el análisis por SRM durante la primera fase de confirmación.

#### 4.5.1.1. Preparación de las muestras y digestión proteica

La cantidad de proteína total en cada muestra se cuantificó en el servicio de Análisis Clínicos de la Fundación Jiménez Díaz. A estas muestras se sumaron 5 blancos constituidos por agua Milli-Q que fueron tratados como una muestra más durante todo el proceso hasta el momento del análisis cromatográfico.

Para cada muestra y de forma individual, se seleccionó el volumen de orina equivalente a 30  $\mu\text{g}$  de proteína total, se concentró en filtros de centrifuga de 3 kDa (Amicon Ultra Centrifugal Filters 3kDa, Millipore), se mezcló con AMBIC 50 mM hasta un volumen final de 80  $\mu\text{L}$  y se sometió a un proceso de desalación mediante columnas centrífugas Pierce™ siguiendo el protocolo de la casa comercial (Thermo Scientific). Posteriormente, las muestras se redujeron con DTT 100 mM durante 30 min a 37°C en agitación y se alquilaron con IAA 550 mM durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las proteínas se digirieron durante la noche a 37°C con tripsina bovina modificada (Roche) previamente reconstituida con ácido fórmico 0,01% en agua Milli-Q 1:1 (p/v), en una proporción de proteína:tripsina 30:1 (p/p). Las soluciones de péptidos tripticos se limpiaron con columnas C18 (Protea Biosciences) según las instrucciones del fabricante y se mezclaron 1:1 con fase móvil (ácido fórmico 0,1% en agua Milli-Q). Por último, se trasvasaron a viales de vidrio específicos para análisis LC-MS/MS manteniéndose a 4°C hasta su inyección en el equipo y durante el análisis.

#### 4.5.1.2. Digestión *in silico* y sintonización

Para seleccionar las transiciones a medir de cada proteína, se llevó a cabo una digestión *in silico* empleando el programa Skyline (v.1.1.0.2905). Para ello se simuló una digestión con tripsina obteniendo así las masas precursoras de todos los péptidos trípticos posibles de cada proteína junto con sus fragmentos derivados. La especificidad de cada uno de los péptidos para cada proteína se confirmó mediante el uso del programa Blast® (Basic Local Alignment search tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tras seleccionar únicamente los péptidos proteotípicos y con objeto de optimizar la elección de las transiciones, se aplicaron unos criterios teóricos descritos en la bibliografía [94]:

- Evitar péptidos muy hidrofílicos, que no se retienen bien en la columna, o muy hidrofóbicos, que se retienen demasiado.
- Buena eficiencia de ionización.
- Relación m/z comprendida dentro del rango de análisis del cuadrupolo.
- Buena solubilidad tras la digestión.
- Evitar péptidos con aminoácidos susceptibles de ser modificados químicamente (metionina, triptófano, asparagina seguida de glicina o prolina y glutamina en el N-terminal).
- Evitar péptidos que contengan dos aminoácidos básicos contiguos ya que son susceptibles de ser un sitio de escisión errónea.

Una vez concluido el proceso de selección teórica de las transiciones se llevó a cabo una prueba de sintonización con medida de todas ellas en muestras “reales” de orina y en el mismo equipo que después se usaría para el ensayo SRM-LC-MS/MS. Durante el análisis se optimizaron las condiciones de medida de cada transición (energía de colisión y voltaje de fragmentación). Para ello se analizaron 3 *pools* de muestras de orina representativos de cada grupo clínico: *pool C*, *pool R* y *pool E* (compuesto cada uno de ellos por 30 µg de proteína total: mezcla de 10 µg de proteína de 3 sujetos). Finalmente, se eligieron aquellas transiciones que mostraban la mayor intensidad y mejor forma de pico, y la mejor relación señal/ruido, junto con sus condiciones de medida óptimas las cuales se muestran en resultados.

#### 4.5.1.3. Análisis dirigido por SRM-LC-MS/MS

Las muestras se analizaron en un triple cuadrupolo 6460 QQQ (Agilent Technologies) disponible en nuestro laboratorio de la Fundación Jiménez Díaz, acoplado en línea a un

sistema nanoLC (1200 Series, Agilent Technologies) con configuración en formato Chip (interfaz ChipCube, Agilent Technologies). La separación de péptidos se llevó a cabo en un chip ProtID Zorbax 300B-C18-5  $\mu\text{m}$  con una columna analítica de  $43 \times 0,075$  mm y una columna de enriquecimiento de 40 nL (Agilent Technologies). Se inyectaron 2  $\mu\text{L}$  de muestra a 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  y la separación se realizó a 0,4  $\mu\text{L}/\text{min}$  en un gradiente de ACN combinando diferentes proporciones de fase A (ácido fórmico 0,1% en agua Milli-Q) y fase B (ácido fórmico 0,1% en ACN) tal y como se detalla: 1) 0–3 min 5% B, 2) a 10 min 70% B, 3) a 12 min 95% B, 4) a 14 min 95% B, 5) 14,2-15 min 5% B. Se analizaron las transiciones previamente seleccionadas con la energía de colisión previamente optimizada para cada una de ellas. El potencial fragmentador se ajustó a 130 V, el tiempo de permanencia a 20 ms y el voltaje multiplicador delta EMV a 600 V. El sistema fue controlado mediante el software de adquisición y análisis de datos MassHunter (Agilent Technologies (v4.01)). En la secuencia de análisis se programaron 2 medidas de cada muestra (réplicas técnicas) intercalando entre ellas inyecciones de ACN para asegurar una limpieza óptima del sistema.

#### 4.5.1.4. Análisis estadístico

Los cromatogramas se analizaron mediante el software MassHunter (Agilent Technologies v4.01), integrando las señales cromatográficas para cada transición monitorizada de cada péptido y cuantificando así el área de los picos para la posterior comparación entre los diferentes grupos clínicos. Al área de pico de cada una de las muestras clínicas se restó la media del área del mismo pico presente en los 5 blancos analizados durante la secuencia. El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism (v.6.01). El método ROUT se aplicó para detectar valores atípicos basados en el FDR, estableciendo el valor Q en 5% (detección de *outliers*). Las comparaciones intergrupales se realizaron mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney (nivel de confianza del 95%). Las curvas ROC univariantes y multivariantes se calcularon con el servidor web Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) mediante validación cruzada de Monte Carlo (MCCV) utilizando submuestreo y seleccionando Random Forest como método de clasificación. Concretamente, en cada MCCV, dos tercios (2/3) de las muestras se utilizan para evaluar la importancia de la característica y las características más importantes son entonces utilizadas para construir modelos de clasificación que luego se validan en el 1/3 restante de las muestras. Este procedimiento se repitió varias veces para calcular el rendimiento y la confianza intervalo de cada

modelo. El análisis de correlación de Spearman entre los valores individuales de LTR y cada proteína se realizó mediante el software GraphPad Prism (v.6.01).

#### **4.5.2. Análisis mediante ELISA**

Los análisis de confirmación por ELISA se realizaron empleando muestras de los grupos control y de RCV, utilizando para ello la misma cohorte de población analizada en la fase de confirmación por SRM-LC-MS/MS, e incorporando 5 sujetos nuevos al grupo control (n: (C)=30 y (R)=24).

Los experimentos se llevaron a cabo con muestras individuales (*no pools*) siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso: kit Human GDF-15 ELISA Kit (Abcam), Human RNASE3/ECP ELISA Kit (Elabscience) and Human Guanine Deaminase (GDA) ELISA Kit (Elabscience). Se realizaron pruebas previas para encontrar la dilución idónea tal y como se detalla en resultados. El análisis estadístico y la evaluación del potencial diagnóstico se realizaron del mismo modo que el descrito en el apartado 4.5.1.4.

#### **4.6. CONFIRMACIÓN MEDIANTE CUANTIFICACIÓN DIRIGIDA DE UN SEGUNDO PANEL DE PROTEÍNAS SELECCIONADAS COMO CANDIDATAS A BIOMARCADOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO EN POBLACIÓN JOVEN Y EVALUACIÓN DE LAS MISMAS A LO LARGO DE LA EDAD**

Tras la primera fase de confirmación, se llevó a cabo una segunda selección de proteínas diana asociadas a RCV o daño orgánico para confirmar su alteración en población joven y, simultáneamente, evaluarlas en cohortes de mayor edad. Los criterios de selección se detallan en resultados.

Este estudio se hizo en colaboración con la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, donde se llevó a cabo un análisis por SRM-LC-MS/MS en un equipo AB Sciex QTRAP 5500, incluyendo en este caso marcaje isotópico.

##### **4.6.1. Preparación de las muestras y digestión proteica en gel**

Para el análisis se incorporaron todas las muestras disponibles de las 3 cohortes de edad, incluyendo en el caso de población joven las previamente utilizadas durante la fase de descubrimiento y primera fase de confirmación. En total, se analizó la orina de 234 sujetos: 83 jóvenes (n: (C)=33, (R)=25 y (E)=25), 76 de mediana edad (n: (C)=28, (R)=23 y (E)=25) y 75 de edad avanzada (n: (C)=25, (R)=25 y (E)=25).

Se seleccionaron 50 µg de cada muestra (por duplicado), se mezclaron con tampón de carga SDS-PAGE (Tris-base 30 mM, SDS 10%, glicerol 50%, 2-mercaptoetanol 2,5 M y trazas de colorante azul de bromofenol) y se corrieron en geles de acrilamida con electroforesis SDS-PAGE a 100 V hasta que el frente recorrió unos 2 cm de gel concentrador en tampón Laemmli (Tris-base 25 mM, glicina 200 mM y SDS 0,1%). Después de la electroforesis, las proteínas se fijaron a los geles con metanol 50% y ácido fosfórico 2% durante 30 min. Tras un lavado con agua destilada, los geles se equilibraron con metanol 33%, ácido fosfórico 3% y sulfato de amonio 17% durante 40 min, procediendo a su tinción con una solución de azul brillante de Coomassie G-250. Tras incubar durante la noche, se realizaron lavados sucesivos y se escindieron las bandas de proteína correspondientes, se cortaron en varias piezas y se transfirieron a tubos de 1,5 mL. Después de una incubación de 5 min en ACN, los geles se rehidrataron con AMBIC 25 mM durante 5 min y se secaron de nuevo con ACN. Las proteínas se redujeron con DTT 10 mM durante 30 min a 56°C y, tras lavar con ACN, se alquilaron con IAA 25 mM durante 15 min en oscuridad. Tras dos ciclos de desecación-rehidratación con ACN/AMBIC, los geles se secaron al vacío durante 40 min y las proteínas se digirieron durante la noche a 37°C con tripsina modificada en AMBIC 50 mM a una relación de proteína:tripsina 50:1 (p/p). Finalmente, los péptidos trípticos obtenidos se transfirieron a otro tubo y el gel se trató de nuevo con ACN 80% y TFA 0,1% para completar la extracción y asegurar un rendimiento óptimo de la digestión. El volumen de la disolución peptídica se evaporó hasta sequedad y los péptidos fueron resuspendidos en fase móvil (20 µL de ACN 2% con ácido fórmico 0,1%) manteniéndose a 4°C hasta su inyección en el equipo y durante el análisis.

#### **4.6.2. Digestión *in silico* y sintonización**

Tras llevar a cabo una digestión *in silico* empleando el programa Skyline (v.1.1.0.2905), se seleccionaron los péptidos proteotípicos en el propio software, confirmando la selección mediante el uso del programa Blast®. Entre ellos, se eligieron aquellos que podían ser detectables por el espectrómetro de masas AB Sciex QTRAP 5500, recurriendo para ello a la base de datos SRMATlas (<http://www.srmatlas.org/#>). Además, siempre que fue posible se seleccionaron péptidos que cumplieran las características previamente descritas en el apartado 4.5.1.2. La elección de las transiciones a medir para cada péptido se hizo de forma experimental tal y como se detalla a continuación en el apartado 4.6.3.

#### 4.6.3. Adición de péptidos sintéticos con marcaje isotópico

Para mejorar la precisión en la cuantificación de los péptidos seleccionados en este caso, se añadieron los péptidos de interés marcados isotópicamente a cada una de las muestras digeridas, con objeto de usarlos como estándar interno de referencia. De este modo, tanto el péptido endógeno como su homólogo marcado mostrarían el mismo tiempo de retención, aunque con una masa distinta, lo que permitiría normalizar los datos cuantitativos entre los análisis y asegurar que el péptido cuantificado correspondía al endógeno.

Los péptidos sintéticos empleados con marcaje pesado no purificado fueron suministrados por el Centro Nacional de Biotecnología (Madrid), previa confirmación por MALDI-TOF/TOF (AB Sciex 4800 plus) de su secuencia y de la presencia de la etiqueta C-terminal (Arginina +10 Da, Lisina +8 Da). Para ello, se depositó 1  $\mu$ L de una disolución de cada péptido sintético en ACN 2% y TFA 0,1% sobre la placa y se cubrió con 0,15  $\mu$ g de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) como matriz. El espectrómetro MALDI-TOF/TOF se operó en modo de reflector positivo y los espectros de MS/MS obtenidos se analizaron empleando la base de datos Swiss-Prot para humano, utilizando MASCOT como motor de búsqueda.

#### 4.6.4. Análisis dirigido por SRM-LC-MS/MS

Una vez confirmada la secuencia de los péptidos sintéticos, se analizaron por SRM-LC-MS/MS varias diluciones de una mezcla de todos los péptidos sintéticos en un *pool* de muestras del estudio con la finalidad de definir los tiempos de retención, las transiciones más intensas de entre las previamente seleccionadas y, si era posible, obtener un espectro de MS/MS para confirmar el pico seleccionado. Esta información se empleó para construir la tabla de precursores/transiciones para la detección de los péptidos sintéticos y endógenos en un mismo análisis de SRM-LC-MS/MS tal y como se muestra en el apartado de resultados. Además, la cantidad de cada péptido sintético se ajustó, en la medida de lo posible, para obtener una señal similar a la observada en el péptido endógeno.

El análisis mediante SRM-LC-MS/MS de los péptidos endógenos y los péptidos sintéticos empleados como estándar interno se realizó en un instrumento AB Sciex QTRAP 5500 dotado con una fuente de nano spray ESI, previa separación cromatográfica en un sistema nano HPLC (Eksigent nanoLC 1D plus). Primeramente, los péptidos se concentraron en una columna de atrapamiento (Eksigent nanoLC trap) durante 5 min a

un flujo de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  de ACN 2% y ácido fórmico 0,1%, antes de su separación en una columna analítica de 15 cm (Eksigent nanoLC column 3C18-CL) en gradiente de ACN (5-35% en 30 min) a 300 nL/min y en un sistema termostatzado a 50°C para garantizar la mínima variabilidad en los tiempos de retención.

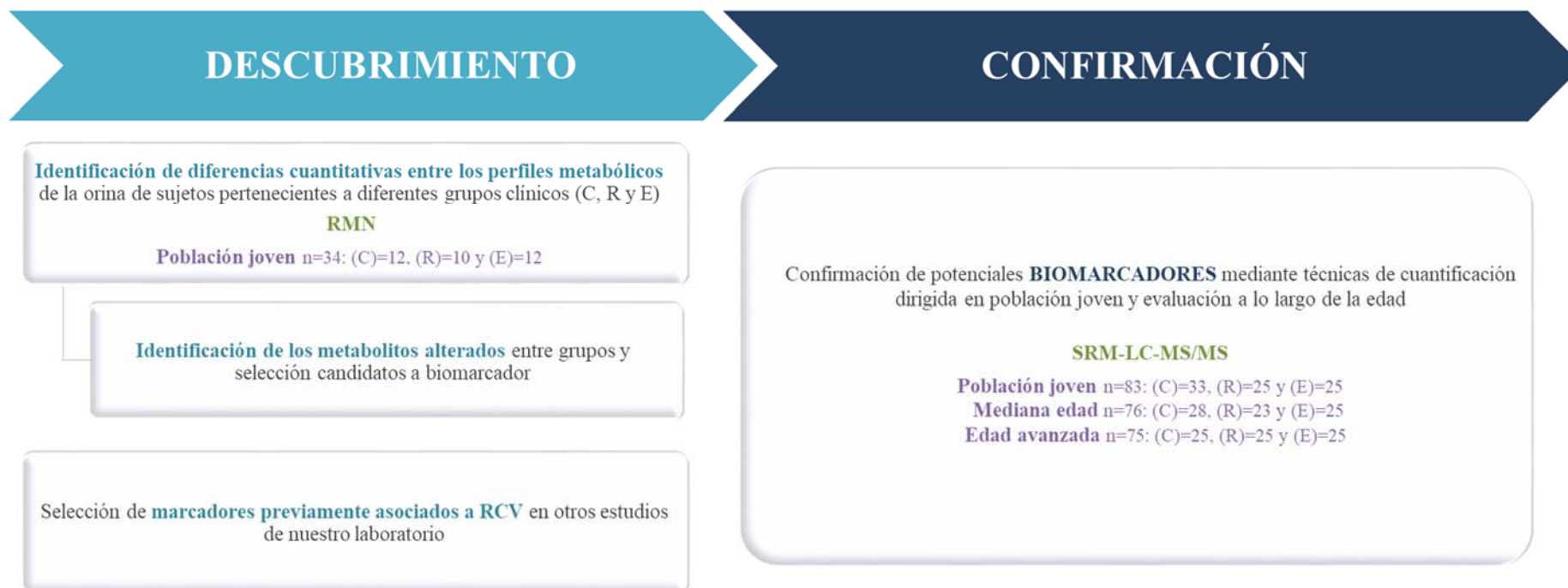
Para optimizar el análisis se trabajó en modo *Schedule* monitorizando cada péptido en ventanas de 4 min de margen respecto al tiempo de retención, lo que limita el número de precursores coincidentes y mejora la calidad de la señal del péptido respecto al ruido.

#### **4.6.5. Análisis estadístico**

Los datos crudos generados se analizaron con el software Skyline (v.1.1.0.2905). La selección del pico cromatográfico correspondiente a cada pareja de péptido sintético y endógeno se revisó manualmente comprobando tanto su coelución como la igual distribución de intensidades relativas de las señales correspondientes a los distintos fragmentos y descartando aquellas transiciones que mostraban algún tipo de interferencia, ya fuese en el péptido sintético o en el endógeno. El *software* calcula automáticamente el área de intensidad de cada pico y proporciona la relación de endógeno *vs* precursor sintético (*ratio to standard*). Esta relación se usó para comparar la cantidad de péptido endógeno entre muestras, llevando a cabo el análisis estadístico mediante el software GraphPad Prism (v.6.01). Para ello se aplicó el método ROUT para detectar valores atípicos basados en el FDR, estableciendo el valor Q en 5%. Las comparaciones intergrupales se realizaron mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney (nivel de confianza del 95%).

## 5. APROXIMACIÓN METABOLÓMICA

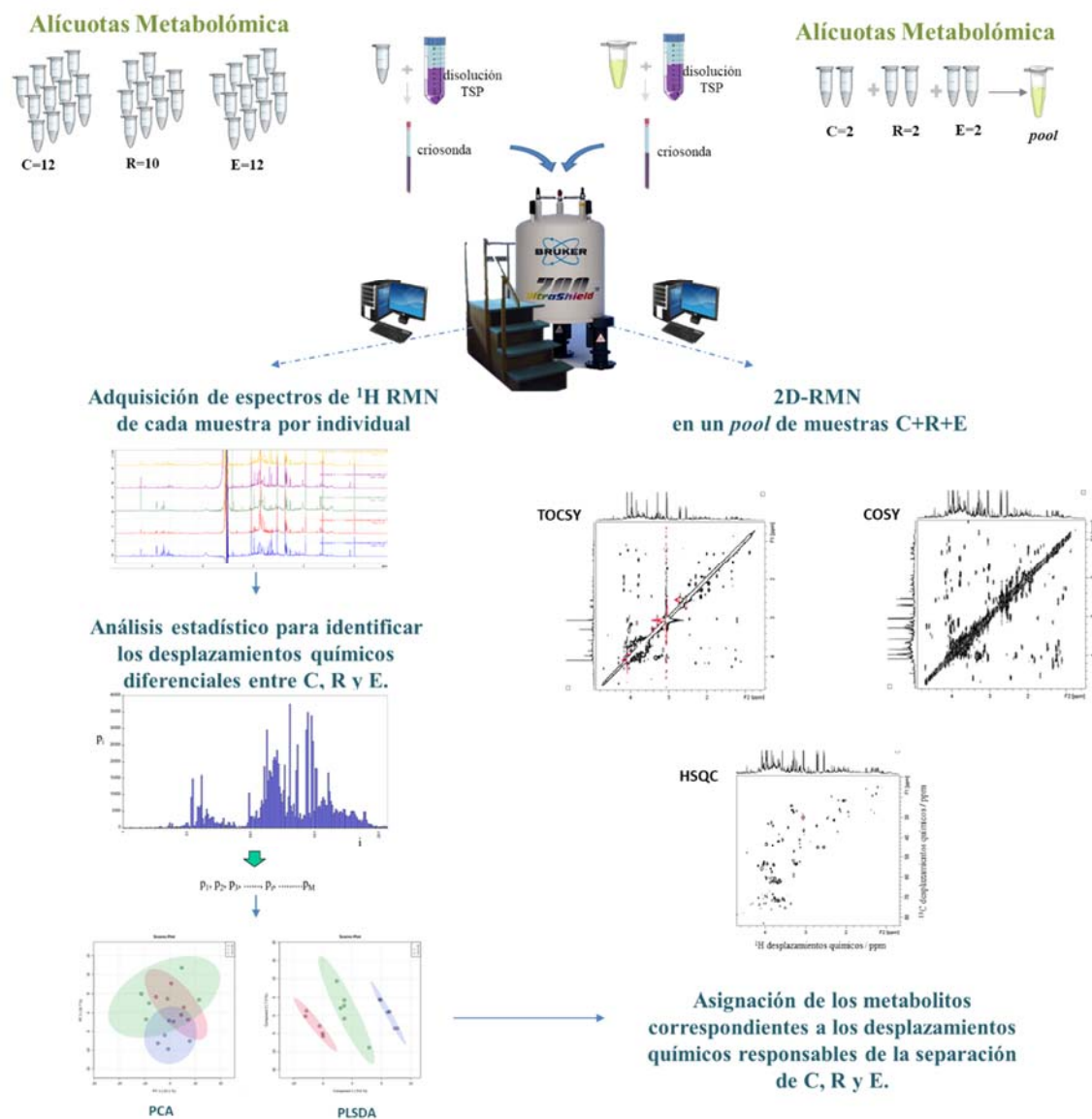
Los objetivos y el flujo de trabajo seguido durante la aproximación metabolómica se representan en la **Figura 20** y se detallan a continuación.



**Figura 20. Representación esquemática del flujo de trabajo seguido durante la aproximación metabolómica.** C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. RMN: resonancia magnética nuclear, SRM-LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem en modo dirigido.

### 5.1. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES ASOCIADAS A RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO EN EL PERFIL METABÓLICO DE LA ORINA EN POBLACIÓN JOVEN MEDIANTE ANÁLISIS CUANTITATIVO DIFERENCIAL POR RMN

La fase de descubrimiento de metabolitos diferenciales se llevó a cabo mediante RMN, utilizando para ello 34 sujetos de la cohorte de población joven (n: (C)=12, (R)=10 y (E)=12). El análisis de RMN se llevó a cabo en colaboración con el Centro de Apoyo a la Investigación de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Complutense de Madrid (CAI-RMN UCM). La **Figura 21** muestra un resumen del proceso.



**Figura 21.** Representación del flujo de trabajo llevado a cabo durante la identificación de diferencias cuantitativas entre los perfiles metabólicos de los diferentes grupos clínicos. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. TSP: 3-trimetilsilil [2,2,3,3-2H] propionato sódico.

### 5.1.1. Preparación de muestras y adquisición de espectros de $^1\text{H}$ RMN

En los experimentos de RMN se utilizaron tubos de 5 mm de diámetro interno en los que se dispusieron volúmenes óptimos de muestra (i.e. 600  $\mu\text{L}$ ). Para ello, se diluyeron 300  $\mu\text{L}$  de cada muestra con 300  $\mu\text{L}$  de una disolución de TSP (3-trimetilsilil [2,2,3,3-2H] propionato sódico, Sigma) 0,01 mM, preparada en  $\text{D}_2\text{O}$  (óxido de deuterio 99,9%, Merck) tamponada a pH 7,0 con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (200 mM, cada uno), con objeto de compensar las posibles variaciones de pH entre las diferentes muestras de orina que pudieran afectar a los desplazamientos químicos registrados. El TSP se utilizó como referencia interna en el posterior ajuste de los espectros.

Los experimentos de RMN se realizaron en un equipo de alto campo Bruker AVANCE III 700, provisto de criosonda, utilizando para la excitación y el registro espectral una sonda TCI de 5mm equipada con bobina de gradientes en el eje Z, y operando a una frecuencia de 700,17 MHz para  $^1\text{H}$ . Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se registraron a 278K, acumulando 256 adquisiciones de 32K puntos, sobre un ancho espectral de 11261,262 Hz, lo que resultó en tiempos de adquisición de 1,4549 s. Para asegurar la relajación T1 entre adquisiciones sucesivas, se emplearon valores de RD (del inglés, *relaxation delay*) de 2 s. La señal del  $\text{H}_2\text{O}$  se suprimió utilizando la secuencia de pulsos noesypr1d (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*, Bruker Biospin Ltd), con tiempo de saturación del  $\text{H}_2\text{O}$  d1 de 2 s y tiempo de mezcla d8 de 150 ms. Todos los espectros fueron adquiridos y procesados utilizando el programa TOPSPIN (versión 3.2, Bruker Biospin Ltd.). Antes de la transformación de Fourier, las FID eran multiplicadas por una función de peso exponencial correspondiente a un ensanchamiento de línea de 0,3 Hz. El procesamiento final de los espectros incluyó la corrección de fase, y de la línea base, y el referenciado del singlete del TSP a 0 ppm.

### 5.1.2. Análisis estadístico de los datos de $^1\text{H}$ RMN

Antes de comparar los espectros de los diferentes grupos clínicos se hizo un estudio de homogeneidad intragrupo, eliminando aquellos espectros que visualmente resultasen atípicos. El análisis estadístico de los espectros seleccionados se llevó a cabo utilizando el programa AMIX (versión 3.9.15, Bruker Rheinstetten, Germany). Para ello, las regiones individuales del espectro se normalizaron en base a la intensidad total del espectro excluyendo la señal del agua (de 4,75 a 5,25 ppm). Cada espectro se segmentó en regiones de 0,04 ppm de anchura resultando en una ventana espectral analizada de 10,00 ppm a 5,25 ppm y de 4,75 ppm a 0,1 ppm. Posteriormente, se llevó a cabo una

búsqueda de variables discriminantes significativas (intervalo de confianza del 90%). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (PLS-DA), normalizando en ambos casos por “*Auto scaling*”, para dar el mismo peso a las señales más y menos abundantes, utilizando para todo ello el servidor web Metaboanalyst. A continuación, se procedió a la identificación de los metabolitos correspondientes a los desplazamientos químicos responsables de la separación de grupos ( $p$  valor  $< 0,05$ ).

### 5.1.3. Identificación de metabolitos mediante RMN bidimensional

Para lograr una identificación inequívoca de los metabolitos evitando errores asociados a la existencia de solapamientos de señales en RMN monodimensional, se llevó a cabo un experimento de 2D-RMN de correlación COSY, TOCSY y HSQC. Durante el análisis se empleó una mezcla equitativa de 6 de las orinas (n mujeres: C=1, R=1 y E=1; n hombres: C=1, R=1 y E=1) procesadas del mismo modo que para la adquisición de espectros de  $^1\text{H}$  RMN. El espectro COSY se adquirió utilizando la secuencia *cosydfesgpph* (2D *homonuclear shift correlation*; Bruker Biospin Ltd) que lleva a cabo la presaturación de agua empleando pulsos selectivos y gradientes. Los parámetros de adquisición fueron: anchura espectral de 8417,509 Hz en ambas dimensiones y un número de barridos (ns) de 96,2048 puntos de datos en f2 y 256 incrementos en f1. Se aplicó una función seno en ambas dimensiones y predicción lineal en dimensión f2. El espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY se registró en modo sensible con fase Status-TPPI empleando la secuencia *dipsi2esgpph* (2D *homonuclear Hartman-Hahn transfer using DIPSI2 sequence*; Bruker Biospin Ltd), con presaturación de agua utilizando pulsos selectivos y gradientes. Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: anchura espectral de 8417,509 Hz en ambas dimensiones y 70 ms de tiempo de mezcla; 128 barridos; 2048 puntos de datos en f2 y 256 incrementos en f1. Se aplicó predicción lineal en f2 y una función de pesada seno-cuadrado en ambas dimensiones antes de la transformada de Fourier. El experimento  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC se llevó a cabo en modo sensible a la fase utilizando la secuencia *hsqctgpprsisp2.2* (2D *H-1/X correlation via double inept transfer using sensitivity improvement*; Bruker Biospin Ltd) en modo “Echo-Antiecho” con desacoplamiento durante la adquisición y pulsos adiabáticos, con presaturación de agua durante el tiempo de relajación d1 de 1s. Los parámetros de adquisición fueron: 96 barridos, 2048 puntos de datos para  $^1\text{H}$  y 256 para  $^{13}\text{C}$ , 11160,71 Hz ( $^1\text{H}$ ) y 43859,65 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) de anchura espectral, 0,0917 s de tiempo de adquisición y un valor de 145 Hz de 1 J ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ).

La asignación de los metabolitos a los desplazamientos químicos diferenciales se realizó con HMDB Version 4.0 (del inglés, *Human Metabolome Database*) (<https://hmdb.ca/>) y Chenomx NMR Suite 8.3. profiler (versión 7.7). En este estudio nos centramos en la identificación de los desplazamientos químicos que se habían mostrado alterados en la comparación objeto principal de esta Tesis Doctoral: la de individuos jóvenes con factores de RCV frente a controles sanos (R vs C).

## **5.2. SELECCIÓN DE METABOLITOS PREVIAMENTE ASOCIADOS A RIESGO CARDIOVASCULAR PARA SU EVALUACIÓN A LO LARGO DE LA EDAD**

A los metabolitos previamente identificados por RMN se añadió un listado de metabolitos previamente asociados a RCV por estudios previos de nuestro laboratorio, para analizarlos mediante SRM en la orina de la cohorte de población joven, mediana edad y edad avanzada. Concretamente, se seleccionaron 18 metabolitos que se habían mostrado alterados en orina, plasma y/o tejido aórtico humanos o de modelo animal de aterosclerosis temprana [75, 76], en pacientes hipertensos con desarrollo de albuminuria [95] o en pacientes con ECV y enfermedad renal [96]. Los metabolitos seleccionados se muestran en resultados.

## **5.3. CONFIRMACIÓN MEDIANTE CUANTIFICACIÓN DIRIGIDA DE LOS METABOLITOS SELECCIONADOS COMO CANDIDATOS A MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO EN POBLACIÓN JOVEN Y EVALUACIÓN DE LOS MISMOS A LO LARGO DE LA EDAD**

La confirmación de los resultados de la fase de descubrimiento en población joven y la evaluación de una selección de metabolitos previamente asociados a RCV en otros estudios del laboratorio, se llevaron a cabo de forma conjunta en los mismos experimentos de SRM-LC-MS/MS. En total, se analizó la orina de 234 sujetos (las tres cohortes de edad disponibles al completo), siendo los mismos que los incorporados para el estudio de evaluación lo largo de la edad en la aproximación proteómica: 83 jóvenes (n: (C)=33, (R)=25 y (E)=25), 76 de mediana edad (n: (C)=28, (R)=23 y (E)=25) y 75 de edad avanzada (n: (C)=25, (R)=25 y (E)=25). Dicha cohorte de población joven incluía a los sujetos reclutados para la fase de descubrimiento.

### **5.3.1. Preparación de las muestras**

A las muestras se sumaron 5 blancos constituidos por agua Milli-Q, los cuales fueron tratados como una muestra más durante todo el proceso hasta el momento del análisis

cromatográfico. En un primer paso, se eliminaron las proteínas presentes en las muestras de orina mediante precipitación orgánica mezclando (1:1) con ácido fórmico al 0,1% en ACN (fase B). Tras incubar 30 min a 4°C, las muestras se centrifugaron a 11.000 g 5 min 4°C, se filtraron los sobrenadantes a través de 0,22 µm y se diluyeron (1:2) con ácido fórmico al 0,1% en agua Milli-Q (fase A), quedando en viales de vidrio específicos para cromatografía manteniéndose a 4°C hasta su inyección en el equipo y durante el análisis.

### **5.3.2. Sintonización de las condiciones óptimas de análisis de los metabolitos seleccionados**

Las condiciones de análisis específicas para cada metabolito, las cuales se muestran en resultados, se determinaron mediante un proceso de sintonización en el que se emplearon sus estándares comerciales en modo de infusión directa, estableciendo el potencial de fragmentación y la energía de colisión óptimos para cada transición mediante el software Optimizer (Agilent Technologies).

### **5.3.3. Análisis por SRM-LC/MS-MS**

Las muestras se analizaron en el equipo triple cuadrupolo 6460 QQQ (Agilent Technologies) acoplado en línea a un sistema nanoLC (1200 Series, Agilent Technologies) con la interfase Jet Stream, empleando una columna de fase reversa Atlantis T3 (3µm, 2,1x100mm, Waters). Para cada medida del equipo se inyectaron 5 µL de muestra y la separación se realizó a 0,4 mL/min en un gradiente de ACN combinando diferentes proporciones de fase A y fase B tal y como se detalla: 1) a 0,5 min 0% de B, 2) a 2,5 min 95% B, 3) a 2,51 min 0% B, 4) a 3 min 0% B. Se operó en modo positivo o negativo con voltaje multiplicador delta EMV a 600 V y 400 V, respectivamente, y un gas portador a 5 L/min de flujo y a 300°C. El tiempo de permanencia en la medida de cada transición se fijó en 20 ms para el modo positivo y 50 ms para el negativo. El sistema fue controlado mediante el software de adquisición y análisis de datos MassHunter (Agilent Technologies, v4.01). En la secuencia de análisis se programaron 2 medidas de cada muestra (réplicas técnicas) intercalando entre ellas inyecciones de ACN para asegurar una limpieza óptima del sistema.

### **5.3.4. Análisis estadístico**

Los cromatogramas se analizaron integrando las señales cromatográficas y cuantificando el área de pico para la posterior comparación entre los diferentes grupos clínicos. Al área de pico de cada una de las muestras se restó la media del área del mismo pico presente en los 5 blancos. El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism

(v.6.01). El método ROUT se aplicó para detectar valores atípicos basados en el FDR, estableciendo el valor Q en 5% (detección de *outliers*). Las comparaciones intergrupales se realizaron mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney (nivel de confianza del 95%). La evaluación del potencial diagnóstico de los metabolitos y el análisis de correlación con los valores de LTR se llevaron a cabo del mismo modo que el descrito en el apartado 4.5.1.4.



# Resultados I

---

**EL PROTEOMA DE LA ORINA  
REFLEJA RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO ORGÁNICO  
CON ALTERACIONES QUE VARÍAN A LO LARGO DE LA EDAD**



**Resultados parciales de esta sección han dado lugar al artículo científico**

**“Identification of six cardiovascular risk biomarkers in the young population:  
A promising tool for early prevention”**

*Atherosclerosis*. 282 (2019) 67–74

**Anexo III**



## 1. EXISTE UN SUBPROTEOMA EN ORINA DE POBLACIÓN JOVEN QUE VARÍA CON EL RIESGO CARDIOVASCULAR Y EL DAÑO ORGÁNICO ESTABLECIDO TRAS SUFRIR UN EVENTO AGUDO

La fase de descubrimiento se abordó mediante marcaje TMT10-plex<sup>TMT</sup> y análisis LC-MS/MS, llevando a cabo una identificación masiva y cuantificación diferencial de las proteínas presentes en la orina de 30 sujetos pertenecientes a la cohorte de población joven (30-50 años): (C)=10; (R)=8; (E)=12), tal y como se detalla en la **Tabla 3** junto con los parámetros clínicos. Siendo un reflejo de la selección poblacional estratificada por RCV, entre los grupos clínicos de estudio se observaron diferencias (significativas o no) fundamentalmente en el perfil lipídico, presión arterial y glucemia, sin que hubiera pérdida de función renal significativa (FGE promedio > 90 mL/min/1,73m<sup>2</sup>). Como se esperaba, los valores de LTR resultaron superiores en los individuos con factores de riesgo conocido frente a los controles sanos (R:34±8 vs C:24±8).

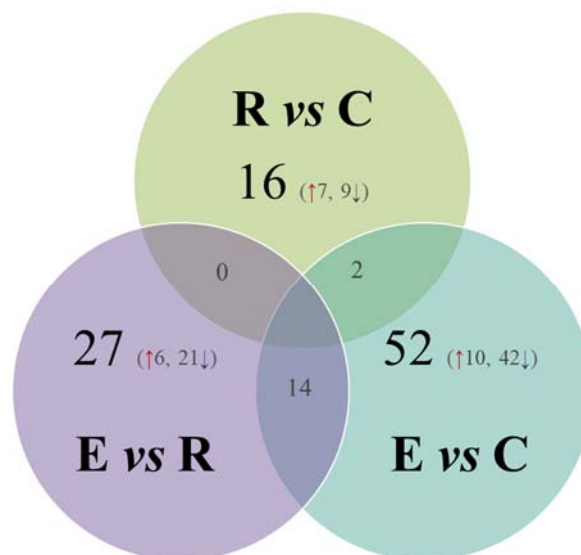
**Tabla 3**

**Datos clínicos de la cohorte de población joven utilizada durante la fase de descubrimiento en la aproximación proteómica**

| Características clínicas         | C           | R           | E         | R vs C | E vs R | E vs C |
|----------------------------------|-------------|-------------|-----------|--------|--------|--------|
| n                                | 10          | 8           | 12        | —      | —      | —      |
| Edad (años)                      | 44 ± 5      | 44 ± 6      | 45 ± 5    | ns     | ns     | ns     |
| Sexo (% hombre)                  | 60          | 50          | 67        | ns     | ns     | ns     |
| Presión sistólica (mmHg)         | 113 ± 10    | 131 ± 8     | 122 ± 16  | **     | ns     | ns     |
| Presión diastólica (mmHg)        | 73 ± 8      | 84 ± 10     | 75 ± 10   | *      | ns     | ns     |
| FGE (mL/min/1,73m <sup>2</sup> ) | 91 ± 8      | 97 ± 21     | 98 ± 27   | ns     | ns     | ns     |
| sCr (mg/dL)                      | 0,90 ± 0,14 | 0,83 ± 0,14 | 0,9 ± 0,2 | ns     | ns     | ns     |
| Glucemia (mg/dL)                 | 79 ± 7      | 104 ± 45    | 100 ± 24  | ns     | ns     | *      |
| SM (%)                           | 10          | 13          | 0         | ns     | ns     | ns     |
| DM (%)                           | 0           | 0           | 0         | ns     | ns     | ns     |
| Colesterol total (mg/dL)         | 197 ± 30    | 207 ± 36    | 158 ± 36  | ns     | *      | *      |
| HDL colesterol (mg/dL)           | 70 ± 19     | 53 ± 12     | 43 ± 10   | ns     | ns     | ***    |
| LDL colesterol (mg/dL)           | 112 ± 32    | 131 ± 34    | 90 ± 33   | ns     | *      | ns     |
| Triglicéridos (mg/dL)            | 88 ± 50     | 140 ± 121   | 121 ± 72  | ns     | ns     | ns     |
| Ácido úrico (mg/dL)              | 4,9 ± 1,5   | 5,1 ± 0,9   | 5,7 ± 1,4 | ns     | ns     | ns     |
| Antihipertensivos (%)            | 0           | 25          | 8         | ns     | ns     | ns     |
| Hipolipemiantes (%)              | 0           | 13          | 8         | ns     | ns     | ns     |
| Fumadores (%)                    | 0           | 25          | 50        | ns     | ns     | *      |
| LTR                              | 24 ± 8      | 34 ± 8      | —         | *      | —      | —      |

C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. DM: diabetes mellitus, FGE: filtrado glomerular estimado, LTR: *Lifetime Risk* o riesgo estimado a lo largo de la vida mediante QRISK<sup>®</sup>, sCr: creatinina sérica, SM: síndrome metabólico. Los datos se expresan como media ± d.e. o porcentajes. Test Mann-Whitney \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, ns: no significativo.

El análisis diferencial cuantitativo del proteoma de la orina resultó en un total de 4309 proteínas identificadas con los criterios previamente detallados (M&M, 4.1.3). El listado total de las identificaciones (**Tabla Suplementaria 1**) se analizó en busca de proteínas que mostrasen diferencias significativas entre al menos dos de los grupos clínicos estudiados (C, R y E) y que presentasen la misma alteración en ambos sexos. Así, se identificó un subproteoma compuesto por 79 proteínas alteradas en una o varias de las comparaciones intergrupales (**Figura 22**), que mostraban diferencias significativas tanto en hombres como en mujeres, bien asociadas principalmente a RCV (si variaban en R vs C), a daño orgánico establecido como consecuencia de haber sufrido un evento CV agudo (si la alteración se observaba únicamente en el grupo E al compararlo con los grupos R o C), o quizá, a la suma de ambos a lo largo del tiempo (mismas tendencias en R vs C y E vs R en proteínas significativamente alteradas al comparar el grupo E respecto al C).



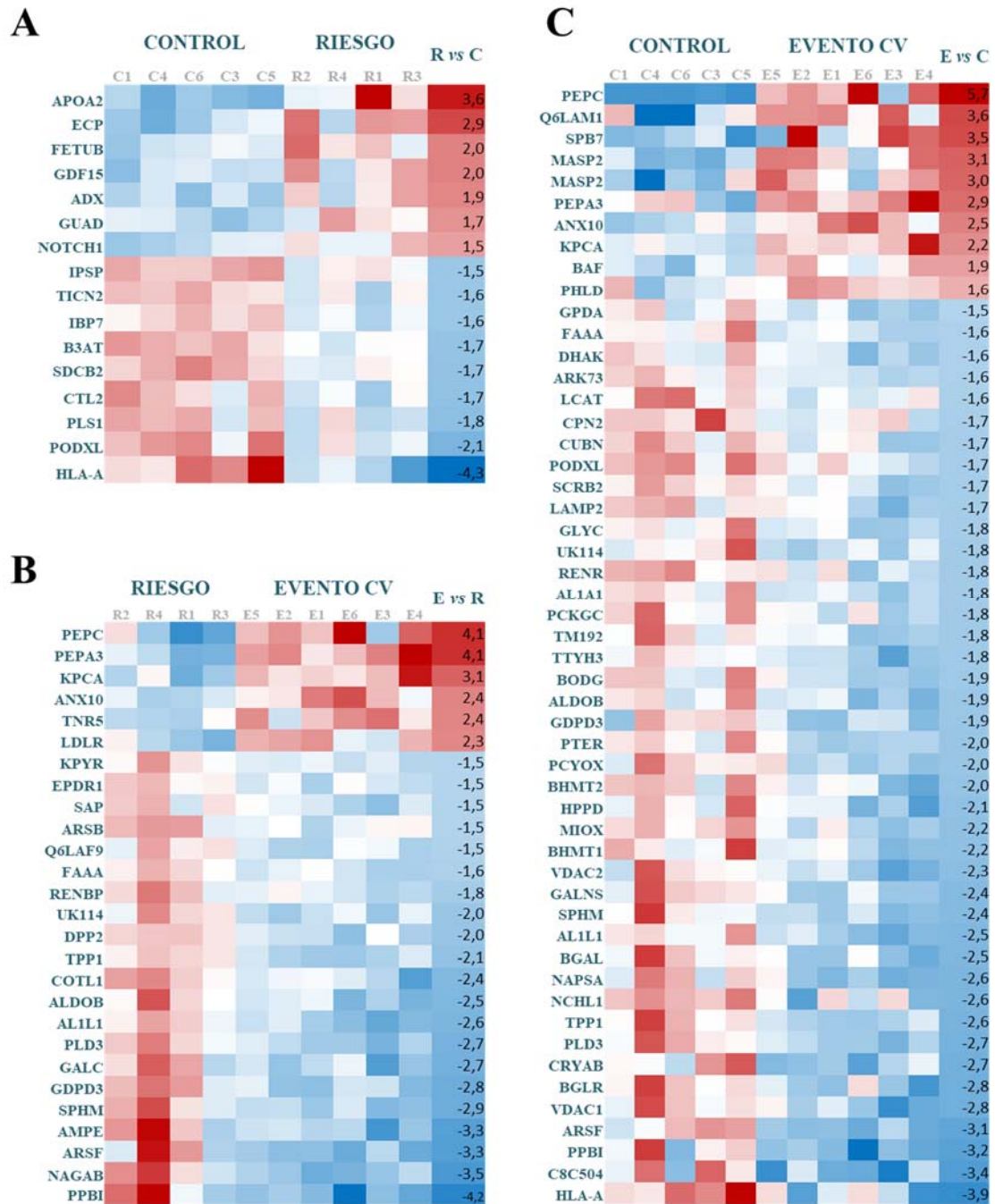
**Figura 22. Proteínas de la orina que muestran niveles significativamente alterados en función del riesgo cardiovascular.** Número de proteínas que se muestran aumentadas (↑) o disminuidas (↓) de forma significativa en alguna o varias de las comparaciones clínicas (R vs C, E vs R y/o E vs C), en base a los filtros de selección detallados en M&M. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV.

En la **Figura 23** se representan las variaciones de dicho subproteoma mediante un *heatmap*, donde cada fila muestra los datos para una proteína determinada y cada columna el valor  $Zq$  de cada réplica biológica en código de color en función de la magnitud de la variación. La última columna muestra la diferencia o tasa de cambio entre los grupos clínicos comparados expresada como diferencia de los  $Zq$  promedio de las réplicas

biológicas de cada grupo. Los valores numéricos de  $Zq$  de cada réplica biológica, la significación estadística, el número de péptidos identificados para cada una de las proteínas y el identificador en UniProt (código FASTA) pueden consultarse en la **Tabla Suplementaria 2**.

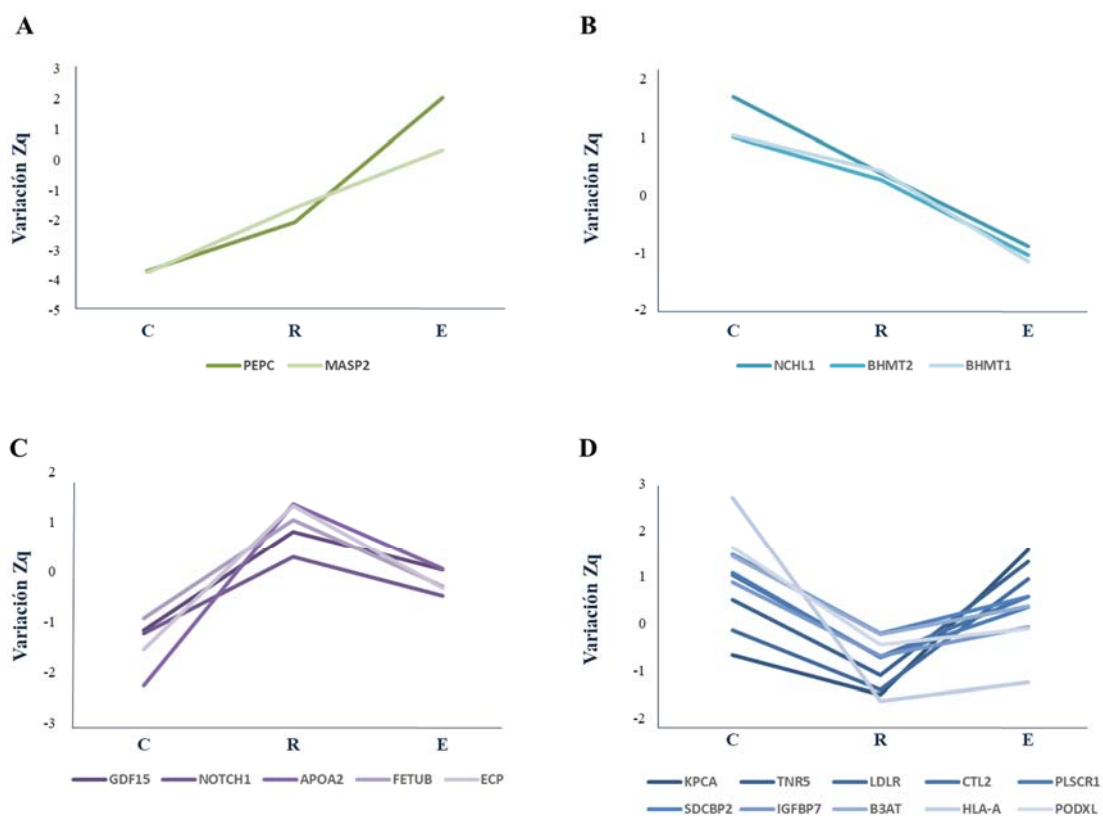
Como se observa en la **Figura 23A**, en la comparación del grupo de individuos con factores de RCV conocidos frente a los controles sanos (R vs C), se encontraron 16 proteínas significativamente alteradas (7 aumentadas y 9 disminuidas). Entre las aumentadas, la apolipoproteína A2 (APOA2) mostró la mayor tasa de cambio (3,6), seguida de la proteína catiónica del eosinófilo (ECP) (2,9), fetuina B (FETUB) (2,0), factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF15) (2,0), adrenodoxina (ADX) (1,9), guanidino desaminasa (GUAD) (1,7) y por último la proteína homóloga al locus neurogénico notch 1 (NOTCH1) (1,5). En el caso de las disminuidas, fue la cadena alfa del antígeno de histocompatibilidad 1 (HLA-A) la que mostró la mayor tasa de cambio (-4,3), seguida de podocalixina (PODXL) (-2,1), fosfolípido escramblasa 1 (PLS1) (-1,8), proteína 2 similar al transportador de colina (CTL2) (-1,7), sintetina 2 (SDCBP2) (-1,7), intercambiador aniónico de banda 3 (B3AT) (-1,7), proteína de unión del factor semejante a la insulina 7 (IBP7) (-1,6), testican 2 (TICN2) (-1,6) y por último el inhibidor plasmático de la serín proteasa (IPSP) (-1,5).

En la comparación del grupo de individuos que habían sufrido un evento CV frente a los que hasta el momento sólo tenían factores de riesgo (E vs R), había 27 proteínas significativamente alteradas (6 aumentadas y 21 disminuidas, **Figura 23B**), mientras que frente a los controles sanos (E vs C), el número de proteínas que variaban ascendía a 52 (10 aumentadas y 42 disminuidas, **Figura 23C**), de las cuales, 16 aparecían alteradas también en una de las otras dos comparaciones: 2 en R vs C (PODXL y HLA-A) y 14 en E vs R, entre las que se encontraban algunas de las más alteradas en alguna de las comparaciones, tanto por aumento (pepsinógeno C (PEPC), pepsinógeno A3 (PEPA), proteína quinasa A (KPCA) y anexina A10 (ANX10)) como por disminución (fosfatasa alcalina intestinal (PPBI), fosfolipasa D3 (PDL3) y tripeptidil peptidasa 1 (TPP1)).



**Figura 23. Proteínas de la orina que muestran niveles significativamente alterados en función del riesgo cardiovascular y daño orgánico establecido.** La Figura 23A muestra proteínas con una variación significativa asociada a RCV (comparación R con respecto a C). Las Figuras 23B y 23C muestran proteínas con una variación significativa asociada al daño orgánico establecido tras sufrir un evento CV (comparación E con respecto a R en Figura 23B y E con respecto a C en Figura 23C). Las proteínas se muestran por su nombre de entrada en UniProt. La abundancia de cada proteína (filas) se expresa en valor de  $Zq$  correspondiendo cada columna al valor de una réplica biológica. La diferencia o tasa de cambio entre los grupos clínicos comparados (última columna) se expresa como diferencia del  $Zq$  promedio de las réplicas de cada grupo. Las variaciones se representan en código de color: disminuido en azul (de - 4 a 0) y aumentado en rojo (de 0 a +4). C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV.

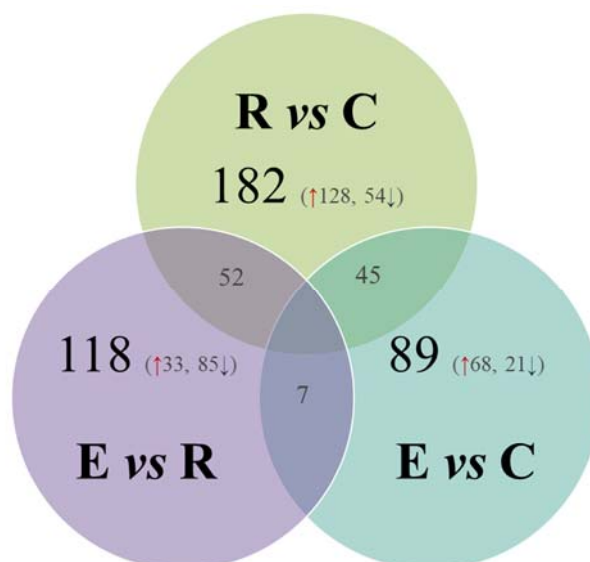
De modo adicional se analizó la tendencia conjunta de las 79 proteínas que mostraban un patrón diferencial entre grupos, identificando diferentes comportamientos dentro de este subproteoma (**Figura 24**). Por un lado, se encontraron proteínas que sufrían una alteración al existir factores de RCV, ya fuese aumentando o disminuyendo con respecto a los controles sanos, y que continuaban con esa tendencia incluso después de que el paciente se hubiese recuperado de un evento CV, siendo por tanto alteraciones provocadas, al menos en parte, por el daño orgánico establecido a lo largo del tiempo o generado al sufrir el evento (**Figura 24A y 24B**). Por otro lado, había proteínas que también sufrían una alteración en el grupo de riesgo, pero que, por el contrario, tendían a restablecer sus niveles hacia los valores del grupo control una vez superado el evento, por lo que serían alteraciones que podrían responder exclusivamente a RCV, el cual posiblemente disminuye tras sufrir un evento debido al control farmacológico y a la adquisición de hábitos cardiosaludables por parte del paciente (**Figura 24C y 24D**).



**Figura 24.** Representación de las tendencias de variación entre los tres grupos clínicos, observadas en las proteínas alteradas en función del riesgo cardiovascular o daño orgánico establecido tras un evento agudo. Las tendencias de variación entre los grupos clínicos se representan mediante la variación observada en el valor  $Zq$  promedio de cada grupo y para cada proteína. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV.

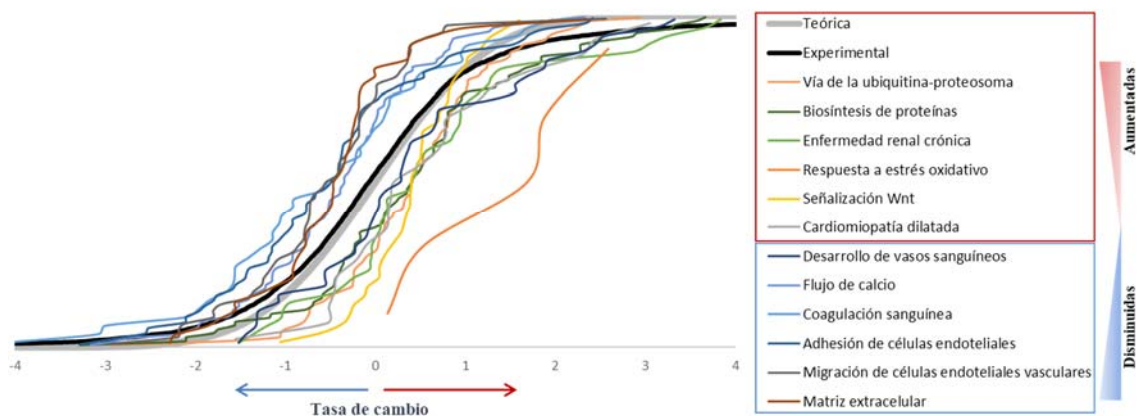
## 2. CATEGORÍAS FUNCIONALES ALTERADAS EN POBLACIÓN JOVEN EN FUNCIÓN DE SU RIESGO CARDIOVASCULAR O DAÑO

Una vez analizadas las proteínas a nivel individual, se realizó un análisis de biología de sistemas con los valores de cuantificación  $Zq$  de cada una de las 4309 proteínas identificadas en la fase de descubrimiento. Así, se pudieron identificar categorías funcionales que se mostraron alteradas como resultado de la suma de alteraciones en varias de las proteínas que la componen, sean o no dichas alteraciones significativas a nivel de proteína individual. Tal y como se ha detallado previamente (M&M, 4.3), para identificar los procesos biológicos (categorías) significativamente alterados en función del RCV, se compararon los valores promedio  $Zcat$  de las réplicas biológicas de cada grupo clínico (C, R y E), seleccionando aquellas que mostrasen diferencias significativas en alguna de las 3 comparaciones intergrupales (R vs C, E vs R o E vs C) y que estuviesen compuestas por 5 o más proteínas. Siguiendo estos criterios, se identificaron un total de 285 categorías funcionales alteradas en una o varias de las comparaciones, tal y como se representa en la **Figura 25**. El listado total de dichas categorías, junto con los valores de tasa de cambio, significación estadística y número de proteínas pertenecientes a cada categoría se muestran en la **Tabla Suplementaria 3**.



**Figura 25. Número de categorías alteradas significativamente en cada comparación clínica y comunes entre ellas.** Número de categorías que se muestran aumentadas (↑) o disminuidas (↓) de forma significativa en alguna o varias de las comparaciones clínicas (R vs C, E vs R y/o E vs C), en base a los filtros de selección detallados en M&M. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV.

Entre las 182 categorías alteradas significativamente en los individuos con factores de RCV frente a los controles sanos (R vs C), 128 estaban aumentadas y 54 disminuidas (**Figura 25**). Entre las aumentadas, destacan respuesta a estrés oxidativo, cardiomiopatía dilatada, enfermedad renal crónica, muerte de cardiomiocitos, vía de señalización Wnt y varias categorías relacionadas con la biosíntesis de proteínas, proteasoma y citoesqueleto. Entre las categorías disminuidas destacan procesos de flujo de calcio, coagulación sanguínea y hemostasia, así como relacionados con matriz extracelular, migración y adhesión de células endoteliales, mostrando todas ellas tasas de cambio de entre -4 y 4, tal y como se representa en la **Figura 26**.



**Figura 26.** Categorías funcionales alteradas en individuos con riesgo cardiovascular con respecto a controles sin riesgo.

## 2.1. CATEGORÍAS FUNCIONALES CON ALTERACIONES ASOCIADAS A RIESGO CARDIOVASCULAR QUE REVIERTEN TRAS SUFRIR UN EVENTO AGUDO

Como muestra la **Figura 25**, de las 182 categorías que se encontraban alteradas significativamente en la comparación R vs C, 52 también mostraban diferencias significativas al comparar E vs R, aunque interesantemente, todas ellas mostraban una tendencia contraria. En concreto, 44 de las 128 categorías que se encontraban aumentadas en R vs C, aparecían disminuidas en E vs R, mientras que 8 de las 54 categorías disminuidas en R vs C, mostraban un aumento en E vs R. Las categorías más destacadas de cada una de estos dos comportamientos se representan en la **Figura 27A y 27B** respectivamente, en similitud con las **Figuras 24C y 24D**, en las que se mostraba cómo

algunas proteínas que sufrían una alteración en el grupo de riesgo, tendían a restablecer sus niveles hacia los valores del grupo control una vez superado el evento. Al igual que dichas proteínas, la alteración de estas categorías funcionales parece responder exclusivamente a RCV, el cual posiblemente disminuye tras sufrir un evento CV, debido al control farmacológico y a la adquisición de hábitos cardiosaludables por parte del paciente.

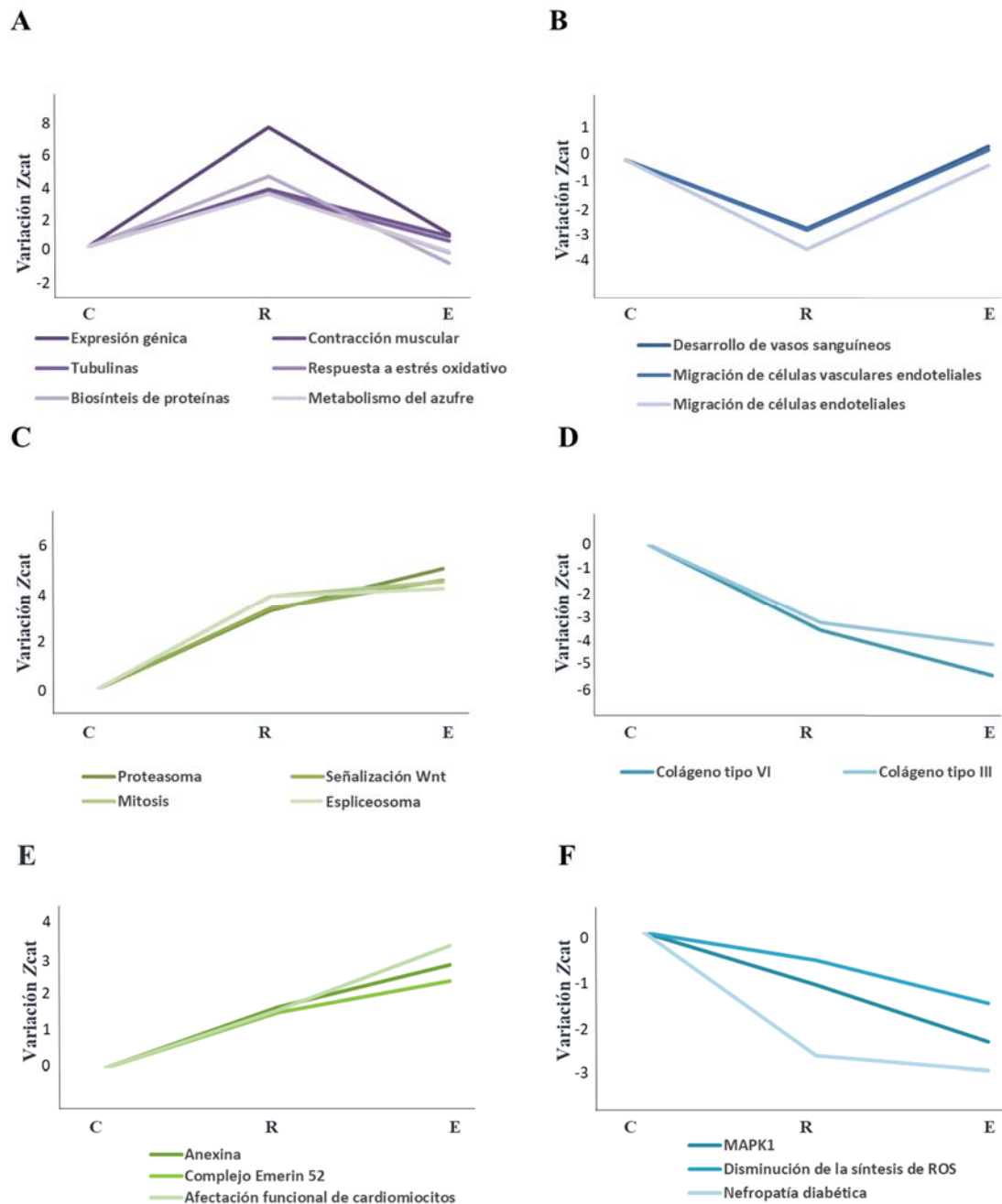
## **2.2. CATEGORÍAS FUNCIONALES CON ALTERACIONES ASOCIADAS A RIESGO CARDIOVASCULAR QUE CONTINÚAN PROGRESANDO TRAS SUFRIR UN EVENTO AGUDO**

Entre las 182 categorías que se encontraban alteradas significativamente en R vs C, también se encontraron 77 que mostraban la misma tendencia en la comparación E vs R, aunque no de un modo significativo ( $p$  valor  $> 0,05$ ). Entre ellas, se identificaron 38 categorías que aumentaban (destacando proteasoma, señalización Wnt, mitosis y spliceosoma), y 2 que disminuían (colágenos tipo III y VI), representadas en las **Figuras 27C y 27D** respectivamente. Este tipo de comportamiento parece representar posiblemente presencia de daño orgánico o incluso riesgo, que se genera de una forma más rápida al inicio, y continúa acumulándose después de superar un evento, pese a recibir tratamiento farmacológico o mejorar los hábitos de vida (riesgo residual).

El mismo comportamiento se observó, aunque con una progresión más lenta al inicio, en otras 23 categorías funcionales que mostraban alteraciones con la misma tendencia (aumentar o disminuir) en las comparaciones R vs C y E vs R, no llegando a ser una alteración significativa hasta comparar E vs C. Entre estas categorías cabe destacar afectación funcional de cardiomiocitos, y complejo Emerina 52 entre las aumentadas (**Figura 27E**), y disminución de la síntesis de ROS entre las disminuidas (**Figura 27F**).

## **2.3 CATEGORÍAS FUNCIONALES ALTERADAS TRAS SUFRIR UN EVENTO AGUDO**

Durante el análisis se encontraron 7 categorías que se encontraban significativamente alteradas y con la misma tendencia únicamente al comparar E vs R y E vs C, por lo que parecen estar asociadas a la presencia de daño. Entre ellas, cabe destacar disfunción mitocondrial, fosforilación oxidativa y enfermedad de almacenamiento lisosómico entre las disminuidas, y proteína selectiva de unión a calcio entre las aumentadas.



**Figura 27. Categorías funcionales con alteraciones asociadas a riesgo cardiovascular con diferentes comportamientos tras sufrir un evento agudo.** Las figuras 27A y 27B, representan alteraciones que progresan rápidamente desde el inicio, y que tienden a revertir tras sufrir un evento CV agudo, siendo significativas ( $p$  valor  $< 0,05$ ) en R vs C y E vs C. Las figuras 27C y 27D, representan alteraciones que progresan rápidamente desde el inicio, siendo significativas ( $p$  valor  $< 0,05$ ) sólo en R vs C. Las figuras 27E y 27F muestran una progresión más lenta alcanzando la significación ( $p$  valor  $< 0,05$ ) sólo al comparar E vs C. La variación se representa mediante cambios en el *Zcat* promedio de cada grupo clínico. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV.

### 3. SEIS BIOMARCADORES PROTEICOS EN ORINA REFLEJAN SIGNIFICATIVAMENTE EL RIESGO CARDIOVASCULAR EN POBLACIÓN JOVEN

Una vez identificado el subproteoma alterado en la orina en función del RCV, se llevó a cabo una selección de proteínas diana para confirmar su alteración por una técnica diferente a la empleada en la fase de descubrimiento como es la cuantificación dirigida por SRM-LC-MS/MS. Para este análisis se incorporaron 46 sujetos a la cohorte utilizada en la fase de descubrimiento resultando en un total de n: (C)=25; (R)=24; (E)=25 cuyos parámetros clínicos se detallan en la **Tabla 4** observándose un aumento de la significación estadística de las diferencias entre los grupos clínicos.

**Tabla 4**

**Datos clínicos de la cohorte de población joven utilizada para el análisis mediante SRM de la primera fase de confirmación de la aproximación proteómica**

| Características clínicas         | C           | R           | E           | R vs C | E vs R | E vs C |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------|--------|--------|
| n                                | 25          | 24          | 25          | —      | —      | —      |
| Edad (años)                      | 43 ± 5      | 44 ± 5      | 45 ± 4      | ns     | ns     | ns     |
| Sexo (% hombre)                  | 32          | 75          | 80          | **     | ns     | **     |
| Presión sistólica (mmHg)         | 112 ± 9     | 136 ± 12    | 121 ± 20    | ****   | **     | ns     |
| Presión diastólica (mmHg)        | 71 ± 8      | 88 ± 9      | 76 ± 12     | ****   | ***    | ns     |
| FGE (mL/min/1,73m <sup>2</sup> ) | 93 ± 10     | 89 ± 15     | 98 ± 20     | ns     | ns     | ns     |
| sCr (mg/dL)                      | 0,79 ± 0,13 | 0,91 ± 0,12 | 0,90 ± 0,16 | **     | ns     | *      |
| Glucemia (mg/dL)                 | 80 ± 8      | 98 ± 32     | 109 ± 45    | ns     | ns     | ****   |
| SM (%)                           | 4           | 58          | 8           | ****   | ***    | ns     |
| DM (%)                           | 0           | 13          | 8           | ns     | ns     | ns     |
| Colesterol total (mg/dL)         | 194 ± 37    | 208 ± 35    | 147 ± 39    | ns     | ****   | ***    |
| HDL colesterol (mg/dL)           | 71 ± 18     | 43 ± 12     | 41 ± 10     | ****   | ns     | ****   |
| LDL colesterol (mg/dL)           | 106 ± 32    | 134 ± 33    | 81 ± 36     | **     | ****   | *      |
| Triglicéridos (mg/dL)            | 83 ± 39     | 193 ± 99    | 113 ± 58    | ****   | **     | **     |
| Ácido úrico (mg/dL)              | 4,5 ± 1,2   | 6,2 ± 1,7   | 5,8 ± 1,4   | ***    | ns     | **     |
| Antihipertensivos (%)            | 0           | 40          | 32          | ***    | ns     | **     |
| Hipolipemiantes (%)              | 0           | 21          | 28          | *      | ns     | **     |
| Fumadores (%)                    | 16          | 25          | 60          | ns     | *      | **     |
| LTR                              | 23 ± 6      | 42 ± 10     | —           | ****   | —      | —      |

C: grupo control, E: grupo con evento CV, R: grupo con factores de RCV. DM: diabetes mellitus, FGE: filtrado glomerular estimado, LTR: *Lifetime Risk* o riesgo estimado a lo largo de la vida mediante QRISK<sup>®</sup>, sCr: creatinina sérica, SM: síndrome metabólico. Los datos se expresan como media ± d.e. o porcentajes. Test Mann-Whitney \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns: no significativo.

En un primer momento, el análisis se centró en las proteínas que se habían visto alteradas en R vs C, puesto que son las que presentan un mayor potencial de cara a mejorar la estratificación de un individuo en función de su RCV y por tanto la intervención terapéutica temprana y de modo personalizado. Como un primer panel, se seleccionaron aquellas que resultaban aumentadas en el grupo de RCV con respecto al control: ADX, APOA2, ECP, FETUB, GDF15, GUAD y NOTCH1.

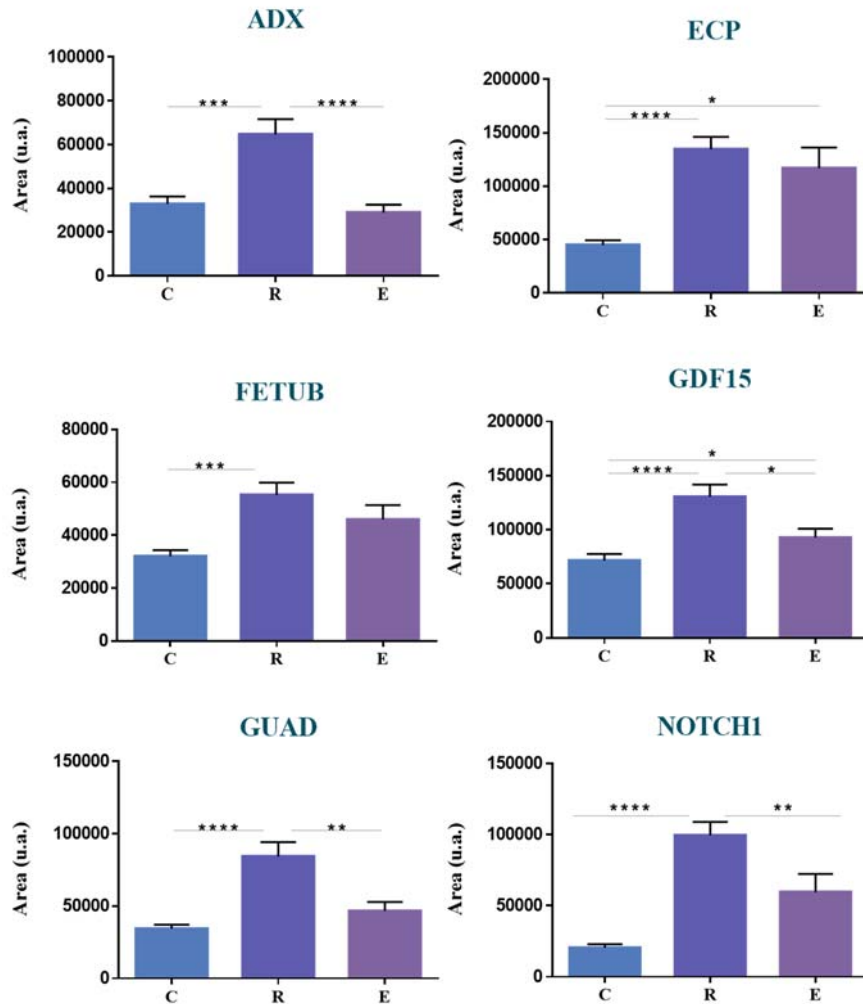
Las condiciones del análisis cuantitativo dirigido se optimizaron para cada una de las proteínas, tal y como se detallado previamente (M&M, 4.5.1.2). De este modo, se seleccionaron un total de 517 transiciones teóricas para la cuantificación de dichos péptidos, los cuales pertenecían a 5 de las 6 proteínas, ya que, en el caso de la APOA2, no se encontró ningún péptido óptimo, no incluyéndola por tanto en el análisis. Los péptidos seleccionados para llevar a cabo la cuantificación de cada proteína se representan en la **Tabla 5**. Las transiciones seleccionadas para cada péptido y sus condiciones de medida durante el SRM pueden consultarse en la **Tabla suplementaria 4**.

**Tabla 5**  
**Péptidos cuantificados para cada proteína durante el SRM**

| Abreviatura | UniProt | Nombre de la proteína                          | Péptidos  |
|-------------|---------|--|---|
| ADX         | P10109  | Adrenodoxina                                   | AASAVLGGPAGR<br>GPGGSAEASR<br>NQNTFLR                 |
| ECP         | P12724  | Proteína catiónica del eosinófilo              | FYVVACDNR<br>YPVVPVHLDTTI<br>SQASSCSLQSSDSVPVGLCK     |
| FETUB       | Q9UGM5  | Fetuina-B                                      | GSVQYLPDLDDK<br>TAECPGPAQNASPLVLPP<br>ASFPGPSELHSEDSR |
| GDF15       | Q99988  | Factor de diferenciación del crecimiento 15    | AALPEGLPEASR<br>DHLLGVSDSGK<br>FQNIDFAEEVYTR          |
| GUAD        | Q9Y2T3  | Guanidino desaminasa                           | DLHIQSHISENR<br>NIEEVYVGGK<br>VASFYCECPHGR            |
| NOTCH1      | P46531  | Proteína homóloga al locus neurogénico notch 1 | EPLGEDSVGLKPLK<br>FEPPVLPDLDDQTDHR                    |

El análisis estadístico de los datos obtenidos tras la cuantificación dirigida por SRM mostró una alteración estadísticamente significativa en todas las proteínas analizadas, tanto cuando se analizó por separado la cohorte incorporada como al realizar el análisis

incluyendo también la cohorte empleada en la fase de descubrimiento. Se confirmaron así niveles elevados de ADX, ECP, FETUB, GDF15, GUAD y NOTCH1 en los individuos pertenecientes al grupo de riesgo con respecto a los controles sanos (R vs C) (**Figura 28**), tal y como se había identificado previamente durante la fase de descubrimiento.



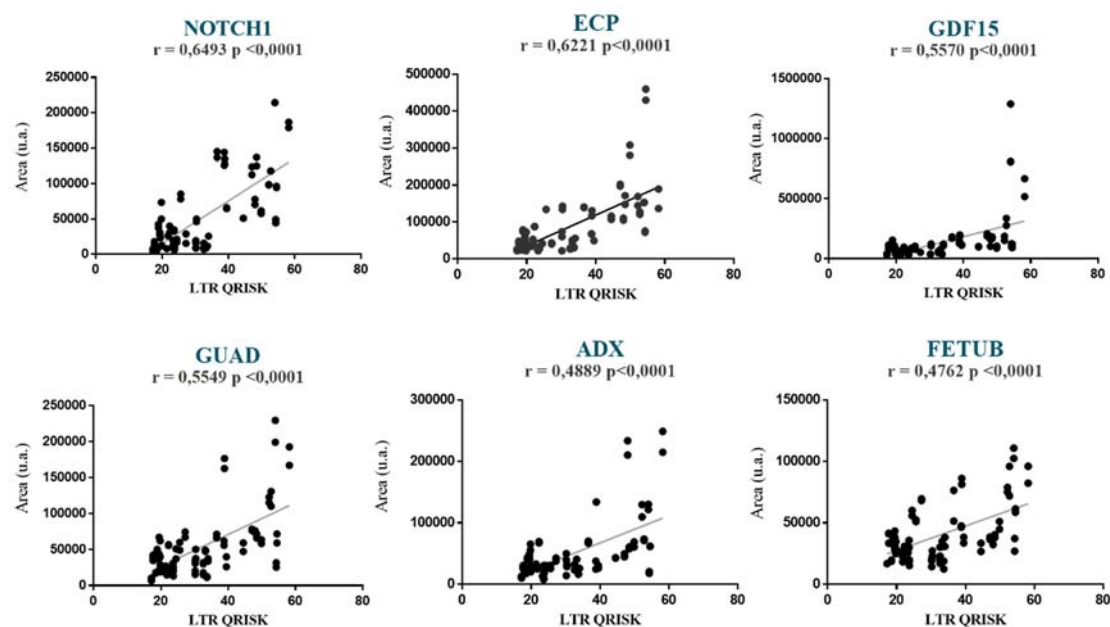
**Figura 28. Proteínas marcadoras de riesgo cardiovascular confirmadas mediante SRM en población joven.** Representación de la media  $\pm$  SEM. ADX: adrenodoxina, ECP: proteína catiónica del eosinófilo, FETUB: fetuina B, GDF15: factor de diferenciación del crecimiento 15, GUAD: guanidino desaminasa, NOTCH1: proteína homóloga al locus neurogénico notch 1. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. Test Mann-Whitney \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Además, como se muestra en la **Figura 28**, este análisis de confirmación reveló una disminución significativa en GDF15, GUAD, ADX y NOTCH1 en aquellos individuos que habían superado un evento CV agudo (E vs R), confirmando así las tendencias previamente observadas durante el descubrimiento para GDF15 y NOTCH1 (**Figura 24C**).

### 3.1. LOS VALORES DE LOS 6 BIOMARCADORES SE CORRELACIONAN CON EL RIESGO ESTIMADO A LO LARGO DE LA VIDA

De modo adicional, se realizó un análisis para ver si los niveles de estos potenciales biomarcadores en orina asociaban con el riesgo estimado a lo largo de la vida (LTR), el cual parece estar más cerca de estimar el RCV total (fatal y no fatal) de lo que lo están los actuales sistemas de estimación de riesgo a 10 años. Para ello, se llevó a cabo un análisis de correlación entre los valores individuales de LTR (QRISK®) y cada biomarcador para cada paciente de los grupos C y R, ya que el estimador QRISK® no está indicado en pacientes con evento CV.

Los resultados mostraron una correlación significativa para las 6 proteínas tal y como se muestra en la **Figura 29**, con valores de correlación de Spearman de mayor a menor; NOTCH1  $r = 0,6493$   $p < 0,0001$ ; ECP  $r = 0,6221$   $p < 0,0001$ ; GDF15  $r = 0,5570$   $p < 0,0001$ ; GUAD  $r = 0,5549$   $p < 0,0001$ ; ADX  $r = 0,4889$   $p < 0,0001$  y FETUB  $r = 0,4762$   $p < 0,0001$ . Esta correlación fue positiva en todos los casos, es decir, que los valores aumentados de estas 6 proteínas en la orina de los pacientes con factores de RCV lo hacen al tiempo que aumenta su LTR.



**Figura 29.** Correlación entre los valores de las proteínas marcadoras de riesgo cardiovascular en población joven y el LTR QRISK®. r: coeficiente de correlación de Spearman, ADX: adrenodoxina, ECP: proteína catiónica del eosinófilo, FETUB: fetuina B, GDF15: factor de diferenciación del crecimiento 15, GUAD: guanidino desaminasa, NOTCH1: proteína homóloga al locus neurogénico notch 1.

Del mismo modo se analizó la potencial correlación existente entre dichas proteínas y los factores de riesgo tradicionales que se utilizan para el cálculo del estimador QRISK® (edad, sexo, tabaquismo, índice de masa corporal, relación Col/HDL y PAS). Tal y como se muestra en la **Tabla 6** se encontraron correlaciones positivas con casi todas las variables, siendo la mayor y más significativa para todas las proteínas la correlación con la relación Col/HDL, seguida de sexo, peso y PAS. En cuanto a la edad, solamente la proteína NOTCH1 mostró una correlación significativa indicando que el comportamiento del resto de los marcadores no muestra diferencias asociadas a la edad entre los 30 y 50 años.

**Tabla 6**  
**Correlaciones entre las potenciales proteínas biomarcadoras de riesgo cardiovascular y los parámetros individuales utilizados para calcular el QRISK®**

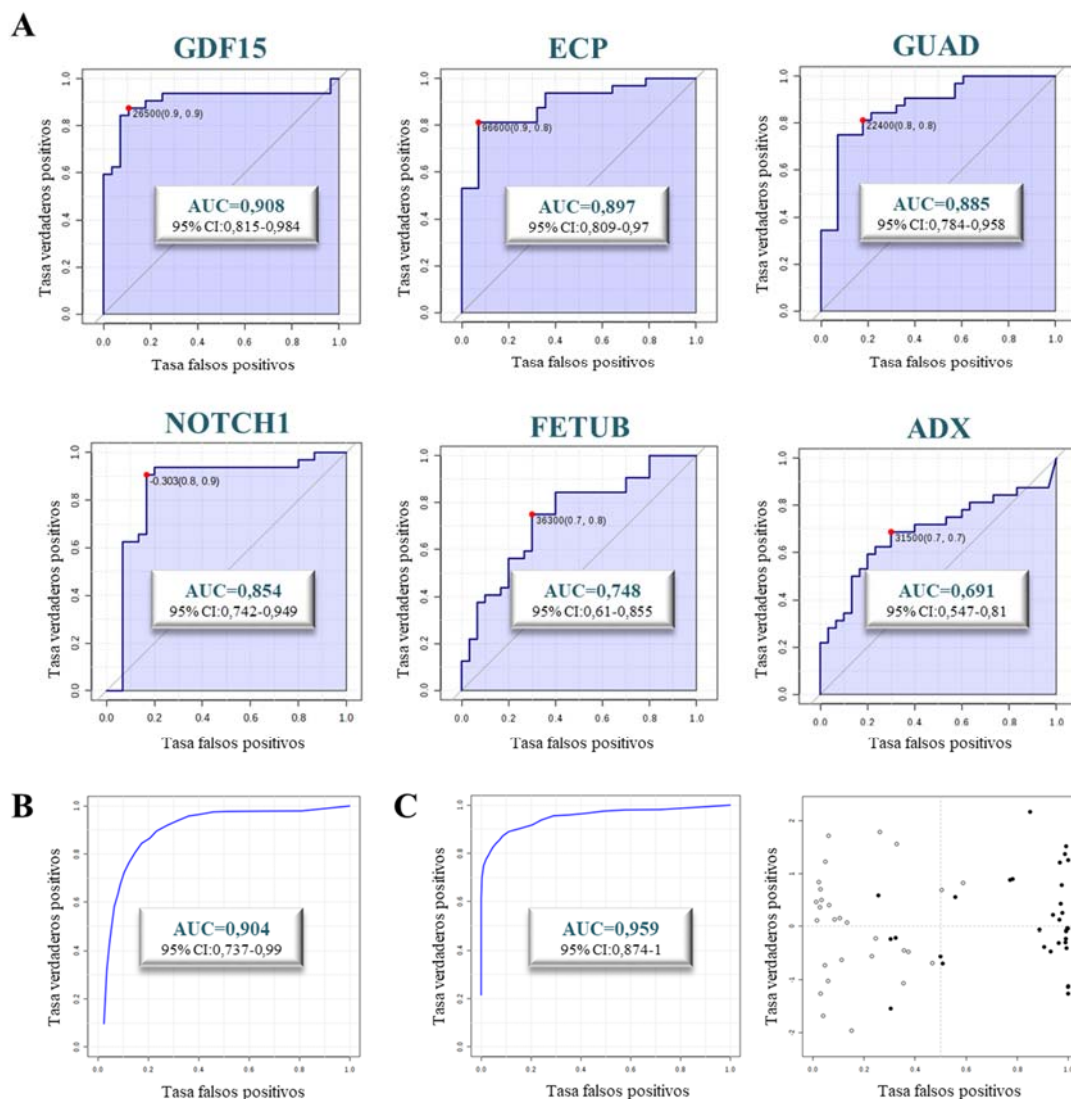
| PROTEÍNA |         | EDAD   | SEXO    | FUMADOR  | TTO HTA | COL/HDL | PAS    | PESO   |
|----------|---------|--------|---------|----------|---------|---------|--------|--------|
| NOTCH1   | r       | 0,2826 | -0,496  | -0,1174  | 0,2739  | 0,6233  | 0,4876 | 0,4759 |
|          | p valor | *      | ****    | ns       | *       | ****    | ****   | ****   |
| GUAD     | r       | 0,2014 | -0,5411 | -0,08239 | 0,2163  | 0,6103  | 0,4012 | 0,503  |
|          | p valor | ns     | ****    | ns       | ns      | ****    | **     | ****   |
| GDF15    | r       | 0,1907 | -0,4166 | -0,08857 | 0,206   | 0,5477  | 0,3763 | 0,3226 |
|          | p valor | ns     | ***     | ns       | ns      | ****    | **     | *      |
| FETUB    | r       | 0,1536 | -0,4689 | -0,09269 | 0,138   | 0,5151  | 0,3372 | 0,3818 |
|          | p valor | ns     | ***     | ns       | ns      | ****    | **     | **     |
| ECP      | r       | 0,1008 | -0,5825 | -0,2595  | 0,2513  | 0,5937  | 0,432  | 0,557  |
|          | p valor | ns     | ****    | *        | *       | ****    | ***    | ****   |
| ADX      | r       | 0,1749 | -0,4058 | -0,07621 | 0,2575  | 0,5322  | 0,2712 | 0,4289 |
|          | p valor | ns     | **      | ns       | *       | ****    | *      | ***    |

ADX: adrenodoxina, ECP: proteína catiónica del eosinófilo, FETUB: fetuina B, GDF15: factor de diferenciación del crecimiento 15, GUAD: guanidino desaminasa, NOTCH1: proteína homóloga al locus neurogénico notch 1; Col/HDL: relación colesterol total/colesterol HDL, PAS: presión arterial sistólica, TTO HTA: tratamiento antihipertensivo, r: coeficiente de correlación de Spearman, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns: no significativo.

### 3.2. UN PANEL DE 3 PROTEÍNAS MUESTRA EL MEJOR VALOR DIAGNÓSTICO

Para evaluar en términos de sensibilidad y selectividad el potencial de estas 6 proteínas como panel molecular indicador de RCV en población joven, realizamos un análisis de curvas ROC tanto a nivel individual como combinadas en paneles. Los valores de área bajo la curva (AUC, del inglés *area under the curve*) obtenidos para cada una de las

proteínas individualmente fueron, de mayor a menor: GDF15=0,908; ECP=0,897; GUAD=0,885; NOTCH1=0,854; FETUB=0,748 y ADX=0,691 (**Figura 30A**). El poder de clasificación del modelo al combinar las 6 proteínas en un análisis multivariante mostró un AUC=0,904 (**Figura 30B**), siendo superior el del panel que combinaba ECP, GDF15 y GUAD, con un AUC=0,959 y un diagrama de clases con buena sensibilidad y especificidad a la hora de separar a los individuos control de aquellos quienes tienen factores de RCV (**Figura 30C**).



**Figura 30.** Evaluación de la sensibilidad y especificidad clínicas de los biomarcadores proteicos de riesgo cardiovascular confirmados mediante SRM en población joven. La Figura 30A muestra las curvas ROC individuales para cada proteína. La Figura 30B muestra la ROC de las 6 proteínas combinadas. La Figura 30C muestra la ROC y el diagrama de clases del panel con mayor valor pronóstico (ECP, GDF15 y GUAD) para separar al grupo control (C: blanco) del grupo de riesgo (R: negro). ADX: adrenodoxina, ECP: proteína catiónica del eosinófilo, FETUB: fetuina B, GDF15: factor de diferenciación del crecimiento 15, GUAD: guanidino desaminasa, NOTCH1: proteína homóloga al locus neurogénico notch1.

Viendo el potencial de este panel compuesto por ECP, GDF15 y GUAD como indicador de RCV en población joven, se realizó un nuevo análisis de confirmación, esta vez mediante ELISA, en el que se incluyeron los grupos C y R de la cohorte utilizada durante la confirmación por SRM-LC-MS/MS incorporando 5 sujetos nuevos al grupo control (n: (C)=30; (R)=24) cuyos parámetros clínicos se detallan en la **Tabla 7**.

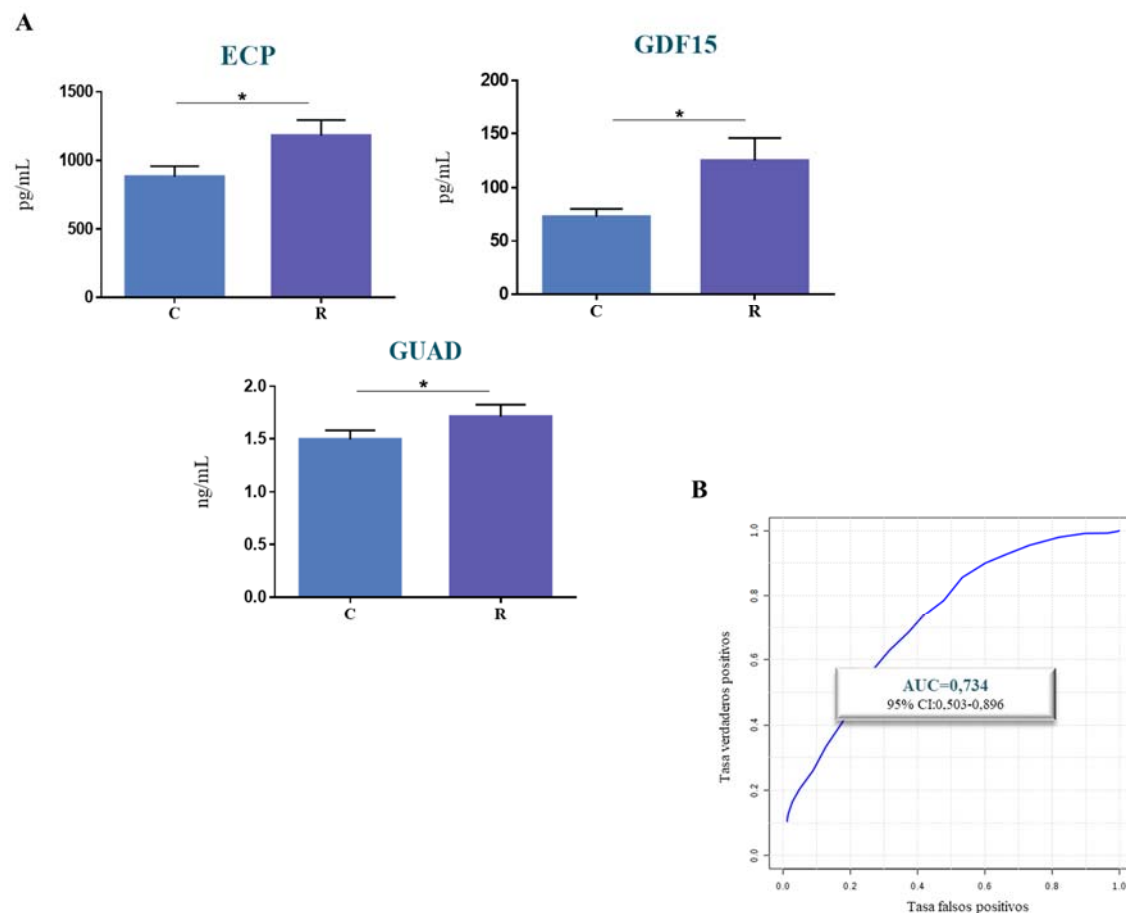
**Tabla 7**  
**Datos clínicos de la cohorte de población joven utilizada para el análisis mediante ELISA de la primera fase de confirmación de la aproximación proteómica**

| Características clínicas         | C           | R           | R vs C |
|----------------------------------|-------------|-------------|--------|
| n                                | 30          | 24          | —      |
| Edad (años)                      | 42 ± 5      | 44 ± 5      | ns     |
| Sexo (% hombre)                  | 53          | 75          | ns     |
| Presión sistólica (mmHg)         | 112 ± 9     | 136 ± 12    | ****   |
| Presión diastólica (mmHg)        | 71 ± 8      | 88 ± 9      | ****   |
| FGE (mL/min/1,73m <sup>2</sup> ) | 94 ± 10     | 89 ± 15     | *      |
| sCr (mg/dL)                      | 0,79 ± 0,12 | 0,91 ± 0,12 | **     |
| Glucemia (mg/dL)                 | 80 ± 8      | 98 ± 32     | ns     |
| SM (%)                           | 3           | 58          | ****   |
| DM (%)                           | 0           | 13          | ns     |
| Colesterol total (mg/dL)         | 196 ± 38    | 208 ± 35    | ns     |
| HDL colesterol (mg/dL)           | 71 ± 17     | 43 ± 12     | ****   |
| LDL colesterol (mg/dL)           | 108 ± 31    | 134 ± 33    | **     |
| Triglicéridos (mg/dL)            | 85 ± 39     | 193 ± 99    | ****   |
| Ácido úrico (mg/dL)              | 4,6 ± 1,2   | 6,2 ± 1,7   | ***    |
| Antihipertensivos (%)            | 0           | 40          | ****   |
| Hipolipemiantes (%)              | 0           | 21          | *      |
| Fumadores (%)                    | 17          | 25          | *      |
| LTR                              | 23 ± 6      | 42 ± 10     | ****   |

C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. DM: diabetes mellitus, FGE: filtrado glomerular estimado, LTR: *Lifetime Risk* o riesgo estimado a lo largo de la vida mediante QRISK<sup>®</sup>, sCr: creatinina sérica, SM: síndrome metabólico. Los datos se expresan como media ± d.e. o porcentajes. Test Mann-Whitney \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns: no significativo.

Tal y como se ha comentado previamente (M&M, 4.5.2.1) fue necesario realizar pruebas para determinar la dilución idónea de la orina a utilizar en cada ensayo, siendo los resultados de las mismas 1:10, 1:100 y 1:2, para ECP, GDF15 y GUAD, respectivamente. En la **Figura Suplementaria 1** se muestran las curvas patrón obtenidas para cada proteína.

Los resultados de los ensayos ELISA confirmaron nuevamente la alteración de las 3 proteínas, mostrando valores aumentados significativamente en el grupo R vs C (**Figura 31A**). Al realizar el análisis de curvas ROC con los datos obtenidos mediante ELISA para el panel de proteínas ECP, GDF15 y GUAD, el poder de clasificación del modelo descendía a un AUC=0,734 (**Figura 31B**), frente al AUC=0,959 que se obtenía con los datos de SRM (**Figura 30C**).



**Figura 31. Confirmación de ECP, GDF15 y GUAD como potenciales biomarcadores de RCV en población joven mediante ELISA.** La Figura 31A muestra la de la media  $\pm$  SEM para cada proteína. Test Mann-Whitney  $*p < 0,05$ . La Figura 30B muestra la ROC de las 3 proteínas combinadas. ECP: proteína catiónica del eosinófilo, GDF15: factor de diferenciación del crecimiento 15, GUAD: guanidino desaminasa.

#### 4. EL REFLEJO DEL RIESGO CARDIOVASCULAR Y EL DAÑO ORGÁNICO EN EL PROTEOMA DE LA ORINA VARÍA A LO LARGO DE LA EDAD

Tras concluir el análisis de las proteínas que durante la fase de descubrimiento se habían mostrado alteradas en R vs C, se llevó a cabo una segunda fase de confirmación en población joven analizando en este caso una nueva selección de proteínas diana en la cohorte completa disponible, formada por 83 sujetos (n: (C)=33, (R)=25 y (E)=25), tal y como se detalla en la **Tabla 8** junto con sus parámetros clínicos.

**Tabla 8**

**Datos clínicos de la cohorte de población joven utilizada durante el análisis por SRM-LC-MS/MS con marcaje isotópico**

| Características clínicas         | C           | R           | E           | R vs C | E vs R | E vs C |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------|--------|--------|
| n                                | 33          | 25          | 25          | –      | –      | –      |
| Edad (años)                      | 43 ± 5      | 44 ± 5      | 45 ± 4      | ns     | ns     | ns     |
| Sexo (% hombre)                  | 49          | 72          | 80          | ns     | ns     | *      |
| Presión sistólica (mmHg)         | 113 ± 9     | 135 ± 12    | 122 ± 19    | ****   | **     | ns     |
| Presión diastólica (mmHg)        | 71 ± 8      | 88 ± 9      | 76 ± 12     | ****   | ***    | ns     |
| FGE (mL/min/1,73m <sup>2</sup> ) | 93 ± 10     | 89 ± 15     | 98 ± 21     | ns     | ns     | ns     |
| sCr (mg/dL)                      | 0,81 ± 0,12 | 0,90 ± 0,12 | 0,90 ± 0,18 | **     | ns     | *      |
| Glucemia (mg/dL)                 | 80 ± 8      | 97 ± 31     | 107 ± 43    | ns     | ns     | ****   |
| SM (%)                           | 3           | 52          | 8           | ****   | **     | ns     |
| DM (%)                           | 0           | 13          | 8           | ns     | ns     | ns     |
| Colesterol total (mg/dL)         | 193 ± 37    | 210 ± 37    | 147 ± 40    | ns     | ****   | ***    |
| HDL colesterol (mg/dL)           | 71 ± 17     | 45 ± 14     | 41 ± 10     | ****   | ns     | ****   |
| LDL colesterol (mg/dL)           | 105 ± 32    | 135 ± 33    | 81 ± 38     | **     | ****   | *      |
| Triglicéridos (mg/dL)            | 82 ± 38     | 190 ± 99    | 143 ± 158   | ****   | **     | **     |
| Ácido úrico (mg/dL)              | 4,6 ± 1,2   | 6,3 ± 1,7   | 5,8 ± 1,4   | ***    | ns     | **     |
| Antihipertensivos (%)            | 0           | 44          | 32          | ****   | ns     | ***    |
| Hipolipemiantes (%)              | 0           | 20          | 28          | *      | ns     | **     |
| Fumadores (%)                    | 12          | 24          | 60          | ns     | *      | ns     |
| LTR                              | 23 ± 6      | 42 ± 10     | –           | ****   | –      | –      |

C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. DM: diabetes mellitus, FGE: filtrado glomerular estimado, LTR: *Lifetime Risk* o riesgo estimado a lo largo de la vida mediante QRISK<sup>®</sup>, sCr: creatinina sérica, SM: síndrome metabólico. Los datos se expresan como media ± d.e. o porcentajes.

Paralelamente, dicha selección de proteínas fue analizada a su vez en una cohorte de mediana edad (50-70 años) y otra de edad avanzada (>70 años) para evaluar las posibles variaciones a lo largo de la edad. La distribución por grupos de estas cohortes y sus parámetros clínicos se representan en la **Tabla 9**.

**Tabla 9**

**Datos clínicos de las cohortes de población de mediana y avanzada edad utilizadas durante el análisis por SRM con marcaje isotópico**

| Características clínicas         | MEDIANA EDAD |           |           | EDAD AVANZADA |           |           |
|----------------------------------|--------------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|
|                                  | C            | R         | E         | C             | R         | E         |
| n                                | 28           | 23        | 25        | 25            | 25        | 25        |
| Edad (años)                      | 60 ± 5       | 62 ± 5    | 61 ± 5    | 83 ± 5        | 86 ± 5    | 83 ± 6    |
| Sexo (% hombre)                  | 75           | 91        | 68        | 52            | 48        | 48        |
| Presión sistólica (mmHg)         | 136 ± 11     | 141 ± 14  | 143 ± 16  | 140 ± 23      | 131 ± 21  | 150 ± 27  |
| Presión diastólica (mmHg)        | 80 ± 8       | 81 ± 9    | 84 ± 11   | 76 ± 15       | 71 ± 15   | 77 ± 14   |
| FGE (mL/min/1,73m <sup>2</sup> ) | 81 ± 10      | 75 ± 20   | 77 ± 18   | 75 ± 13       | 40 ± 9    | 66 ± 19   |
| sCr (mg/dL)                      | 0,9 ± 0,2    | 1,1 ± 0,3 | 1,0 ± 0,3 | 0,8 ± 0,2     | 1,4 ± 0,3 | 1,0 ± 0,4 |
| Glucemia (mg/dL)                 | 102 ± 13     | 123 ± 24  | 118 ± 40  | 104 ± 25      | 110 ± 44  | 113 ± 44  |
| SM (%)                           | 50           | 52        | 40        | 52            | 52        | 44        |
| DM (%)                           | 4            | 44        | 28        | 40            | 32        | 40        |
| Colesterol total (mg/dL)         | 180 ± 21     | 171 ± 24  | 157 ± 37  | 144 ± 29      | 145 ± 35  | 145 ± 26  |
| HDL colesterol (mg/dL)           | 54 ± 14      | 51 ± 16   | 52 ± 18   | 44 ± 15       | 45 ± 14   | 41 ± 11   |
| LDL colesterol (mg/dL)           | 105 ± 22     | 95 ± 21   | 80 ± 35   | 79 ± 23       | 70 ± 20   | 78 ± 22   |
| Triglicéridos (mg/dL)            | 109 ± 39     | 131 ± 65  | 126 ± 56  | 110           | 88 ± 37   | 103 ± 43  |
| Ácido úrico (mg/dL)              | 6,2 ± 1,4    | 6,4 ± 1,7 | 6,1 ± 1,4 | 4,9 ± 1,2     | 8 ± 2     | 5,7 ± 1,9 |

C: grupo control, E: grupo con evento CV, R: grupo con factores de riesgo CV, FGE: filtrado glomerular estimado, DM: diabetes mellitus, sCR: creatinina sérica, SM: síndrome metabólico. Los datos se expresan como media ± d.e. o porcentajes.

La selección de proteínas a confirmar en esta segunda fase incluyó 27 proteínas que habían mostrado alteraciones significativas en la fase de descubrimiento y se abordó mediante SRM-LC-MS/MS con marcaje isotópico (M&M, 4.6). Concretamente, se seleccionaron las 16 proteínas que se habían mostrado alteradas al comparar R vs C (**Figura 23A**) (entre las que se encontraban las 6 proteínas asociadas a RCV previamente confirmadas), junto con otras 11 proteínas seleccionadas de entre las que habían resultado alteradas en las comparaciones E vs R y/o E vs C (**Figuras 23B y 23C**). El proceso de priorización llevado a cabo para esta selección, se realizó atendiendo a la tasa de cambio, a la tendencia que presentaban entre los tres grupos clínicos y a la categoría funcional a la que pertenecían (**Tabla 10**). Entre dichas categorías se encontraban algunas de las que durante el análisis de biología de sistemas habían resultado alteradas significativamente en alguna o varias de las comparaciones clínicas, tal y como se especifica en la **Tabla 10**. Entre ellas cabe destacar adhesión, movimiento y migración de células endoteliales, escisión y acumulación de fosfolípidos, trastorno del metabolismo de los lípidos, enfermedad de almacenamiento lisosómico, desarrollo de los vasos sanguíneos y coagulación sanguínea.

**Tabla 10**  
**Selección de proteínas diana para confirmar por SRM-LC-MS/MS con marcaje isotópico.**

| PROT   | vs  | CATEGORIAS FUNCIONALES   |
|--------|-----|--|
| APOA2  | 1   | Señalización en aterosclerosis; Disminución del metabolismo de los ácidos grasos; Señalización y producción de IL-12 en macrófagos   |
| ECP    | 1   |  |
| FETUB  | 1   |  |
| GDF15  | 1   | Preeclampsia (1); Señalización PI3K / AKT  |
| ADX    | 1   | Complejo de ensamblaje proteico (1); Metabolismo de vitaminas (1); Transporte de electrones; Respuesta al estrés oxidativo mediada por NRF2  |
| GUAD   | 1   | Metabolismo de los nucleótidos   |
| NOTCH1 | 1   | Vasculogénesis (1); Desarrollo de vasos sanguíneos (1); Adhesión celular mediada por señalización; Proliferación de células del tejido conectivo   |
| IPSP   | 1   | Unión celular (1); Trombosis   |
| TICN2  | 1   |  |
| IGFBP7 | 1   | Hemangioma (1); Vasculogénesis (1); Adhesión de células endoteliales (1); Desarrollo de vasos sanguíneos (1)   |
| B3AT   | 1   | Adhesión de células sanguíneas; Homeostasis iónica celular   |
| SDCBP2 | 1   |  |
| CTL2   | 1   |  |
| PLSCR1 | 1   | Coagulación sanguínea (1); Nefropatía diabética  |
| PODXL  | 1/3 | Aparato de Golgi (1); Glomérulo renal (1); Migración celular   |
| HLA-A  | 1/3 | Complejo mayor de histocompatibilidad I (3); Vía de ubiquitinación de proteínas (3); Beta-2-microglobulina; Activación de células sanguíneas; Metabolismo de los carbohidratos; Movilización de calcio   |
| TNR5   | 2   | Escisión de fosfolípidos (2); Síntesis de glicolípidos; Receptor de citoquinas; Homeostasis iónica de las células; Hidrólisis de lípidos; Vía de señalización mediada por citoquinas y quimioquinas; Unión de leucocitos   |
| LDLR   | 2   | Activación TR/RXR (2)  |
| GALC   | 2   | Acumulación de lípidos (2); Metabolismo de los carbohidratos; Trastorno del metabolismo de los lípidos (2); Enfermedad de almacenamiento lisosómico (2)  |
| PEPC   | 2/3 |  |
| KPCA   | 2/3 | Vasculogénesis (2), Migración de células endoteliales (2); Serina/treonina proteína quinasa soluble (2,3); Proteína de unión selectiva a calcio (2,3); Desarrollo de los vasos sanguíneos (2); Movimiento de células endoteliales (2); Angiogénesis (2); Receptor ionotrópico de glutamato AMPA 4 (2,3), Desarrollo del sistema cardiovascular; Adhesión de células endoteliales (3); Síntesis y metabolismo de especies reactivas de oxígeno; Señalización mTor |
| TPP1   | 2/3 | Enfermedad de almacenamiento lisosómico (2,3), Enfermedad oclusiva arterial periférica   |
| MASP2  | 3   |  |
| PCYOX  | 3   | Activación LXR/RXR   |
| BHMT2  | 3   | Metabolismo de los aminoácidos (3)   |
| BHMT1  | 3   | Metabolismo de los aminoácidos (3)   |
| NCHL1  | 3   |  |

PROT: Nombre de entrada en UniProt; vs: comparación clínica en la que la proteína mostró una alteración significativa en la fase de descubrimiento: 1=R vs C, 2=E vs R y 3=E vs C. Las categorías funcionales relacionadas con cada una de las proteínas indican entre paréntesis si resultaron alteradas significativamente (p valor < 0,05) en alguna comparación, y en cuál, durante el análisis de biología de sistemas.

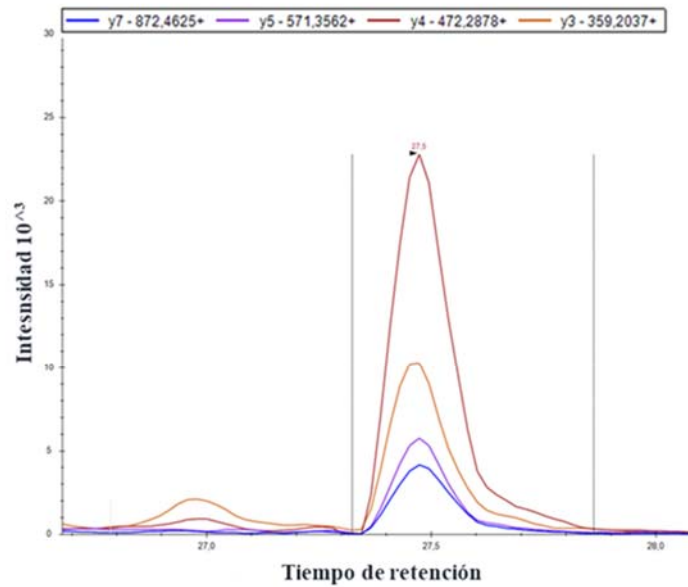
Una vez definido el listado de proteínas a analizar, se seleccionaron, de entre los péptidos proteotípicos de cada una de ellas, aquellos que cumplieran los criterios teóricos necesarios para su análisis por SRM-LC-MS/MS con marcaje isotópico (M&M, 4.6.2), obteniendo péptidos válidos para la cuantificación para 21 de las 27 proteínas. Tras realizar pruebas de sintonización con varias muestras representativas de todos los grupos clínicos y cohortes de edad, los resultados de estos experimentos determinaron que era posible medir 14 de las 21 proteínas, ya que algunos péptidos daban problemas de interferencia o los niveles de péptidos endógenos estaban por debajo del límite de detección. El listado final de proteínas y péptidos analizados se representan en la **Tabla 11** y las transiciones seleccionadas para la cuantificación de cada péptido se representan en la **Tabla Suplementaria 5**.

**Tabla 11**  
Selección final de proteínas/péptidos para el análisis por SRM-LC-MS/MS con marcaje isotópico en las tres cohortes de edad

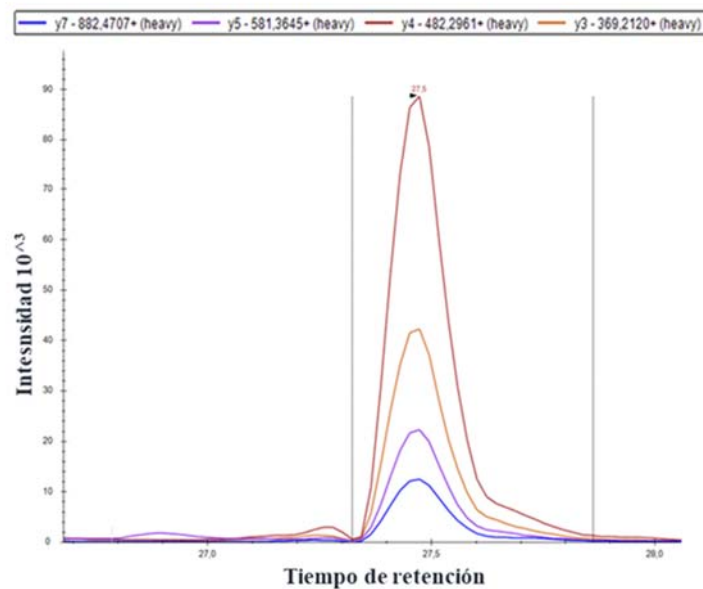
| UniProt | Abreviatura | Proteína   | Péptido                            |
|---------|-------------|--|------------------------------------|
| O00187  | MASP2       | Lectina serín proteasa de unión a manano 2             | LASPGFPGGEYANDQER                  |
| O00592  | PODXL       | Podocalixina   | LASVPGSQTVVVK                      |
| O14773  | TPP1        | Tripeptidil peptidasa 1                                | LFGGNFAHQASVAR<br>LYQQHGAGLFDVTR   |
| P01892  | HLA-A       | Cadena alfa del antígeno de histocompatibilidad        | FSDAASQR                           |
| P20142  | PEPC        | Pepsinógeno C  | GLLGEFLR<br>SYYSVYDLGNRR           |
| Q8IWA5  | CTL2        | Proteína 2 similar al transportador de colina          | NENKPYLFFYNIVK<br>KPDDLPAFPLFSAFGR |
| Q9H2M3  | BHMT2       | S-metilmetionina-homocisteína S-metiltransferasa 2     | EGFVDLPEYPFGLESR                   |
| Q9UGM5  | FETUB       | Fetuina B  | LVVLPFPK                           |
| Q9UHG3  | PCYOX       | Prenilcisteína oxidasa 1                               | YQSHDYAFSSVEK                      |
| Q9Y2T3  | GUAD        | Guanidino desaminasa                                   | FQNIDFAEEVYTR                      |
| Q16270  | IBP7        | Proteína de unión del factor semejante a la insulina 7 | HEVTGWVLVSPLSK<br>ITVVDALHEIPVK    |
| Q92563  | TICN2       | Testican   | IQIQEAAK                           |
| Q93088  | BHMT1       | Betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1              | QGFIDLPEFPFGLEPR                   |
| Q99988  | GDF15       | Factor de diferenciación del crecimiento 15            | ASLEDLGWADWVLSR                    |

En el análisis de los datos se comprobó que el tiempo de retención del péptido endógeno coincidía con el del péptido sintético y que en ambos casos las diferentes transiciones de cada péptido mantenían la misma intensidad de señal relativa entre ellas (**Figura 32**).

**A**

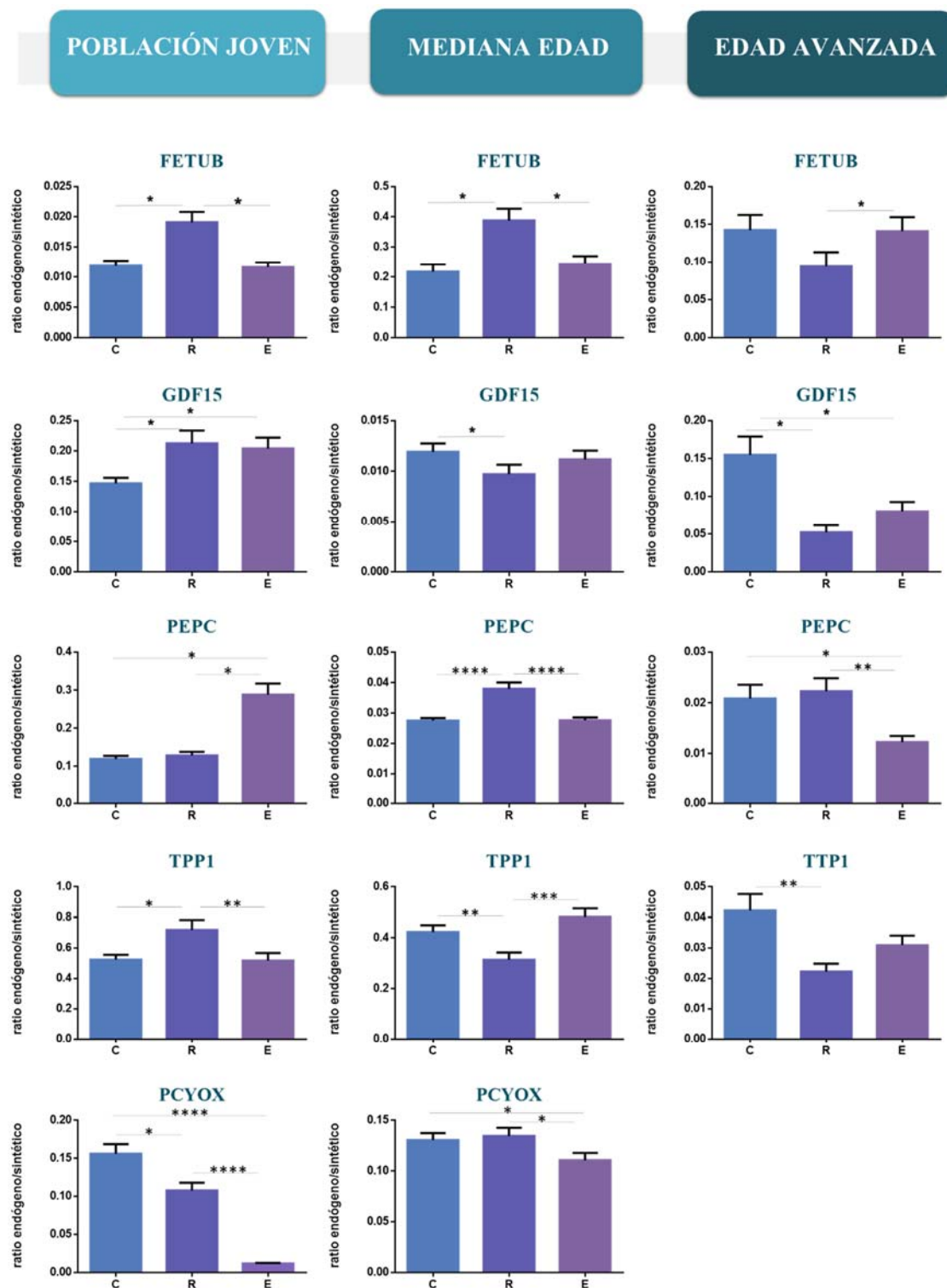


**B**



**Figura 32. Ejemplo de los perfiles cromatográficos obtenidos por SRM-LC-MS/MS para un péptido endógeno y su péptido sintético (marcado isotópicamente).** El tiempo de retención del péptido endógeno (32A) coincide con el del péptido sintético (32B) y en ambos casos las diferentes transiciones de cada péptido mantienen la misma intensidad de señal relativa entre ellas.

Los resultados del análisis revelaron diferentes patrones de comportamiento en algunas proteínas a lo largo de la edad (**Figura 33**).



**Figura 33. Proteínas confirmadas como marcadores de riesgo cardiovascular o daño en diferentes cohortes de edad.** Representación del ratio endógeno/sintético mediante media  $\pm$  SEM. FETUB: fetuina B, GDF15: factor de diferenciación del crecimiento 15, PEPC: pepsinógeno C, PCYOX: prenilcisteína oxidasa 1, TPP1: tripeptidil peptidasa 1. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. Test Mann-Whitney \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

De los 6 biomarcadores de RCV previamente confirmados en población joven (**Figura 28**), sólo pudieron evaluarse FETUB y GDF15, ya que NOTCH1 no pudo ser sintonizada en ese equipo y ADX, GUAD y ECP, mostraron niveles cercanos al límite de detección durante el análisis. Los resultados del análisis confirmaron nuevamente el aumento de FETUB y GDF15 en población joven con factores de RCV, encontrándose también alteradas en las cohortes de mediana y avanzada edad, aunque no siempre con la misma alteración observada en jóvenes (**Figura 33**). Así, en el caso de la FETUB, los resultados mostraron que en población de mediana edad, al igual que sucedía en la población joven, esta proteína presenta niveles elevados en la orina de pacientes del grupo con factores de riesgo al compararlo con los del grupo control (R vs C), los cuales tienden a normalizarse en ambos casos tras sufrir un evento CV (E vs R). Sin embargo, en la población de edad avanzada las alteraciones observadas en esta proteína presentan una tendencia en sentido opuesto, es decir, que los pacientes con riesgo parecen tener niveles más bajos de FETUB en la orina que los controles. Por su parte, GDF15 también mostró diferencias significativas en las tres cohortes de edad, siendo su comportamiento claramente diferente entre los jóvenes y las cohortes de mediana y avanzada edad donde se observó que los niveles de GDF15 disminuían en la comparación R vs C.

En cuanto a las proteínas seleccionadas por haber sido identificadas durante la fase de descubrimiento como proteínas significativamente alteradas en la comparación de E vs R y/o E vs C (**Tabla 10, Figura 23**), los resultados confirmaron en población joven valores aumentados de PEPC en E vs R y en E vs C, disminuidos de TPP1 en E vs R y disminuidos de PCYOX en E vs C). Además, se observaron alteraciones significativas de las proteínas PCYOX y TPP1 al comparar el grupo R vs C, y de PCYOX en E vs R que no habían sido identificadas durante la fase de descubrimiento (**Figura 23**). El análisis de estas 3 proteínas también reveló diferentes patrones de comportamiento a lo largo de la edad. En contra de lo que sucedía en la población joven, las cohortes de mediana y avanzada edad mostraron niveles disminuidos de PEPC en la orina de pacientes que habían superado un evento CV agudo al compararlos con los del grupo de riesgo (E vs R), junto con un aumento de dicha proteína al comparar R vs C en población de mediana edad. En el caso de TPP1, que en población joven se encontraba aumentada al comparar R vs C y disminuida en E vs R, el análisis mostró un comportamiento totalmente opuesto en las cohortes de mediana y avanzada edad, donde dicha proteína disminuye con el RCV y aumenta (significativamente o no) tras sufrir un evento CV agudo. Por lo contrario, la proteína PCYOX mostró una disminución al comparar E vs R tanto en población joven

como de mediana edad, no habiendo sido posible evaluarla en la población de edad avanzada por presentar niveles cercanos al límite de detección.

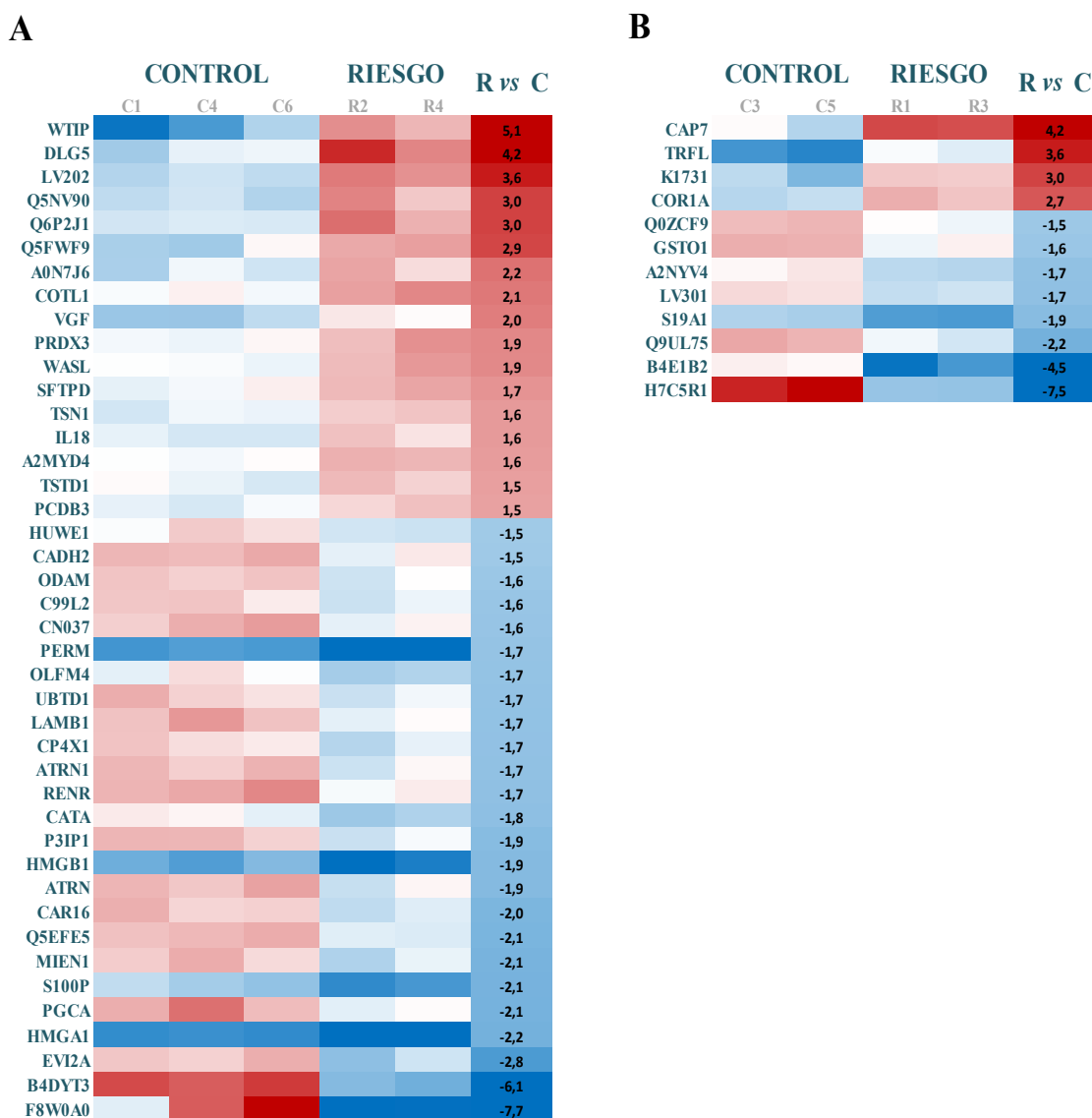
## 5. EL PROTEOMA DE LA ORINA MUESTRA DIFERENCIAS ENTRE HOMBRES Y MUJERES EN SU RESPUESTA AL RIESGO CARDIOVASCULAR

Se realizó un estudio paralelo con el objetivo de determinar si existen diferencias entre el proteoma de la orina de hombres y de mujeres en población joven, y, además, evaluar si sus proteomas se ven alterados de forma diferente como consecuencia del RCV o daño orgánico establecido tras sufrir un evento CV agudo. Para ello, se reanalizaron las 4309 proteínas identificadas en la fase de descubrimiento considerando para ambos análisis a hombres y mujeres como poblaciones independientes. Del mismo modo que cuando se estudió la población conjunta, la diferencia significativa se asumió como una variación de  $Zq \geq |1,5|$  entre los valores promedio de  $Zq$  de los grupos comparados ( $p$  valor  $< 0,05$ ).

En un primer paso, se buscaron diferencias en los niveles mostrados para cada proteína comparando a los hombres *vs* mujeres dentro de cada grupo clínico (C, R y E). En total, los resultados mostraron 528 proteínas con valores significativamente diferentes entre ambos sexos: 147 en el grupo C, 70 en el R y 309 en el E. (**Tablas Suplementarias 6A, 6B y 6C respectivamente**). Entre estas proteínas se encontraban algunas de las previamente confirmadas como biomarcadores de RCV, ya que, pese a ser útil como marcador en ambos sexos, mostraban niveles superiores/inferiores en hombres o mujeres dentro de cada grupo clínico (C, F o E), tal y como ya se había observado al identificar una correlación significativa entre los biomarcadores y el sexo al analizar los parámetros del LTR (**Tabla 6**). En concreto, ECP se mostraba más alta en mujeres que en hombres dentro del grupo C, y lo mismo para FETUB dentro del grupo E.

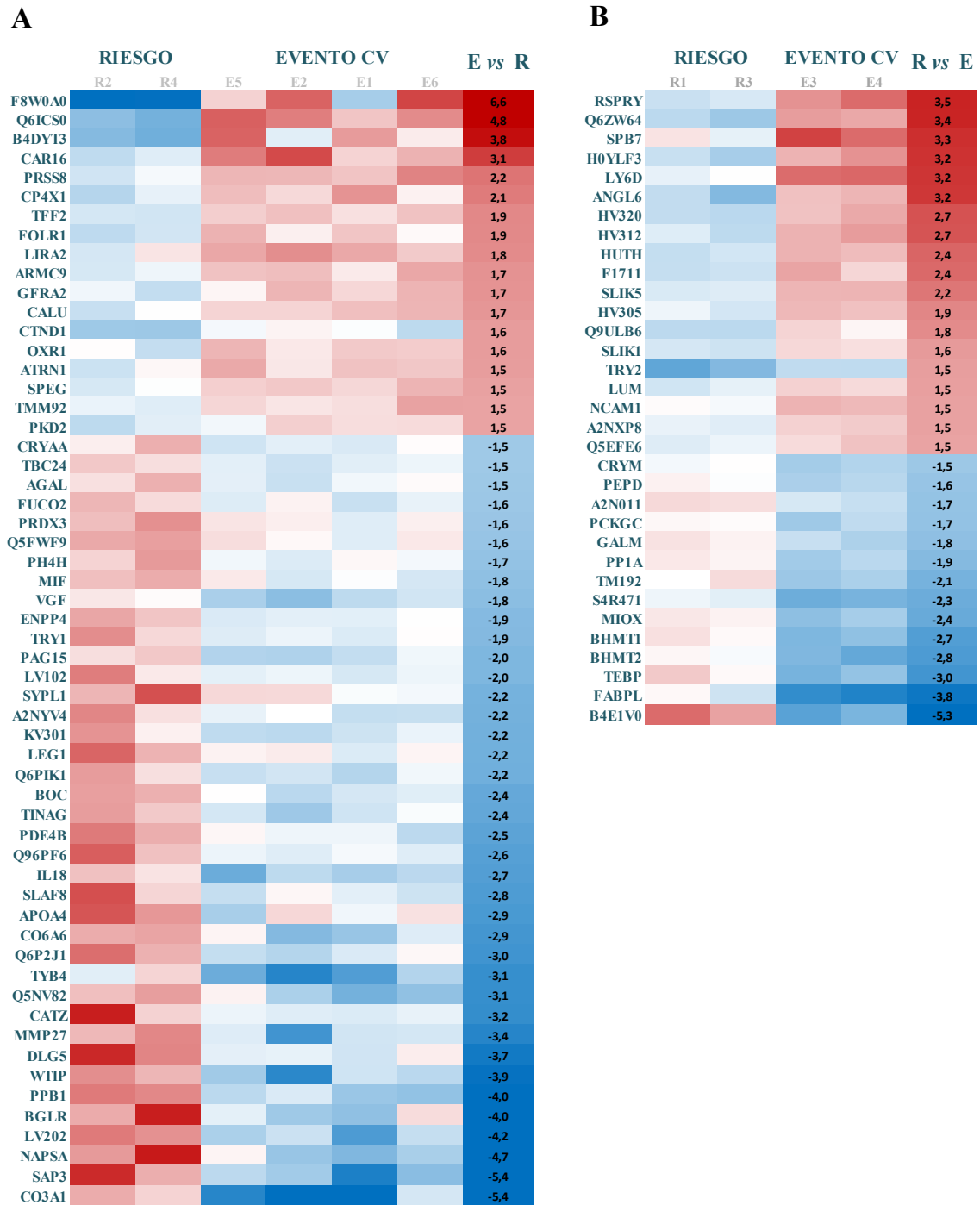
Posteriormente, el listado total de identificaciones se analizó nuevamente en busca de proteínas que mostrasen diferencias significativas entre los grupos clínicos (C, R y E), seleccionando en esta ocasión aquellas diferencias que aparecían exclusivamente en los hombres o en las mujeres, y no al analizar la población de manera conjunta (hombres y mujeres, **Figura 23**). Los resultados del análisis mostraron que existen alteraciones significativas en el proteoma de la orina asociadas a RCV (R *vs* C) o daño orgánico establecido tras un evento CV agudo (E *vs* R), que ocurren de forma específica sólo en

hombres o sólo en mujeres. Concretamente, se encontraron 42 proteínas que presentaban niveles significativamente alterados únicamente al realizar la comparación de los grupos R vs C dentro de la población masculina (**Figura 34A**), y 12 que lo hacían exclusivamente al realizar la misma comparación en la población femenina (**Figura 34B**). Los valores de  $Zq$  de cada réplica biológica, la significación estadística, el número de péptidos identificados para cada una de las proteínas y el identificador en UniProt pueden consultarse en la **Tablas Suplementarias 6D y 6E respectivamente**. De entre las primeras cabe destacar a peróxido reductasa dependiente de tiorredoxina mitocondrial (PRDX3) entre las aumentadas y atractina (ATRN) entre las disminuidas. Entre las proteínas alteradas exclusivamente en mujeres destacan azurocidina (CAP7) y lactoferrina (TRFL), ambas aumentadas en R vs C.



**Figura 34. Proteínas con niveles alterados de forma significativa en la comparación clínica R vs C, únicamente en hombres (A) o únicamente en mujeres (B).** Las proteínas se muestran por su nombre de entrada en UniProt. La abundancia de cada proteína (filas) se expresa en valor de  $Zq$  correspondiendo cada columna al valor de una réplica biológica. La diferencia o tasa de cambio entre los grupos clínicos comparados (última columna) se expresa como diferencia del  $Zq$  promedio de las réplicas de cada grupo. Las variaciones se representan en código de color: disminuido en azul (de -4 a 0) y aumentado en rojo (de 0 a +4). C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV.

Del mismo modo, se encontraron 57 proteínas que presentaban niveles significativamente alterados únicamente al realizar la comparación de los grupos E vs R dentro de la población masculina (**Figura 35A**), y 33 que lo hacían exclusivamente al realizar la misma comparación en la población femenina (**Figura 35B**). Los valores de  $Zq$  de cada réplica biológica, la significación estadística, el número de péptidos identificados para cada una de las proteínas y el identificador en UniProt pueden consultarse en la **Tablas Suplementarias 6F y 6G respectivamente**.



**Figura 35. Proteínas con niveles alterados de forma significativa en la comparación clínica E vs R, únicamente en hombres (A) o únicamente en mujeres (B).** Las proteínas se muestran por su nombre de entrada en UniProt. La abundancia de cada proteína (filas) se expresa en valor de  $Zq$  correspondiendo cada columna al valor de una réplica biológica. La diferencia o tasa de cambio entre los grupos clínicos comparados (última columna) se expresa como diferencia del  $Zq$  promedio de las réplicas de cada grupo. Las variaciones se representan en código de color: disminuido en azul (de - 4 a 0) y aumentado en rojo (de 0 a +4). C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV.

# Resultados II

---

**EL METABOLOMA DE LA ORINA  
REFLEJA RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO ORGÁNICO  
CON ALTERACIONES QUE VARÍAN A LO LARGO DE LA EDAD**



**Resultados parciales de esta sección han dado lugar al artículo científico  
“Metabolic signatures reflect cardiovascular risk in urine with specific profiles in the  
youngest, middle-age population and the elderly”**

*Journal of Molecular Medicine.* 98 (11) (2020) 1603-1613

**Anexo III**



## 1. ALTERACIONES DEL PERFIL METABÓLICO EN LA ORINA DE POBLACIÓN JOVEN ASOCIADAS A RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO ORGÁNICO ESTABLECIDO

La fase de descubrimiento de la aproximación metabólica para la identificación de metabolitos marcadores de RCV en población joven se abordó mediante RMN incluyendo un total de 34 sujetos de dicha cohorte: (C)=12; (R)=10; (E)=12), tal y como se detalla en la **Tabla 12** junto con los parámetros clínicos. Como ya se había observado durante el proceso de identificación de biomarcadores proteicos, los parámetros clínicos de la cohorte reflejan la selección poblacional estratificada por RCV que se había llevado a cabo para la definición de los grupos clínicos (C, R y E), observándose entre ellos diferencias (significativas o no) fundamentalmente en el perfil lipídico, presión arterial y glucemia, sin que hubiera pérdida de función renal significativa. Nuevamente, tal y como se esperaba, los valores de LTR resultaron superiores en los individuos con factores de riesgo conocido frente a los controles sanos (R:34±8 vs C:24±7).

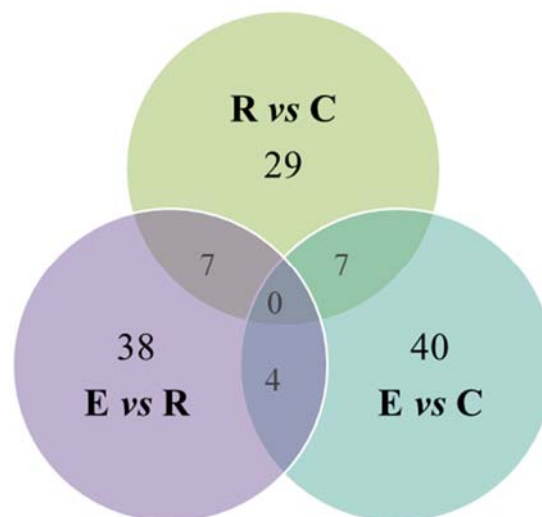
**Tabla 12**

**Datos clínicos de la cohorte de población joven utilizada durante la fase de descubrimiento en la aproximación metabólica**

| Características clínicas         | C         | R           | E         | R vs C | E vs R | E vs C |
|----------------------------------|-----------|-------------|-----------|--------|--------|--------|
| n                                | 12        | 10          | 12        | –      | –      | –      |
| Edad (años)                      | 42 ± 6    | 45 ± 6      | 45 ± 6    | ns     | ns     | ns     |
| Sexo (% hombre)                  | 50        | 40          | 67        | ns     | ns     | ns     |
| Presión sistólica (mmHg)         | 113 ± 9   | 130 ± 8     | 122 ± 16  | **     | ns     | ns     |
| Presión diastólica (mmHg)        | 73 ± 8    | 84 ± 9      | 75 ± 10   | *      | ns     | ns     |
| FGE (mL/min/1,73m <sup>2</sup> ) | 92 ± 9    | 95 ± 19     | 98 ± 27   | ns     | ns     | ns     |
| sCr (mg/dL)                      | 0,9 ± 0,1 | 0,81 ± 0,13 | 0,9 ± 0,2 | ns     | ns     | ns     |
| Glucemia (mg/dL)                 | 80 ± 7    | 100 ± 41    | 100 ± 24  | ns     | ns     | *      |
| SM (%)                           | 8         | 10          | 0         | ns     | ns     | ns     |
| DM (%)                           | 0         | 10          | 0         | ns     | ns     | ns     |
| Colesterol total (mg/dL)         | 193 ± 29  | 211 ± 38    | 158 ± 36  | ns     | *      | *      |
| HDL colesterol (mg/dL)           | 69 ± 18   | 54 ± 15     | 43 ± 10   | ns     | ns     | ***    |
| LDL colesterol (mg/dL)           | 108 ± 31  | 132 ± 32    | 90 ± 33   | ns     | *      | ns     |
| Triglicéridos (mg/dL)            | 86 ± 46   | 140 ± 110   | 121 ± 72  | ns     | ns     | ns     |
| Ácido úrico (mg/dL)              | 4,9 ± 1,4 | 5,1 ± 1,0   | 5,7 ± 1,4 | ns     | ns     | ns     |
| Antihipertensivos (%)            | 0         | 63          | 17        | **     | ns     | ns     |
| Hipolipemiantes (%)              | 0         | 13          | 8         | ns     | ns     | ns     |
| Fumadores (%)                    | 0         | 38          | 50        | *      | ns     | *      |
| LTR                              | 24 ± 7    | 34 ± 8      | –         | *      | –      | –      |

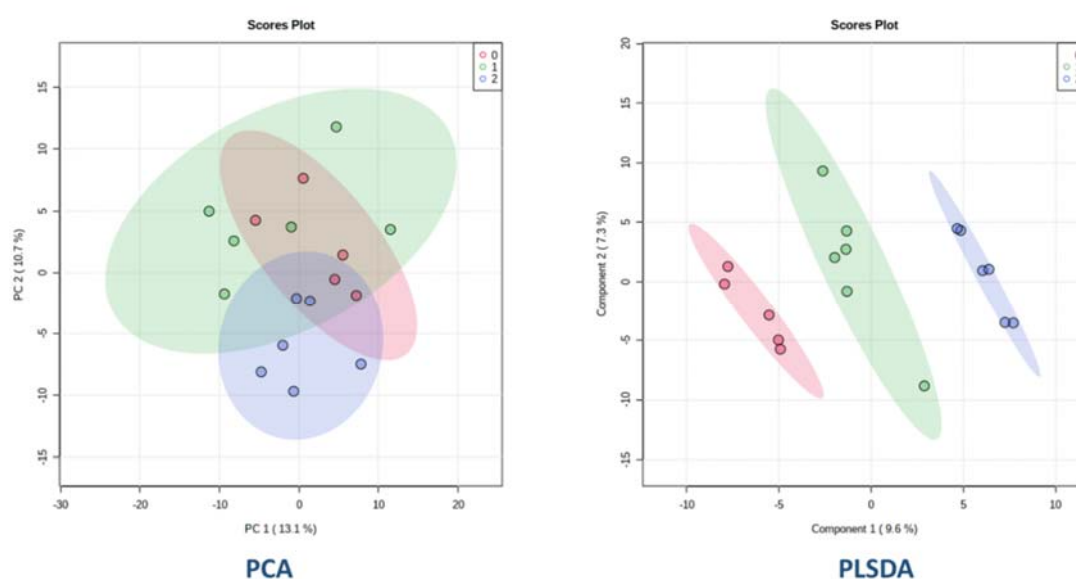
C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. DM: diabetes mellitus, FGE: filtrado glomerular estimado, LTR: *Lifetime Risk* o riesgo estimado a lo largo de la vida mediante QRISK<sup>®</sup>, sCr: creatinina sérica, SM: síndrome metabólico. Los datos se expresan como media ± d.e. o porcentajes

El análisis diferencial del metaboloma de la orina mediante RMN señaló un total de 107 desplazamientos químicos que mostraban diferencias significativas ( $p$  valor  $< 0,05$ ) entre los grupos clínicos (**Tabla Suplementaria 7**). En concreto, se encontraron 29, 38 y 40 desplazamientos químicos significativamente diferenciales para las comparaciones R vs C, E vs R y E vs C, respectivamente, siendo algunos de ellos comunes, tal y como se muestra en la **Figura 36**.



**Figura 36. Desplazamientos químicos alterados en función del riesgo cardiovascular.** El diagrama representa el número de desplazamientos químicos significativamente diferenciales para cada comparación clínica y los comunes entre ellas (R vs C, E vs R y/o E vs C). C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV.

Los resultados de los análisis PCA y PLS-DA mostraron una mejor separación de los grupos en segundo caso (**Figura 37**).



**Figura 37. Análisis de componentes principales (PCA) y análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales-análisis discriminante (PLS-DA) generados a partir de los datos de RMN.** rojo: grupo control; verde: grupo de riesgo; azul: grupo evento.

Seguidamente, se llevó a cabo un análisis por 2D-RMN centrándonos en la identificación de los metabolitos asociados a los 29 desplazamientos que se habían mostrado alterados en relación con el RCV (R vs C) por ser uno de los objetivos más importantes de esta Tesis Doctoral dirigido a una atención más temprana y personalizada (**Tabla 13**).

**Tabla 13**

**Listado de desplazamientos químicos que resultaron diferenciales en el análisis por RMN en la comparación R vs C**

| R vs C |         |      |         |      |         |      |         |
|--------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|
| ppm    | p valor | ppm  | p valor | ppm  | p valor | ppm  | p valor |
| 9,32   | 0,04    | 7,36 | 0,05    | 3,68 | 0,006   | 1,49 | 0,008   |
| 8,92   | 0,03    | 7,18 | 0,04    | 3,59 | 0,008   | 1,13 | 0,04    |
| 8,22   | 0,01    | 7,02 | 0,03    | 3,02 | 0,02    | 1,1  | 0,04    |
| 7,99   | 0,01    | 6,91 | 0,03    | 2,59 | 0,05    | 1,05 | 0,03    |
| 7,6    | 0,0002  | 6,89 | 0,01    | 2,45 | 0,04    | 0,89 | 0,03    |
| 7,44   | 0,0005  | 5,81 | 0,01    | 2,31 | 0,0003  |      |         |
| 7,42   | 0,0002  | 5,62 | 0,04    | 2,28 | 0,0002  |      |         |
| 7,38   | 0,00005 | 4,49 | 0,04    | 1,96 | 0,04    |      |         |

Desplazamientos químicos experimentales expresados en ppm ordenados de mayor a menor. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV.

Así, mediante experimentos de correlación COSY, TOCSY y HSQC, se logaron asignar de forma inequívoca dichos desplazamientos químicos a los 17 metabolitos que se representan en la **Tabla 14**. En concreto, los metabolitos identificados fueron: 1-glicilprolina, 1-metilhistidina, 1-metilnicotinamida, 2-hidroxi-butirato, 3-clorotirosina, ácido gamma-aminobutírico (GABA), glutamina, hipoxantina, histamina, indoxilsulfato, kinurenina, metilamina, N-acetilglutamina, treitol, uracilo,  $\alpha$ -cetoglutarato y  $\alpha$ -fenilacetilglutamina.

**Tabla 14**  
**Metabolitos asignados a los desplazamientos químicos diferenciales en la comparación R vs C**

| METABOLITOS                    | Desplazamientos químicos teóricos (HMDB)  |
|--------------------------------|---|
| 1-glicilprolina                | 1,16 (m); 1,92 (m); <b>1,97*</b> (d); 1,99 (s); 2,24 (m); 3,55 (m); 3,94(s)   |
| 1-metilhistidina               | 3,06 (q); 3,16 (q); <b>3,69*</b> (s); 3,96 (t); 6,99* (s) 7,89 (s)  |
| 1-metilnicotinamida            | <b>4,47*</b> (s); 8,17 (t); 8,89* (d); 8,96 (d); 9,27 (s)   |
| 2-hidroxiacetato               | <b>0,89</b> (m); 1,64 (m); 3,98 (t)   |
| 3-clorotirosina                | <b>3,01*</b> (dd); 3,14 (dd); 4,10 (dd); <b>6,90*</b> (d); <b>7,02*</b> (dd); <b>7,20</b> (d)   |
| GABA                           | 1,89 (m); <b>2,28*</b> (t); <b>3,00*</b> (t)  |
| Glutamina                      | 2,13 (m); <b>2,45*</b> (m); 3,77 (t)  |
| Hipoxantina                    | 8,18 (s); <b>8,22*</b> (s)  |
| Histamina                      | <b>3,03</b> (m); 3,29 (t); 7,14 (s); <b>7,99*</b> (s)   |
| Indoxilsulfato                 | <b>7,20</b> (dd); 7,28 (dd); <b>7,36*</b> (s); 7,50 (d); 7,71 (d)   |
| Kinurenina                     | <b>3,69*</b> (q); 3,72 (q); 4,14 (t); 6,78 (m); 6,86 (m); <b>7,36*</b> (m) 7,81 (m)   |
| Metilamina                     | <b>2,59</b> (s)   |
| N-acetilglutamina              | 1,91 (m); 2,02 (s); 2,11 (m); <b>2,31</b> (dt); 4,15 (t)  |
| Treitól                        | 3,61 (m); <b>3,70</b> (m); 3,65 (m); 3,77 (d)   |
| Uracilo                        | <b>5,79*</b> (d); 7,52 (d)  |
| $\alpha$ -cetoglutarato        | <b>2,43*</b> (t); 2,99* (t)   |
| $\alpha$ -fenilacetilglutamina | <b>0,89*</b> (m); 1,33 (m); 1,55 (m); 1,92 (m); 2,11 (m); <b>2,26*</b> (t); <b>3,66</b> (q); 4,18 (m); <b>7,36*</b> (t); <b>7,42*</b> (t) |

En negrita los desplazamientos químicos teóricos de cada metabolito coincidentes con los identificados mediante RMN considerando una ventana espectral de 0,04 ppm. Marcados con \* los desplazamientos químicos teóricos identificados de forma inequívoca mediante los experimentos de 2D-RMN. HMDB: *Human Metabolome Database*, GABA: ácido gamma-aminobutírico, s:singlete, d:doblete, dd:doblete de dobles, dt:doblete de tripletes, t: triplete, m: multiplete, q: quintuplete

Con objeto de establecer las condiciones óptimas de medida para su análisis cuantitativo mediante SRM-LC-MS/MS, se llevó a cabo un proceso de sintonización para cada uno de los metabolitos identificados (M&M, 5.3.2). Las condiciones seleccionadas se muestran en la **Tabla Suplementaria 8**, a excepción de la metilamina que, dado su pequeño tamaño, no pudo ser analizada por SRM.

## 2. EL PERFIL METABÓLICO DEL RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA ORINA VARÍA A LO LARGO DE LA VIDA

Tal y como se ha detallado previamente (M&M, 5.2), junto al análisis de confirmación de los 16 metabolitos que mostraron alteraciones asociadas a RCV en población joven, el cual se abordó mediante SRM-LC-MS/MS, se añadió una selección de 18 metabolitos previamente asociados a RCV en otros estudios de nuestro laboratorio (**Tabla 15**), cuyas condiciones de medida se muestran también en la **Tabla Suplementaria 8**. Los 34 metabolitos se analizaron en la orina de los 234 sujetos previamente reclutados para la evaluación a lo largo de la edad de los marcadores proteicos, entre los que se incluía una cohorte de población joven, una de mediana edad y otra de edad avanzada. La distribución por grupos de estas cohortes y sus parámetros clínicos se han representado previamente en las **Tablas 8 y 9**. Dicha cohorte de población joven incluía a los individuos reclutados para la fase de descubrimiento de metabolitos mediante RMN.

**Tabla 15**  
**Selección de metabolitos previamente asociados a RCV en estudios de nuestro laboratorio**

| METABOLITO        | Aterosclerosis temprana |              |              | ERC+ECV<br>orina | HTA+<br>albuminuria |
|-------------------|-------------------------|--------------|--------------|------------------|---------------------|
|                   | orina                   | plasma       | aorta        |                  |                     |
| 1-methyl-dantoína | Verde oscuro            |              |              |                  |                     |
| Acetilcolina      |                         | Verde claro  |              |                  |                     |
| Betaína           | Verde oscuro            |              |              |                  |                     |
| Citrato           |                         | Verde claro  |              |                  |                     |
| Colina            |                         | Verde claro  |              |                  |                     |
| Cyclohexanol      | Verde claro             |              |              |                  |                     |
| Glucuronato       |                         | Verde oscuro |              |                  |                     |
| Guanidoacetato    |                         |              | Verde oscuro |                  | Verde claro         |
| Lisina            | Verde claro             |              |              |                  |                     |
| Malato            |                         |              |              |                  | Verde oscuro        |
| Oxaloacetato      |                         |              |              |                  | Verde claro         |
| Pantotoenato      |                         |              |              |                  | Verde claro         |
| Pipecolato        | Verde claro             |              |              |                  |                     |
| Serina            |                         |              |              |                  |                     |
| Tiramine          |                         |              | Verde claro  |                  |                     |
| TMAO              |                         |              |              | Verde oscuro     |                     |
| Treonina          |                         |              | Verde oscuro |                  |                     |

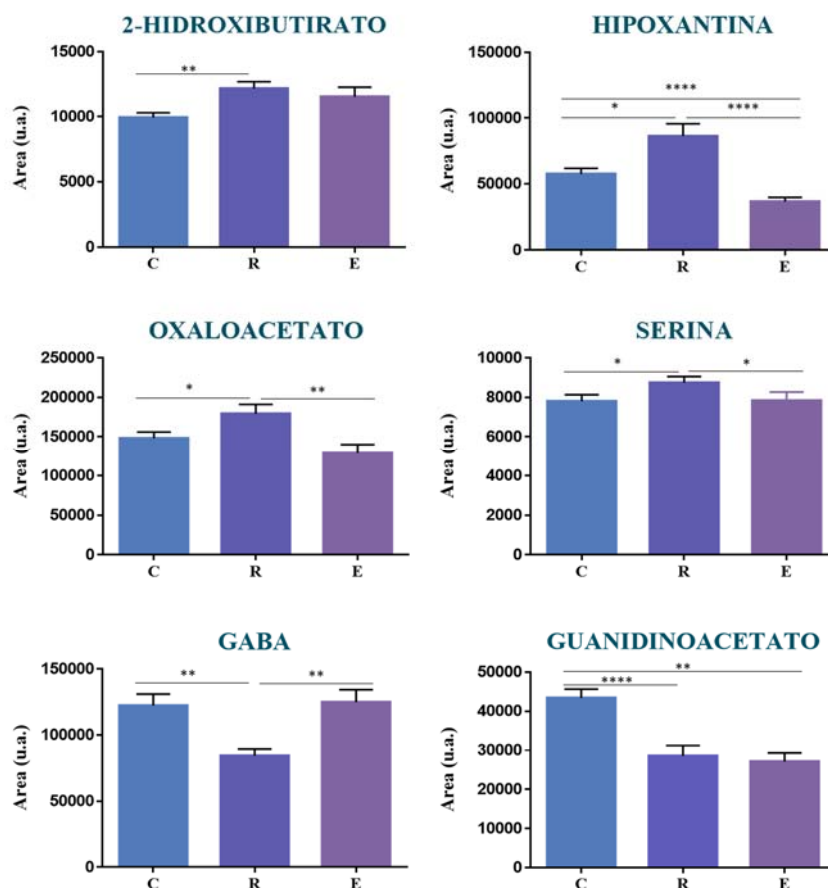
Alteración hallada para cada metabolito en cada condición expresada en color: verde oscuro (aumentado) y verde claro (disminuido). ECV: enfermedad cardiovascular, ERC: enfermedad renal crónica, HTA: hipertensión arterial, TMAO: trimetilamina n-óxido.

Como resultado se identificaron diferentes huellas metabólicas de RCV en función de la edad: una huella con alteraciones específicas de población joven, una huella común entre las

poblaciones de mediana y avanzada edad, una huella particularmente alterada en población de edad avanzada y una huella presente a cualquier edad las cuales se describen a continuación.

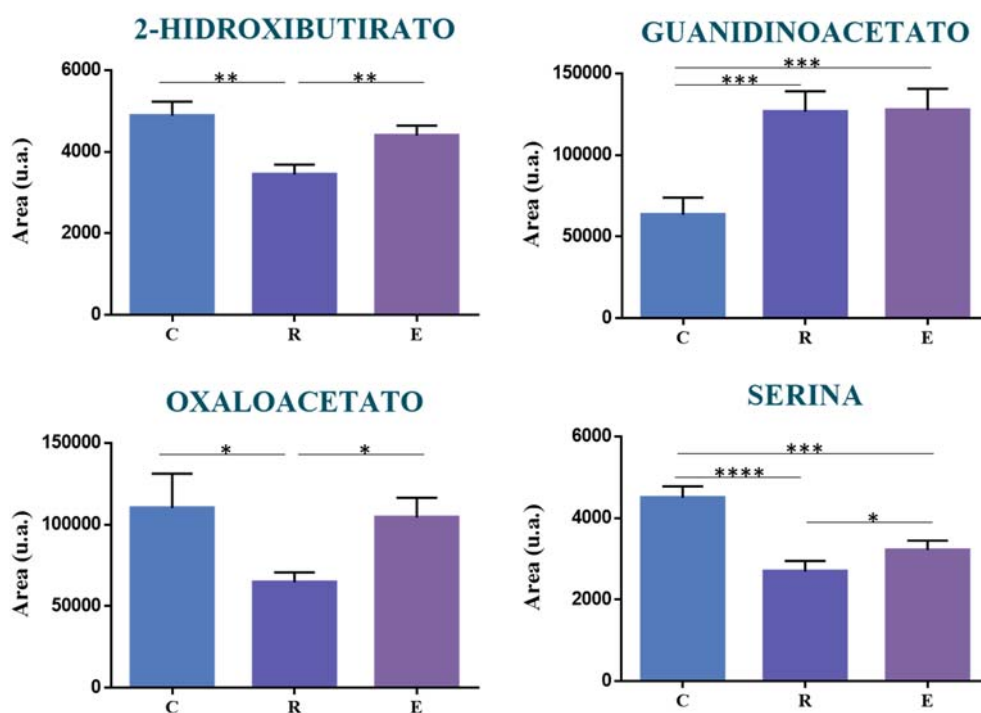
## 2.1. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR ESPECÍFICA DE POBLACIÓN JOVEN

Los metabolitos que se mostraron significativamente alterados en la orina de los individuos jóvenes que tenían factores de RCV con respecto a los controles sanos (R vs C) fueron 2-hidroxiacetato, hipoxantina, oxaloacetato y serina (aumentados), y GABA y guanidoacetato (disminuidos). De forma similar a lo que ocurría con las proteínas marcadoras de RCV, se observaron diferentes comportamientos entre dichos metabolitos, ya que, mientras que hipoxantina, oxaloacetato, serina y GABA tendían a restablecer sus niveles hacia los valores del grupo control una vez superado el evento, 2-hidroxiacetato y guanidoacetato mostraban niveles semejantes en la comparación E vs R (**Figura 38**).



**Figura 38. Metabolitos biomarcadores de riesgo cardiovascular con alteraciones específicas en la orina de la población joven.** Datos de SRM presentados con la media  $\pm$  SEM. GABA: ácido gamma-aminobutírico, C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. Test Mann-Whitney \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

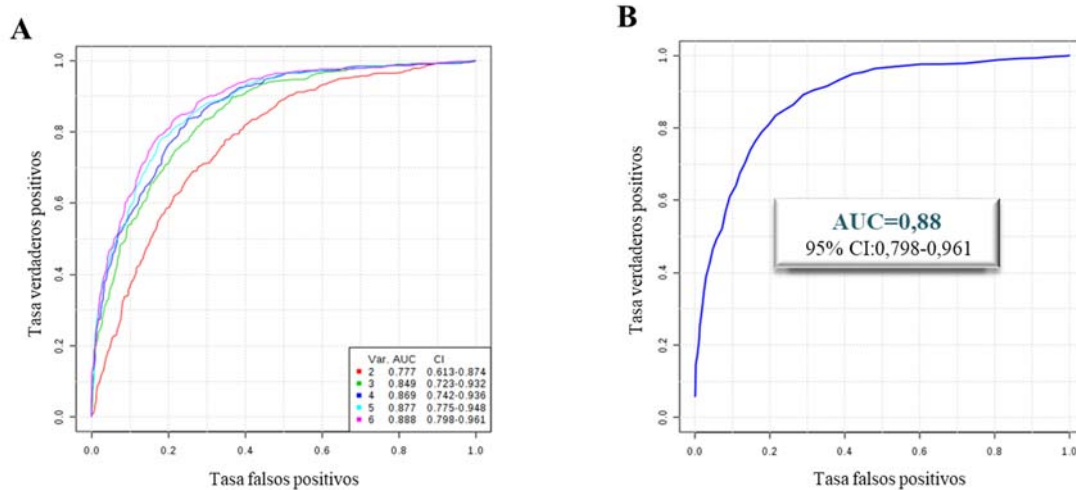
Al analizar estos 6 metabolitos en la cohorte de mediana edad ninguno de ellos se encontraba alterado. Por su parte, el análisis en avanzada edad mostró alteraciones significativas en 2-hidroxiacetato, guanidoacetato, oxaloacetato y serina entre los grupos C, R y E (**Figura 39**), pero con tendencia contraria a la observada en jóvenes (**Figura 38**), por lo que estos 6 metabolitos podrían considerarse como un panel biomarcador de RCV con alteraciones específicas para la población joven.



**Figura 39. Metabolitos alterados en edad avanzada muestran tendencias contrarias a las confirmadas en población joven.** Datos de SRM presentados con la media  $\pm$  SEM. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. Test Mann-Whitney \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 2.1.1. Evaluación del poder diagnóstico de los metabolitos biomarcadores de riesgo cardiovascular en población joven

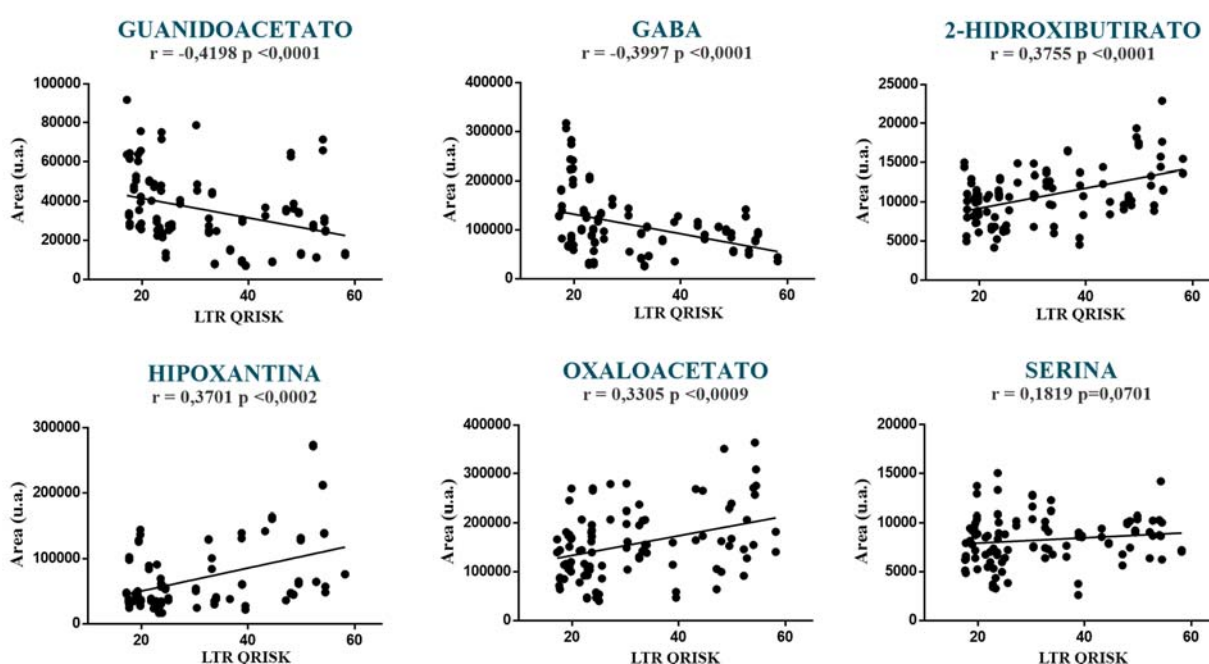
Para evaluar en términos de sensibilidad y selectividad el potencial de estos 6 metabolitos como panel indicador de RCV en población joven, se realizó un análisis de curvas ROC tanto a nivel individual como combinadas en paneles. Los valores AUC obtenidos para cada uno de los metabolitos individualmente fueron, de mayor a menor: guanidoacetato=0,714; 2-hidroxiacetato=0,671; oxaloacetato=0,612; serina=0,608; GABA=0,582 e hipoxantina=0,573. Tal y como se muestra en la **Figura 40A**, el análisis multivariante mostró que el poder de clasificación aumentaba conforme lo hacía el número de metabolitos añadidos al análisis, siendo superior el del panel que combinaba los 6 metabolitos con un AUC=0,88 (**Figura 40B**).



**Figura 40.** Evaluación de la sensibilidad y especificidad clínicas de los metabolitos biomarcadores de riesgo cardiovascular confirmados mediante SRM en población joven. La Figura 43A muestra las curvas ROC individuales para cada metabolito. La Figura 43B muestra la ROC de los 6 metabolitos combinados.

### 2.1.2. Los valores de 5 de los biomarcadores se correlacionan con el riesgo estimado a lo largo de la vida

Al igual que se hizo con los biomarcadores proteicos (Resultados I, 3.1), se investigó la asociación entre la abundancia de cada uno de estos metabolitos marcadores de RCV y los valores de LTR (QRISK®). Los resultados mostraron una correlación significativa para todos ellos, exceptuado la serina, ordenados de mayor a menor  $p$ : guanidoacetato,  $r = -0,4198$   $p < 0,0001$ ; GABA,  $r = -0,3997$   $p < 0,0001$ ; 2-hidroxiacetato,  $r = 0,3755$   $p < 0,0001$ ; hipoxantina,  $r = 0,3701$   $p < 0,0002$  y oxaloacetato,  $r = 0,3305$   $p < 0,0009$  (Figure 41).



**Figure 41.** Correlación entre los valores de metabolitos biomarcadores de riesgo cardiovascular en población joven y el LTR QRISK®.  $r$ : valor de correlación de Spearman, GABA: ácido gamma-aminobutírico.

Posteriormente, se analizó la relación existente entre los 6 metabolitos biomarcadores y los factores de riesgo tradicionales que se utilizan para el cálculo del estimador QRISK®. Los resultados de este análisis se muestran en la **Tabla 16**, existiendo correlaciones positivas con casi todas las variables, siendo la mayor y más significativa la correlación con la relación Col/HDL. En cuanto a la edad, solamente la hipoxantina mostró correlación, indicando así que el comportamiento de estos 6 marcadores es similar entre los individuos pertenecientes a la franja de edad de entre 30 y 50 años.

**Tabla 16**

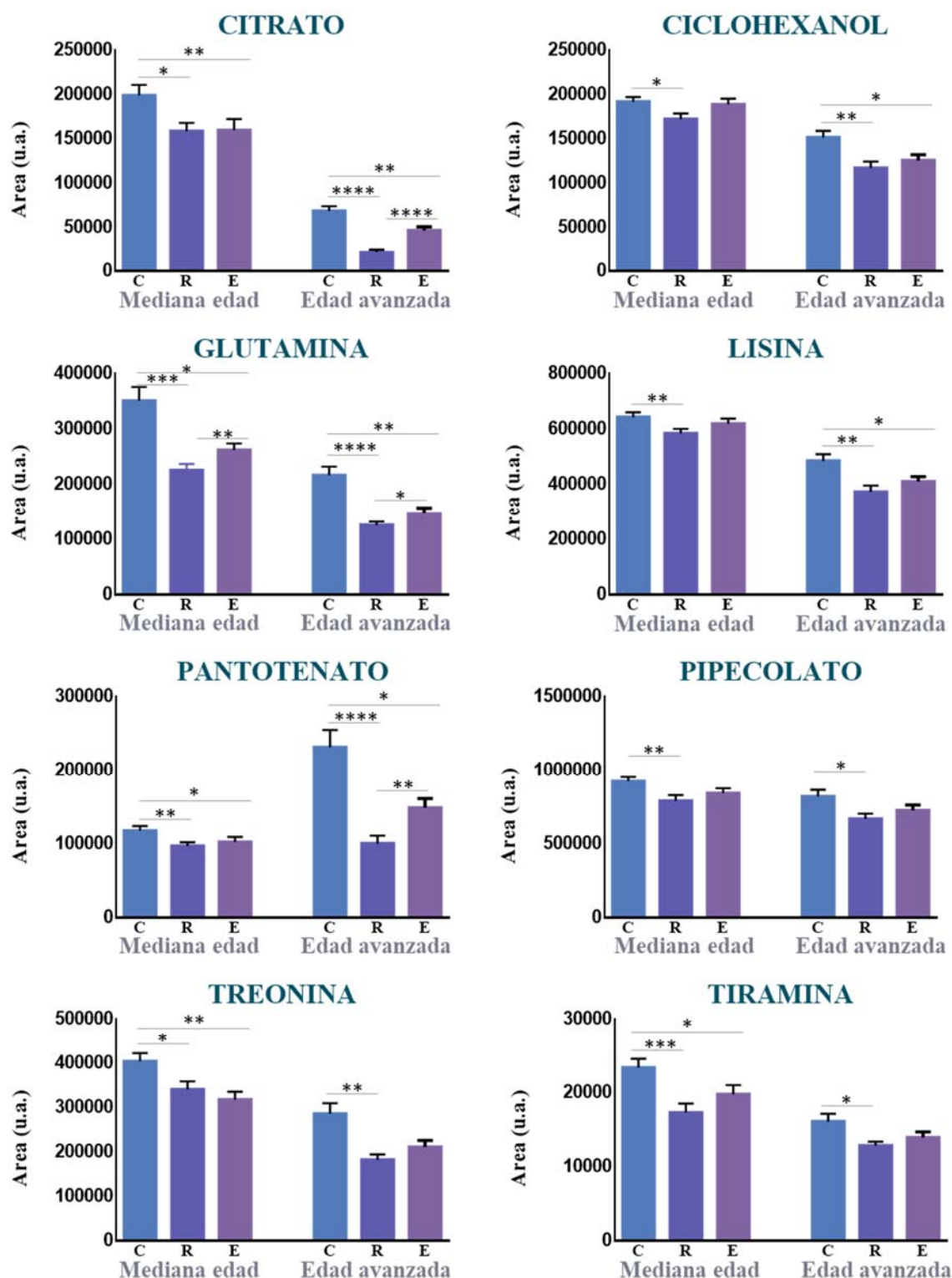
**Correlaciones entre los metabolitos biomarcadores de riesgo cardiovascular y los parámetros individuales utilizados para calcular el QRISK®**

| METABOLITO        |         | EDAD     | SEXO     | FUMADOR  | TTO HTA  | COL/HDL  | PAS      | PESO     |
|-------------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| GABA              | r       | 0,12877  | 0,20617  | -0,09053 | -0,04623 | -0,35511 | -0,42053 | -0,20541 |
|                   | p valor | ns       | *        | ns       | ns       | ***      | ****     | *        |
| 2-Hidroxibutirato | r       | -0,18036 | -0,20480 | 0,03355  | 0,20380  | 0,44189  | 0,21422  | 0,36461  |
|                   | p valor | ns       | *        | ns       | *        | ****     | *        | ***      |
| Hipoxantina       | r       | -0,22859 | -0,45548 | 0,00980  | 0,08380  | 0,42116  | 0,26656  | 0,47722  |
|                   | p valor | *        | ****     | ns       | ns       | ****     | **       | ****     |
| Serina            | r       | 0,01024  | 0,07993  | 0,29706  | 0,23904  | 0,24639  | 0,06403  | 0,07867  |
|                   | p valor | ns       | ns       | **       | *        | *        | ns       | ns       |
| Oxaloacetato      | r       | 0,02484  | -0,14560 | -0,02093 | 0,25512  | 0,36084  | 0,25673  | 0,32020  |
|                   | p valor | ns       | ns       | ns       | *        | ***      | *        | *        |
| Guanidoacetato    | r       | -0,14271 | 0,24986  | 0,00501  | -0,18611 | -0,30254 | -0,40719 | -0,28840 |
|                   | p valor | ns       | *        | ns       | ns       | *        | ****     | *        |

GABA: ácido gamma-aminobutírico, Col/HDL: relación colesterol total/colesterol HDL, PAS: presión arterial sistólica, TTO HTA: tratamiento antihipertensivo, r: coeficiente de correlación de Spearman, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns: no significativo.

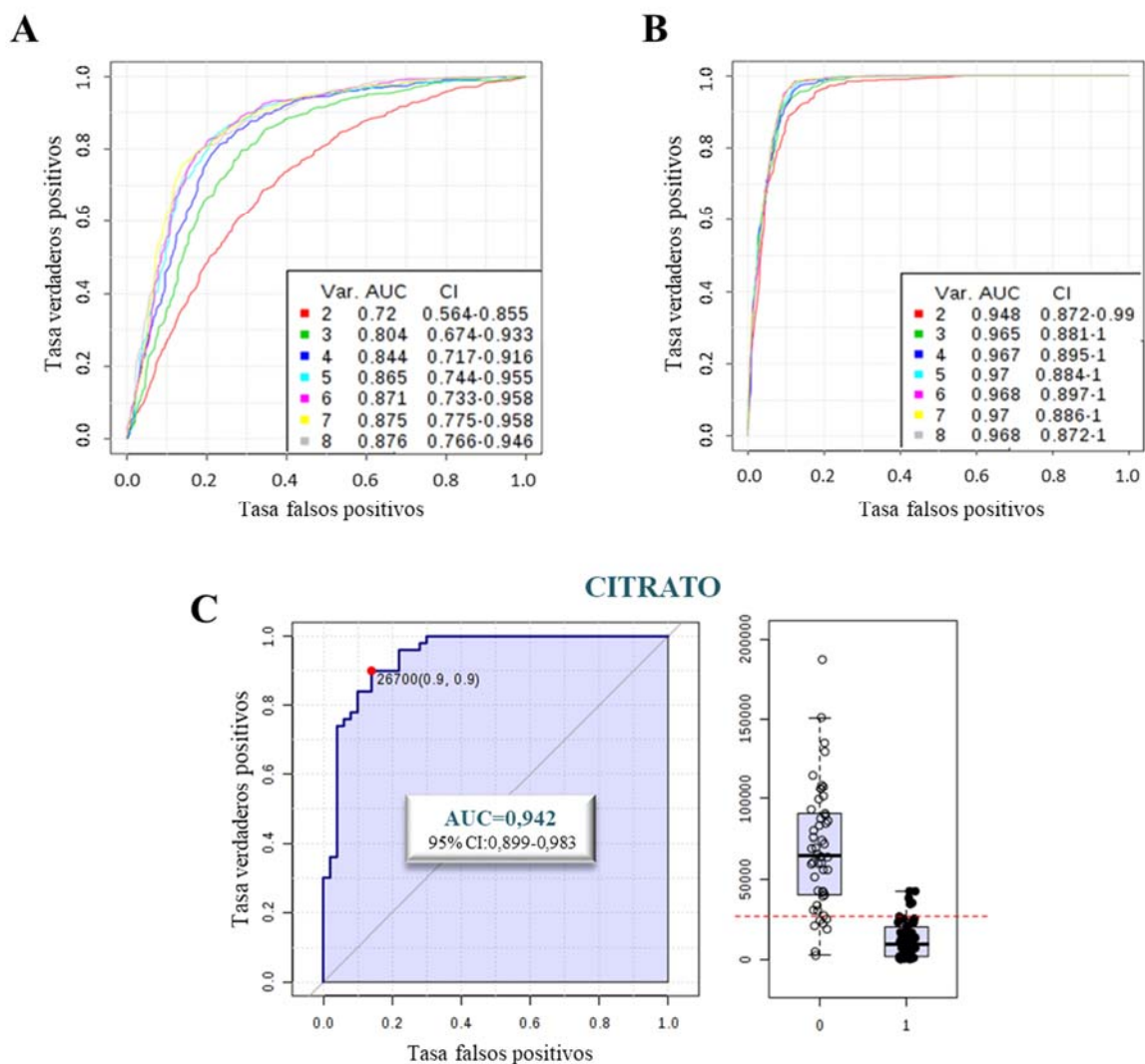
## 2.2. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR COMÚN ENTRE LAS POBLACIONES DE MEDIANA Y AVANZADA EDAD

Entre los 34 metabolitos analizados se identificó una huella metabólica asociada a RCV presente tanto en la cohorte de mediana edad como en la de edad avanzada. En concreto, se observó que citrato, ciclohexanol, glutamina, lisina, pantotenato, pipercolato, treonina y tiramina se mostraban disminuidos en la orina de los individuos del grupo de riesgo con respecto a los controles (R vs C) (**Figura 42**). Curiosamente, la tendencia decreciente en el grupo de riesgo era más pronunciada en los sujetos de edad avanzada que en los de mediana edad para la mayoría de los metabolitos, apuntando a una respuesta agravada con la edad que se ve reforzada por la ausencia de variación en los más jóvenes.



**Figura 42.** Huella metabólica asociada a riesgo cardiovascular común entre las poblaciones de mediana y avanzada edad. Datos de SRM presentados con la media  $\pm$  SEM. C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. Test Mann-Whitney \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

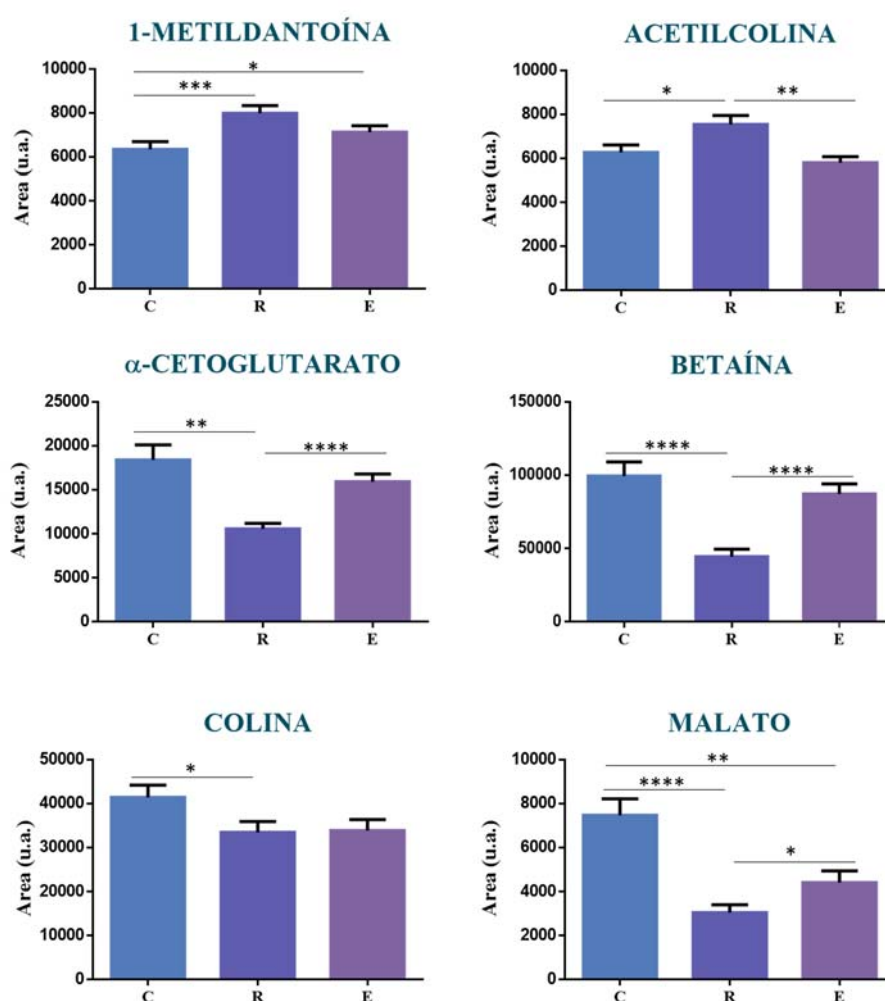
El potencial de estos 8 metabolitos como panel molecular indicador de RCV se evaluó en ambas cohortes por separado, mostrando el análisis de curvas ROC mayor sensibilidad y especificidad en la cohorte de mayor edad (**Figura 43**). Además se observó que, mientras en los individuos de mediana edad el poder de clasificación aumentaba secuencialmente al incluir metabolitos al análisis (de AUC=0,72 a AUC=0,876 si se combinan 2 u 8 metabolitos, **Figura 43A**), en el caso de la población de avanzada edad, el poder de clasificación no variaba drásticamente (de AUC=0,948 a AUC=0,968 si se combinan 2 u 8 metabolitos, **Figura 43B**), debido principalmente al hecho de que el citrato individualmente mostraba como resultado AUC=0,942 (**Figura 43C**).



**Figura 43.** Evaluación de la sensibilidad y especificidad clínicas de los metabolitos presentes en la huella metabólica asociada a riesgo cardiovascular común entre las poblaciones de mediana y avanzada edad. La Figura 43A muestra las curvas ROC individuales para cada metabolito en la población de mediana edad. La Figura 43B muestra las curvas ROC individuales para cada metabolito en la población de edad avanzada. La Figura 43C muestra la ROC del citrato en la población de edad avanzada.

### 2.3. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN EDAD AVANZADA

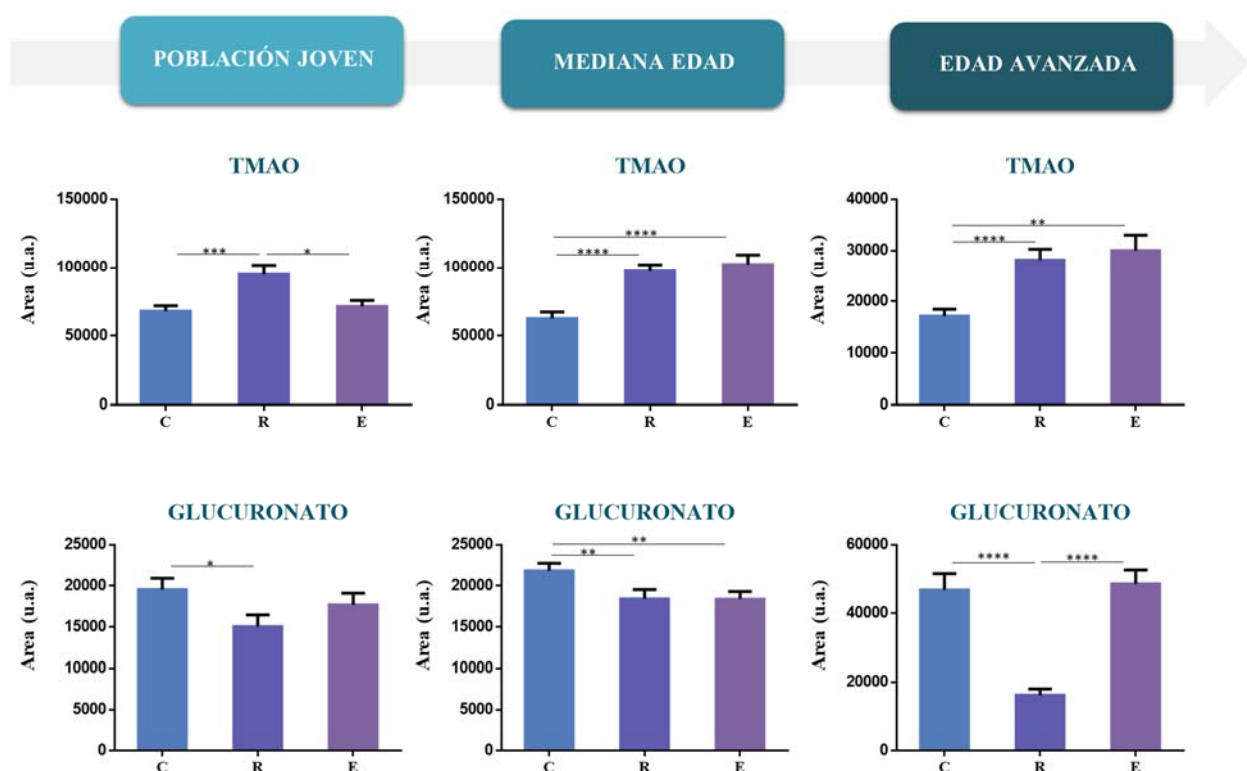
Además de las alteraciones ya comentadas, se identificaron 6 metabolitos con alteraciones particularmente robustas en la orina de la cohorte de edad avanzada. En concreto estos 6 metabolitos se mostraban significativamente alterados en el grupo de riesgo con respecto al grupo control (R vs C): 1-metildantoína y acetilcolina (aumentadas), y  $\alpha$ -cetogluturato, betaína, colina y malato (disminuidos) y, todos ellos (excepto colina) tendían a recuperar los valores del grupo control tras sufrir un evento CV (E vs R), haciéndolo de una forma significativa  $\alpha$ -cetogluturato, acetilcolina, betaína y malato (**Figura 44**).



**Figura 44. Metabolitos alterados en población de edad avanzada.** Datos de SRM presentados con la media  $\pm$  SEM C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. Test Mann-Whitney \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

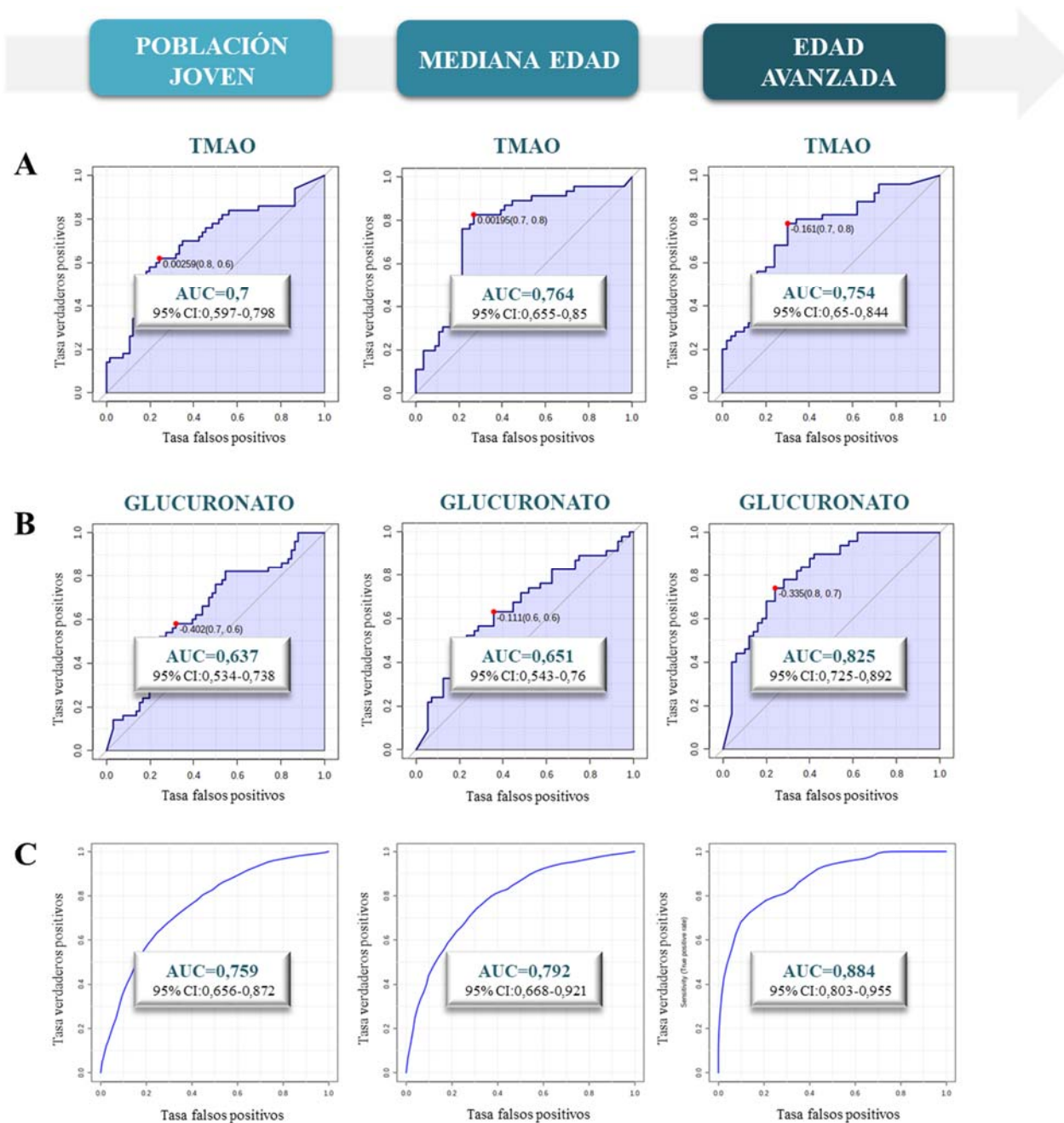
## 2.4. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR MANTENIDA A LO LARGO DE LA VIDA

De todos los metabolitos analizados, sólo TMAO y glucuronato se encontraban alterados en las tres cohortes de población, mostrando en todos los casos valores de TMAO significativamente más altos y de glucuronato significativamente más bajos en el grupo de riesgo con respecto al grupo control (R vs C). Además, como se muestra en la **Figura 45**, dichas alteraciones parecían acusarse más con la edad, revirtiendo significativamente TMAO en población joven y glucuronato en edad avanzada, tras sufrir un evento CV (E vs R).



**Figura 45. Huella metabólica del riesgo cardiovascular en la orina mantenida a lo largo de la vida: población joven, mediana edad y edad avanzada.** Datos de SRM presentados con la media  $\pm$  SEM C: grupo control, R: grupo con factores de RCV, E: grupo con evento CV. TMAO: trimetilamina n-óxido. Test Mann-Whitney \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

El potencial de estos 2 metabolitos se evaluó individualmente y como panel molecular indicador de RCV en las tres cohortes de edad. El análisis de curvas ROC reveló un aumento generalizado de sensibilidad y especificidad a medida que también aumentaba la edad de la cohorte (**Figura 46**), tanto para los metabolitos de forma individual (**Figuras 46A y 46B**), como en el análisis multivariante, el cual mostraba valores de AUC=0,755 en población joven, AUC=0,792 en mediana edad y AUC=0,884 en edad avanzada (**Figura 46C**).



**Figura 46.** Evaluación de la sensibilidad y especificidad clínicas de los metabolitos del riesgo cardiovascular en la orina mantenida a lo largo de la vida. De izquierda a derecha, datos para la población joven, mediana edad y edad avanzada. La Figuras 46A y 46B muestran las curvas ROC para TMAO y glucuronato respectivamente, y la Figura 46C la ROC combinada de ambos metabolitos. en cada una de las 3 poblaciones, individuales para cada metabolito en la población de mediana edad. TMAO: trimetilamina n-óxido.



# Discusión

---



La aterosclerosis comienza inevitablemente en la infancia, “camina” en el adulto al ritmo que le marquen los factores de riesgo, y “explota” de una forma imprevisible. Cursa durante décadas de manera asintomática y silente, pudiendo resultar en un evento CV repentino con consecuencias potencialmente fatales, las cuales representan desde hace años la primera causa de muerte en el mundo. Intervenir en la fase preclínica del proceso aterosclerótico es por tanto crucial para prevenir eventos CV y reducir la mortalidad, requiriendo para ello métodos diagnósticos que permitan predecir y evaluar la enfermedad en estadios tempranos. Encontrar nuevos biomarcadores moleculares fácilmente cuantificables y que permitan estratificar el RCV de una forma más precisa de la que lo hacen los estimadores actuales, posibilitaría la puesta en marcha de terapias personalizadas mucho más efectivas, especialmente en población joven. En esta Tesis Doctoral llevamos a cabo un estudio multiómico en orina con el objetivo principal de identificar biomarcadores de RCV en población joven (30-50 años) y, de forma adicional, evaluarlos a lo largo de la vida, analizándolos para ello en poblaciones de mediana edad (50-70 años) y de edad avanzada (>70 años).

## **1. LOS BIOMARCADORES PROTEICOS DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO IDENTIFICADOS EN POBLACIÓN JOVEN APOYAN UNA INTERVENCIÓN TEMPRANA**

Los resultados del estudio proteómico que llevamos a cabo en población joven mostraron diferentes subconjuntos de proteínas identificadas con niveles alterados en la orina al comparar sujetos con factores de RCV frente a controles sin RCV, y/o frente a quienes habían sufrido un evento CV agudo (**Figura 23**). Del mismo modo, el análisis de biología de sistemas identificó categorías funcionales significativamente alteradas en todas las comparaciones intergrupales (R vs C, E vs R y E vs C) (**Figura 25**). El estudio detenido de estas alteraciones nos indica que el proteoma de la orina refleja cambios proteicos específicos modulados por el RCV y/o daño acumulado antes de sufrir un evento, los cuales pueden revertir tras él (como consecuencia del tratamiento y de la adquisición de hábitos saludables), mantenerse (riesgo residual o daño establecido) o continuar aumentando progresivamente desde el inicio de la aterosclerosis.

Entre las categorías o procesos funcionales que mostraron alteraciones reversibles destacamos respuesta al estrés oxidativo, migración de células endoteliales vasculares, adhesión de células endoteliales y desarrollo de vasos sanguíneos. Con respecto a las que se alteraban de forma progresiva distinguimos dos comportamientos diferentes. Por un lado, encontramos categorías que se alteran de una forma significativa al inicio (R vs C) y continúan con la misma tendencia tras sufrir un evento, como la señalización Wnt o los colágenos tipo III y VI. Por otro lado, se identificaron categorías funcionales que se mostraban alteradas con la misma tendencia en las comparaciones R vs C y E vs R, pero con una progresión más lenta, no llegando a ser una alteración significativa hasta comparar E vs C. Entre estas categorías se encontraban afectación funcional de cardiomiocitos y complejo Emerina 52, el cual parece que juega un papel crucial en el proceso de remodelación cardíaca [97].

La mayoría de proteínas marcadoras de RCV identificadas en esta Tesis Doctoral mostraron alteraciones reversibles, lo que refuerza la idea de que la intervención temprana en la aterosclerosis subclínica podría evitar sufrir un evento CV agudo. En esta línea, un estudio llevado a cabo con el plasma de los mismos sujetos de la cohorte de población joven reclutados para esta Tesis Doctoral, ha determinado que existen péptidos con cisteínas modificables (oxidación) de forma reversible e irreversible, y que a medida que

aumenta el RCV y especialmente tras sufrir un evento CV, el número de modificaciones reversibles de los mismos disminuye aumentando el de las irreversibles [98]. Este hecho indica una oxidación progresiva acorde con la alteración de la homeostasis redox en el desarrollo de la ECV que conlleva una disminución de la capacidad de recuperación y por tanto apoya nuevamente una intervención temprana del RCV en población joven.

De entre los biomarcadores proteicos identificados, creemos que particularmente 6 de ellos servirían para el objetivo principal de esta Tesis Doctoral: poder complementar los estimadores actuales de RCV para mejorar la estratificación del mismo en la población joven. En concreto, nos referimos a las 6 proteínas que desde la fase de descubrimiento mostraron niveles significativamente aumentados en la orina de individuos jóvenes con factores de RCV en comparación con sujetos sin riesgo de la misma edad: ADX, ECP, FETUB, GDF15, GUAD y NOTCH1 (**Figura 28**). De entre ellos, destacamos el valor diagnóstico del panel compuesto por ECP, GDF15 y GUAD por ser la mejor combinación en términos de sensibilidad y especificidad para separar a los sujetos de ambos grupos clínicos (AUC=0,959).

---

**ECP, GDF15 y GUAD**  
**panel con mejor valor diagnóstico para separar a**  
**individuos con RCV de sujetos sin riesgo en**  
**población joven**

---

Al analizar funcionalmente cada una de estas 6 proteínas, encontramos estrés oxidativo e inflamación como los procesos biológicos más relevantes comunes a estos biomarcadores proteicos de RCV. El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la formación de ROS y la capacidad del sistema antioxidante para neutralizarlas [99]. Las ROS se generan de forma natural como subproductos del metabolismo normal del oxígeno y tienen un papel importante en señalización celular y homeostasis en condiciones normales [100]. Sin embargo, en un contexto de inflamación, infección, estrés ambiental o radiación ionizante, los niveles de ROS pueden aumentar drásticamente ocasionando daños importantes a las estructuras celulares. El estrés oxidativo juega un papel crucial en anomalías del corazón y vasculares en diferentes tipos de ECV, donde los miocitos cardiacos y vasculares resultan dañados por el aumento de la formación de ROS y/o

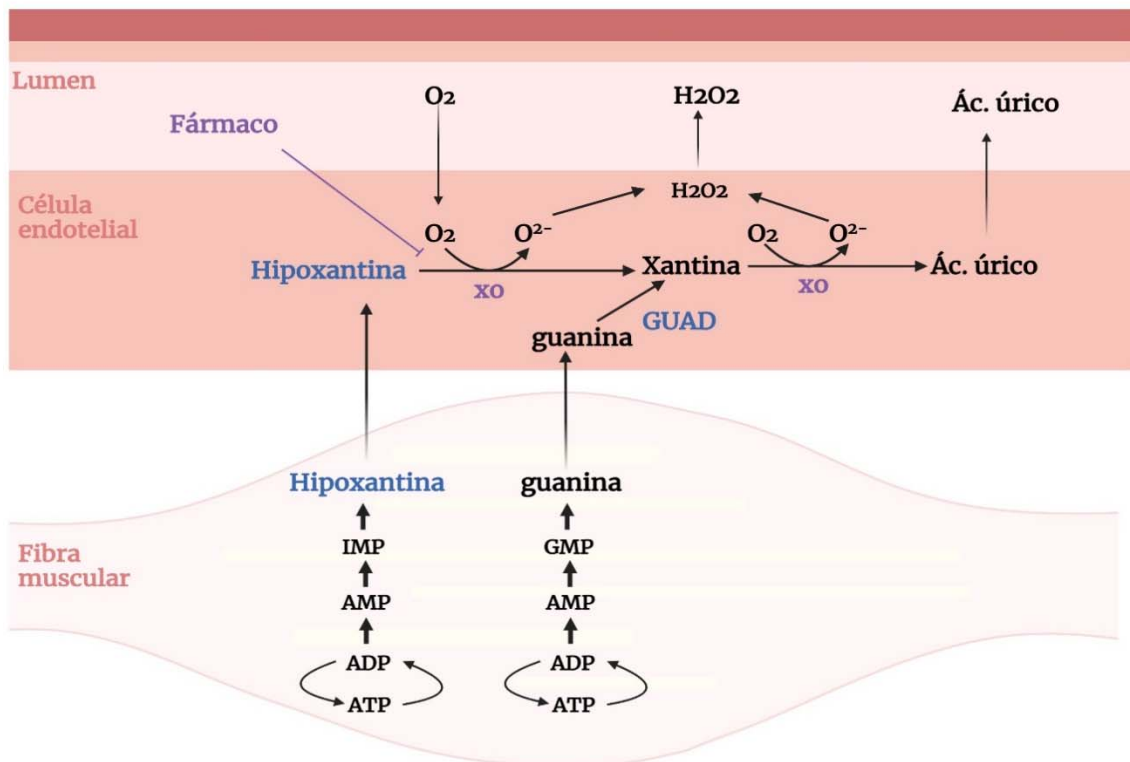
disminución de la reserva antioxidante, generalmente debido a disfunción mitocondrial, secreción de ROS por glóbulos blancos, disfunción endotelial, autooxidación de catecolaminas, así como exposición a la radiación o contaminación del aire [101]. Además, como ya se ha comentado, la aterosclerosis se desarrolla en regiones asociadas a un mayor estrés oxidativo y una menor producción de eNO [102].

---

### **ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN** procesos comunes entre los biomarcadores proteicos de RCV en población joven

---

La proteína **GUAD** es una enzima aminohidrolasa que convierte la guanina en xantina en el ciclo del ácido úrico, en el que también participa la xantina oxidasa, una de las principales fuentes de ROS en el corazón humano, ya que produce  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  mientras cataliza la conversión de hipoxantina en xantina y de xantina a ácido úrico [103]. La hiperuricemia se ha considerado un factor de riesgo clave para el desarrollo de gota, disfunción renal, hipertensión, hiperlipidemia, diabetes y obesidad [103, 104]. Además, los niveles de ácido úrico, incluso por debajo del umbral clínico de hiperuricemia, se asocian con un mayor RCV al aumentar el estrés oxidativo, promover la disfunción endotelial y potenciar la inflamación [105]. En la población estudiada encontramos niveles aumentados de GUAD en la orina de los individuos del grupo de riesgo frente a los controles. Incluso en los sujetos incluidos en la fase de descubrimiento, donde no existían diferencias significativas en la concentración de ácido úrico en la orina o el plasma, ni tomaban tratamiento farmacológico para su disminución, ya pudimos observar una alteración significativa de esta proteína. Este hecho podría apuntar a una sobreexpresión del gen *GUAD* durante esta etapa de RCV temprano, de forma similar al aumento descrito en asociación con el desarrollo de hipertrofia cardíaca hipertensiva o insuficiencia cardíaca diastólica en un estudio con ratas espontáneamente hipertensas [106]. Nuestros resultados parecen indicar por tanto que los niveles aumentados de GUAD en orina son un indicador más temprano que el ácido úrico para señalar una alteración en el metabolismo de las purinas asociada a RCV, y quizá podría utilizarse para modificar la dieta de los pacientes (disminuyendo la ingesta de purinas) o para tratarles antes con inhibidores de la xantina oxidasa impidiendo el aumento del estrés oxidativo, así como de los niveles de ácido úrico y sus complicaciones asociadas (**Figura 47**).



**Figura 47.** Estrés oxidativo y niveles de ácido úrico generados por la acción de la enzima xantina oxidasa y su relación con GUAD e hipoxantina. Fármaco: inhibidor de la xantina oxidasa propuesto ante niveles elevados en orina de GUAD o hipoxantina. GUAD: guanidino desaminasa, xo: xantina oxidasa. Figura adaptada de *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2014;49(6):292-298.

Por su parte, la proteína **GDF15** es expresada y secretada por macrófagos, cardiomiocitos, células de músculo liso vascular, adipocitos y células endoteliales, en respuesta a inflamación, estrés oxidativo, hipoxia o estrés mecánico [107, 108]. Se sabe que regula vías de señalización esenciales para la cardioprotección [109] y, además, se ha demostrado que está fuertemente asociada con eventos CV futuros y complementa a los predictores de riesgo establecidos en el pronóstico de las ECV [110–112], enfermedad renal crónica y fallo renal agudo [113, 114].

En el contexto inflamatorio de la ECV, los macrófagos aumentan la expresión de la quimioquina CCL5 / RANTES, que podría atraer eosinófilos activados a través de su receptor CCR3. Varios estudios han demostrado una asociación entre los eosinófilos y la aterosclerosis coronaria [115, 116]. La proteína **ECP**, que es un marcador de la actividad y degranulación de los eosinófilos, ha sido propuesta como biomarcador de aterosclerosis coronaria [117] y marcador de riesgo de ictus [118]. También se ha descrito un papel

protector de la ECP bajo estrés oxidativo, ya que inhibe la apoptosis inducida por ROS en los cardiomiocitos a través de la vía PI3K-Akt [119].

Respaldando el aumento de las proteínas GDF15 y ECP, el análisis de biología de sistemas mostró respuesta al estrés oxidativo como una categoría funcional significativamente aumentada en individuos con factores de RCV con respecto a los controles. El hecho de que todas ellas se mostrasen disminuidas significativamente en los sujetos recuperados de un evento CV frente a sujetos con RCV, indican que su alteración refleja una situación de RCV modificable.

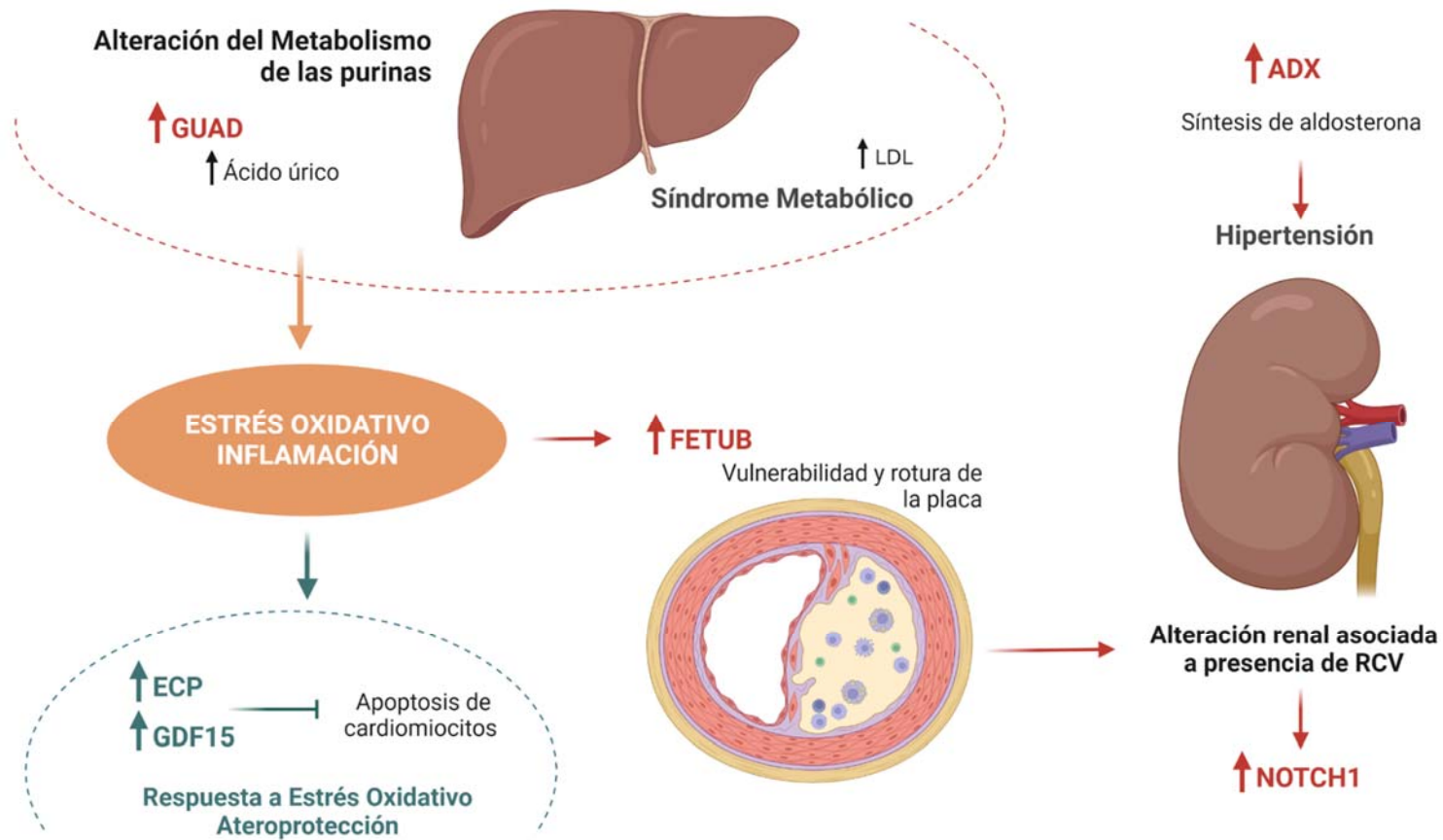
Por su parte, la proteína **FETUB** ha sido propuesta como marcador de enfermedad arterial coronaria, tras haber encontrado niveles séricos significativamente más altos en pacientes con dicha enfermedad respecto a controles sanos [120]. Además, el nivel de expresión de FETUB se incrementó significativamente en pacientes con IAM en comparación con sujetos con angina estable, sugiriendo que la FETUB sérica está involucrada en el desarrollo de IAM al influir en la rotura de la placa aterosclerótica [121]. Recientemente, se han relacionado niveles séricos elevados de FETUB en mujeres con síndrome metabólico y estrés oxidativo, los cuales disminuyeron tras meses de tratamiento y la mejoría asociada de las pacientes. Nuestros datos están alineados con estas observaciones, ya que FETUB se encontró aumentada en la orina de los individuos jóvenes con factores de RCV frente a los sujetos control.

La proteína **NOTCH1** actúa como un antagonista de la activación de las células endoteliales previniendo la inflamación en la aorta, y se ha demostrado que los lípidos circulantes disminuyen su expresión y señalización en las células endoteliales aórticas humanas [122]. A su vez, mientras que una reducción de NOTCH1 endotelial ha sido propuesta como factor predisponente de inicio de la aterosclerosis [122], la expresión y activación de NOTCH1 en podocitos, que en su mayoría está silenciada en los glomérulos del riñón humano maduro normal, se ha correlacionado con el desarrollo de proteinuria, glomeruloesclerosis y disfunción renal [123–125]. Por ello, parece que los niveles elevados de NOTCH1 hallados en la orina en el grupo R vs C, más que un componente vascular, podrían estar indicando afectación renal asociada a la presencia de factores de RCV. Al igual que en la aterosclerosis, la enfermedad renal crónica se desarrolla de forma silenciosa y asintomática durante las etapas tempranas, complicando enormemente un diagnóstico e intervención precoces. Actualmente, la albuminuria se considera un marcador de daño renal y de RCV, incluso en sujetos con un FGE normal (>90

mg/mL/1,73m<sup>2</sup>). Se ha demostrado que la activación sostenida de la señalización de NOTCH1 y la vía Wnt en podocitos está causalmente relacionada con el desarrollo de albuminuria en modelos animales modificados genéticamente [126]. En nuestro estudio también identificamos un aumento significativo en la señalización de Wnt mediante el análisis de biología de sistemas en individuos con RCV, coincidiendo con una regulación positiva de la señalización de Wnt descrita en la aterosclerosis y las enfermedades cardiometabólicas [127–129]. Pese a que los sujetos del grupo con RCV no mostraban albuminuria y su filtrado medio era normal, el análisis de biología de sistemas también detectó una alteración en el comportamiento de las proteínas relacionadas con enfermedad renal crónica, surgiéndola como categoría significativamente aumentada en este grupo en comparación con los controles. Al comparar a los sujetos que se habían recuperado de un evento CV agudo frente al grupo con factores de RCV, se observó una disminución significativa de los niveles de NOTCH1 en dicha comparación, lo que va en línea con el hecho de que el empeoramiento agudo o crónico de la ECV contribuye directamente al empeoramiento agudo o crónico la función renal y viceversa [87].

Por último, la relación entre los niveles elevados de **ADX** y la presencia de RCV, podría deberse a que ADX, también llamada ferredoxina1, está implicada en la síntesis de aldosterona [130]. La hormona esteroide aldosterona controla la presión arterial regulando la retención de agua y sodio y la liberación de potasio [131]. La aldosterona aumenta la aterosclerosis temprana en regiones de flujo sanguíneo turbulento y promueve un fenotipo de placa inflamatoria en ratones que se asocia con ruptura en humanos [132]. Los niveles de aldosterona están asociados además con un aumento en la incidencia de eventos CV adversos, que incluyen IAM e ictus [133, 134].

Teniendo en cuenta el papel de cada uno de estos 6 biomarcadores proteicos de RCV propuestos para población joven, podemos clasificarlos entre proaterogénicos o ateroprotectores (**Figura 48**).



**Figura 48. Biomarcadores proteicos de riesgo cardiovascular en orina de población joven y su relación con el riesgo cardiovascular.** En rojo se representan los biomarcadores con papel proaterogénico y en verde los implicados en ateroprotección. Las flechas junto a los biomarcadores (↑) indican la alteración hallada en pacientes con RCV: niveles aumentados en R vs C en todos los casos. ADX: adrenodoxina, ECP: proteína catiónica del eosinófilo, FETUB: fetuina B, GDF15: factor de diferenciación del crecimiento 15, GUAD: guanidino desaminasa, NOTCH1: proteína homóloga al locus neurogénico notch1.

Además de estos 6 biomarcadores que se mostraron alterados significativamente al comparar individuos jóvenes con RCV frente a controles sanos desde la fase de descubrimiento, y por ello con mayor pronóstico, durante la fase de confirmación se encontraron otros dos marcadores de RCV: TPP1 y PCYOX. Pese a que ambas proteínas habían sido inicialmente seleccionadas para confirmar alteraciones observadas durante la fase de descubrimiento únicamente en el grupo de sujetos que habían superado un evento CV (**Figura 23**), durante la confirmación mostraron también una alteración en la comparación R vs C que no había sido previamente identificada (**Figura 33**), probablemente como consecuencia de que los valores de estas proteínas mostraban una mayor variabilidad dentro del grupo control analizado durante el descubrimiento.

La proteína **TPP1** es una serín proteasa lisosomal relacionada con enfermedad de almacenamiento lisosómico, la cual se ha asociado a disfunción endotelial y recientemente a aterosclerosis. En concreto, parece que la disfunción lisosomal conlleva una degradación ineficaz de las LDL modificadas y las células apoptóticas en las lesiones ateroscleróticas, provocando con ello numerosas consecuencias deletéreas para la homeostasis celular y la progresión de la enfermedad [135]. Nuestros resultados indican que la alteración de la proteína TPP1 en sujetos jóvenes con RCV es reversible (**Figura 33**), al igual que, según el análisis de biología de sistemas, la disfunción endotelial a la que se asocia.

Por su parte, la proteína **PCYOX** mostró valores disminuidos en todas las comparaciones intergrupales (R vs C, E vs R, y E vs C) en población joven (**Figura 33**), indicando una alteración progresiva que podría deberse a RCV y/o daño acumulados desde el inicio del proceso aterosclerótico, la cual no revierte con el tratamiento y la adquisición de hábitos saludables por parte del paciente tras sufrir un evento agudo. PCYOX es una enzima pro-oxidante presente en las lipoproteínas de baja densidad [136], la cual parece agravar la aterogenicidad de las LDL en el espacio subendotelial [137]. Este efecto se debe a que su actividad enzimática conlleva la liberación de aldehído isoprenoide, que podría modificar los grupos de lisina de las proteínas haciéndolas no funcionales, junto con peróxido de hidrógeno que aumentaría el estrés oxidativo. Recientemente, un estudio ha definido a PCYOX como una enzima pro-oxidante con un papel emergente en la aterosclerosis, tras comprobar en un modelo de ratón *ApoE<sup>-/-</sup>* cómo la deficiencia de PCYOX retrasa la ateroprogresión, reduce los niveles de lípidos en plasma y la inflamación, y se asocia con una disminución de la vulnerabilidad de las lesiones y niveles más bajos de peroxidación

de lípidos [138]. El mismo estudio muestra además cómo PCYOX va acumulándose en la pared arterial (humana y de ratón) durante el proceso de aterogénesis. Nuestros resultados añaden nuevas perspectivas para estos estudios, ya que podría pensarse que esta proteína va disminuyendo en la orina de población joven desde el inicio del proceso aterosclerótico como consecuencia de su acumulación en la pared arterial, presentándose por tanto como una potencial diana terapéutica que podría ser monitorizada a través de la orina sin necesidad de acceder a muestra de tejido.

Entre los marcadores proteicos confirmados en población joven sólo encontramos uno alterado únicamente tras sufrir un evento CV: la proteína **PEPC**, también conocida como pepsinógeno C o pepsinógeno II, que es un precursor de la enzima gástrica utilizado tradicionalmente como marcador sérico de daño en la mucosa gástrica.

## **2. EVALUACIÓN DE LOS BIOMARCADORES PROTEICOS DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y DAÑO DE POBLACIÓN JOVEN A LO LARGO DE LA EDAD**

La evaluación a lo largo de la edad de los biomarcadores proteicos identificados en población joven verifica nuestra hipótesis de que las alteraciones provocadas por el RCV y/o daño en el proteoma de la orina varían a lo largo de la edad. Como muestra la **Figura 33**, encontramos diferencias en el comportamiento de dichas proteínas al comparar los diferentes grupos clínicos de las cohortes de población joven, mediana y avanzada edad. A la hora de analizar dichas diferencias hay que tener presente que la definición de los grupos clínicos se realizó tal que reflejasen la situación poblacional mayoritaria en cada caso, habiendo reclutado para los grupos C y R de las cohortes de mediana y avanzada edad sujetos de bajo y moderado RCV respectivamente, mientras que en la cohorte de población joven se incluyeron individuos sanos (C) y de bajo RCV (R).

La proteína **FETUB** mostró el mismo comportamiento en la población joven y la de mediana edad, con niveles aumentados en la comparación R vs C y disminuidos en E vs R. Esto nos sugiere que esta proteína comienza a aumentar en orina en condiciones de RCV leve (R vs C en población joven), continúa haciéndolo en fases de riesgo más severas, incluso ya con afectación renal (R vs C de mediana edad), y en ambos casos normaliza sus niveles tras sufrir un evento CV y recuperarse del mismo. Sin embargo, en la población de edad avanzada los niveles de FETUB aumentaban significativamente tras

sufrir un evento agudo, pudiendo por tanto estar asociada en esa edad, a una situación de menor capacidad de recuperación y mayor riesgo residual.

En contra de lo que sucedía en población joven, cuando analizamos la proteína **GDF15** en las poblaciones de mediana y avanzada edad se mostró disminuida en el grupo R al compararla con el grupo control, siendo más pronunciada la alteración en los más mayores. Un estudio reciente ha encontrado niveles séricos de **GDF15** aumentados en sujetos de edad avanzada con características clínicas semejantes al grupo R de nuestra población joven (con síndrome metabólico, sin ECV y con función renal normal), al compararlo con individuos control de su misma edad [139]. Descartando un efecto principal asociado al envejecimiento [139], asociamos el cambio de tendencia observado en nuestras cohortes de mediana y avanzada edad a los posibles cofactores presentes en los grupos C y R de estas poblaciones. Por otro lado, sería interesante comprobar si el aumento descrito en el plasma de sujetos de edad avanzada [139] también se refleja en la orina, ya que sugeriría que un aumento de GDF15 en orina podría corresponderse con la presencia de síndrome metabólico e inicio de ECV a cualquier edad.

En cuanto a **PEPC**, además de ser marcador sérico de daño en la mucosa gástrica como ya se ha comentado, niveles altos de la misma en suero han sido relacionados con ECV aterosclerótica [140] y con la presencia de *Helicobacter Pylori* [141], la cual ha sido relacionada a su vez con IAM, ictus y aterosclerosis [142, 143]. Como teoría de fondo, la infección por *H. Pylori* estaría implicada en la patogénesis de la aterosclerosis a través de la activación de una reacción inflamatoria local o sistémica en el huésped y una posterior inducción de la progresión e inestabilidad de la placa [142]. Dado que el metabolismo anormal de los lípidos contribuye al desarrollo de ECV [144–146], y que la erradicación de *H. pylori* provoca un aumento de HDL circulante [147], los lípidos circulantes también podrían participar en la relación entre *H. pylori* y ECV [148]. El hecho de que en nuestro estudio PEPC no se mostrase alterada al comparar los individuos con factores de RCV frente a los controles sanos en población joven, en contra de lo que cabría esperar según los estudios descritos, podría ser consecuencia de que dichos individuos eran de bajo riesgo y PEPC sólo se mostró aumentada en la orina de la población joven tras sufrir un evento posiblemente como consecuencia del daño establecido o del riesgo residual. Sin embargo, parece que esa situación podría alcanzarse antes de sufrir un evento en poblaciones de mediana y avanzada edad como respuesta a mantener una situación de

RCV e inflamación desde hace más tiempo, disminuyendo tras sufrir un evento CV posiblemente como consecuencia de tomar medidas clínicas estrictas.

El análisis de **TPP1** en la orina de población joven mostró niveles aumentados de esta proteína en individuos con factores de RCV frente a controles, y disminuidos en los pacientes que se habían recuperado de un evento frente a los individuos con RCV. El mismo comportamiento, aunque con tendencias contrarias, mostró TPP1 al analizarla en la orina de sujetos de mediana y avanzada edad. Parece por tanto que, aunque con diferente tendencia según la edad, los niveles alterados de TPP1 en la orina reflejan una situación de riesgo modificable, observando nuevamente una menor capacidad de recuperación en los sujetos de edad avanzada ya que no logran recuperar los valores del grupo control una forma significativa.

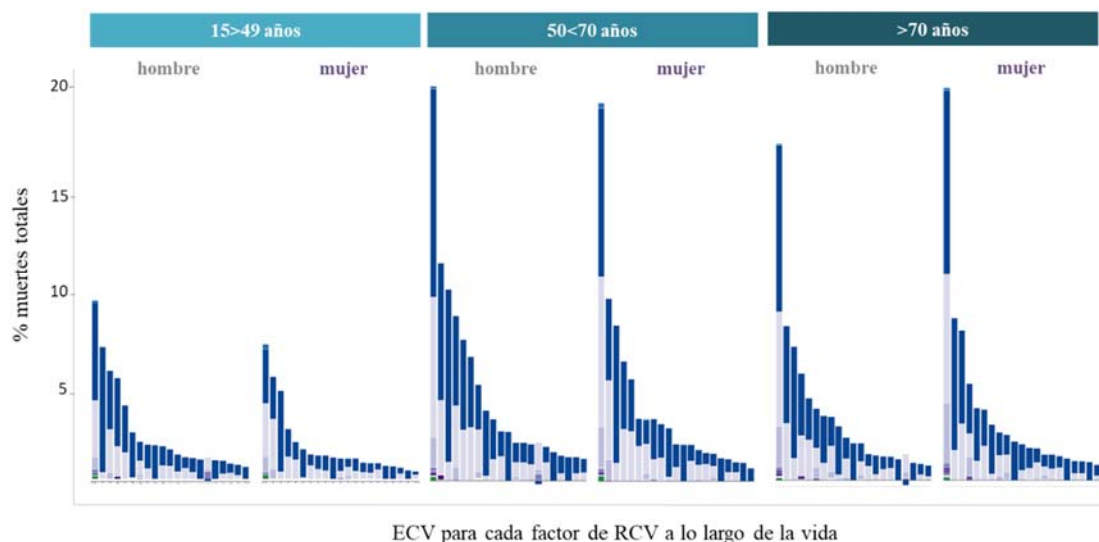
La proteína **PCYOX**, que mostró una disminución progresiva entre las comparaciones intergrupales (R vs C, E vs R, y E vs C) en población joven, no mostró diferencias entre los grupos C y R de la cohorte de mediana edad (es decir, entre individuos con bajo o moderado RCV), pero en cualquier caso sí disminuía en aquellos quienes habían sufrido un evento CV.

### **3. PATRÓN MOLECULAR DIFERENCIAL ENTRE HOMBRES Y MUJERES**

El vínculo entre el sexo y las ECV está bien documentado, habiéndose observado y estudiado diferencias asociadas al sexo en una amplia gama de ECV. Por ejemplo, las mujeres premenopáusicas tienen menos probabilidades de sufrir un infarto de miocardio en comparación con varones de la misma edad, aunque a su vez es más probable que padezcan comorbilidades, o que en caso de sufrir un infarto de miocardio éste sea más grave y por ello conlleve una mayor mortalidad [149]. Los hombres desarrollan hipertensión más temprana y más grave que las mujeres [150]. Se diagnostica a más hombres con insuficiencia cardíaca y además suelen tener una mayor tasa de mortalidad por dicha ECV que las mujeres, existiendo también una diferencia en el tipo más común de insuficiencia, siendo la diastólica más frecuente en las mujeres y la sistólica en los hombres [151]. Por otro lado, también existe un vínculo entre el sexo y varios factores de RCV, ya sean metabólicos, ambientales o relacionados con los hábitos de vida, los cuales

a su vez se van modificando a lo largo de la misma (**Figuras Suplementarias 2-5**). En el caso de la enfermedad coronaria, la diabetes y los triglicéridos tienen un mayor impacto negativo y los niveles de HDL positivo en las mujeres que en los hombres, mientras que la evidencia muestra que la lipoproteína (a) es un factor de RCV que parece ser más fuerte en los hombres que en las mujeres [152].

Dada la importancia del estrés oxidativo en la ECV en general, y en el desarrollo de aterosclerosis en particular, las diferencias entre sexos en dicho proceso han sido ampliamente estudiadas [153]. Varios estudios indican que las mujeres parecen ser menos susceptibles al estrés oxidativo. En concreto, se han encontrado niveles de biomarcadores de estrés oxidativo [154] y producción de ROS [155] superiores en hombres, a la vez que datos clínicos y experimentales con modelo de ratas espontáneamente hipertensas han sugerido un mayor potencial antioxidante en las mujeres [156]. El hecho de que las mujeres jóvenes estén relativamente protegidas de las ECV en comparación con los hombres se atribuye en gran parte a las propiedades antioxidantes del estrógeno [157]. En mujeres premenopáusicas los niveles de colesterol total y LDL son más bajos que en hombres, aumentando tras la menopausia y llegando a superar los valores en hombres [158]. Tal y como se representa en la **Figura 49**, lo mismo ocurre con el porcentaje de muertes por ECV las cuales aumentan en mujeres una vez alcanzada la menopausia (>50 años), acercándose e incluso superando al de hombres en población de edad avanzada. Sin embargo, incluso después de que los niveles de estrógenos disminuyan tras la menopausia, algunas ECV continúan afectando a los sexos de manera diferencial. Además, ensayos clínicos han determinado que la terapia hormonal con estrógenos no conlleva beneficios, pudiendo incluso causar un mayor riesgo de ECV [159–161]. Es muy probable, por tanto, que múltiples mecanismos sean responsables de las diferencias entre ambos sexos, no siendo el estrógeno el único implicado. De hecho, parece que los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes, el nivel de NADPH-oxidasa (especialmente p47 y niveles de Nox) y la angiotensina II también pueden jugar un papel importante [156, 162, 163].



**Figura 49.** Evolución del porcentaje de muertes por enfermedad cardiovascular asociada a cada factor de riesgo en función del sexo y a lo largo de la edad. Entre los factores de RCV considerados se encuentran hipertensión, niveles elevados de HDL, alto IMC, condición de fumador activo o pasivo, disfunción renal, consumo de alcohol, y varios asociados con la contaminación del aire o con los hábitos alimenticios. La imagen y sus leyendas pueden consultarse en las **Figuras Suplementarias 6-8**.

Los resultados de nuestro estudio determinaron que existen diferencias entre el proteoma de la orina de hombres y de mujeres en población joven (**Tablas Suplementarias 6A, 6B y 6C**) y que, además, se ven alterados de forma diferente como consecuencia del RCV o daño orgánico establecido tras sufrir un evento CV agudo (**Figuras 34 y 35**). Pese a ser un estudio con un número limitado de sujetos, cabe destacar algunas de las proteínas alteradas en función del RCV sólo en uno de los dos sexos dado su papel relevante en la ECV. En primer lugar, destacamos tres proteínas relacionadas con estrés oxidativo e inflamación. La proteína **PRDX3**, también llamada peroxiredoxina III, forma parte del sistema mitocondrial tiorredoxina/peroxiredoxina, el cual controla los niveles de peroxinitrito y la integridad del endotelio vascular regulando la homeostasis redox celular a través del catabolismo eficiente de peróxidos [164]. En nuestro estudio se encontraron niveles alterados únicamente en la orina de los hombres, mostrándose aumentada al comparar tanto R vs C como E vs R, indicando una alteración progresiva de dicha proteína en el sexo masculino de entre 30 y 50 años. Por el contrario, niveles de **CAP7** y **TRFL** se hallaron alterados solamente en la orina de mujeres, mostrándose aumentadas al comparar R vs C. Los niveles séricos de **CAP7** son un predictor tanto del estado inflamatorio como del RCV [165]. Por su parte, **TRFL** es una glicoproteína liberada por neutrófilos activados que presenta propiedades antiaterogénicas, ya que inhibe la

expresión de moléculas de adhesión endotelial [166] y la acumulación de colesterol en los monocitos [167]. El hecho de que estas tres proteínas mostrasen alteraciones sexo dependientes podría ser un reflejo del retraso en el desarrollo de la ECV en la mujer, el cual es más patente en la edad temprana premenopáusica (30-50 años) coincidente con la edad de la población joven utilizada en este estudio, o también, podría reflejar las diferencias existentes entre sexos en los mecanismos involucrados en la progresión de las ECV y la compensación del estrés oxidativo [153].

---

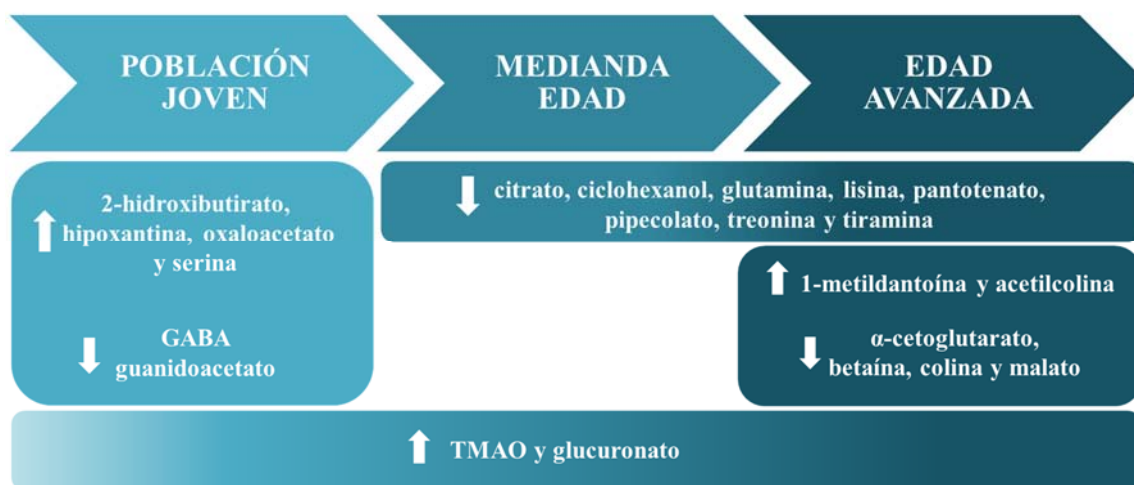
### **Posibles diferencias en los mecanismos aterogénicos de hombres y mujeres jóvenes**

---

Por otro lado, se encontraron niveles significativamente alterados de **ATRN** sólo en hombres del grupo de riesgo frente a controles del mismo sexo. La proteína ATRN es un biomarcador para la predicción del crecimiento de aneurisma aórtico abdominal [168], el cual está ligado generalmente a un proceso aterosclerótico [169]. Ya que según los datos del GBD durante 2019 el aneurisma aórtico causó el triple de muertes en hombres que en mujeres de población joven (0,19% vs 0,062% de las muertes totales), no nos resultó extraño encontrar valores alterados de este biomarcador sólo en los hombres. Además, dado que las mujeres llevan un retraso en el desarrollo de la ECV, cabe esperar que al menos alguna de las moléculas implicadas también lo tengan. Sin embargo, lo que sí nos resultó llamativo fue el hecho de encontrar alterado un biomarcador de aneurisma aórtico abdominal en hombres jóvenes que, según los factores de RCV tradicionales, tenían bajo RCV. Este hecho pone de manifiesto nuevamente que la estimación es insuficiente, incidiendo en la necesidad de implementar el uso de biomarcadores moleculares para mejorar la estratificación y conseguir un tratamiento a tiempo, especialmente en los más jóvenes.

## 4. EL PERFIL METABÓLICO DEL RIESGO CARDIOVASCULAR DIFIERE CON LA EDAD

Junto con los biomarcadores metabólicos hallados durante la fase de descubrimiento en orina de población joven, evaluamos a lo largo de la edad otros metabolitos asociados a RCV en estudios previos de nuestro laboratorio. Como resultado, identificamos diferentes huellas metabólicas comunes o específicas según la edad, las cuales se representan en la **Figura 50** y se discuten a continuación.



**Figura 50. La huella metabólica del riesgo cardiovascular difiere con la edad.** Identificadas una huella con alteraciones específicas de población joven, una huella común entre las poblaciones de mediana y avanzada edad, una huella particularmente alterada en población de edad avanzada y una huella mantenida a lo largo de la edad. Las flechas muestran la alteración descrita para cada metabolito: niveles significativamente mayores (↑) o menores (↓) en los individuos del grupo R vs C de la cohorte correspondiente.

### 4.1. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR ESPECÍFICA DE POBLACIÓN JOVEN

Destacamos 6 metabolitos significativamente alterados en la orina de los individuos jóvenes con factores de RCV en comparación a los controles sin riesgo (R vs C): hipoxantina, 2-hidroxiacetato, oxaloacetato y serina (aumentados), y GABA y guanidoacetato (disminuidos), constituyendo en su conjunto una huella con alteración específica en población joven que desaparece en mediana edad y aparece parcialmente, pero con tendencia inversa, en población de edad avanzada (**Figuras 38 y 39**). Este hecho no sorprende, ya que son de esperar cambios en la dinámica de los procesos biológicos durante el envejecimiento y su influencia sobre el RCV. Los factores de RCV tradicionales tienden a tener menor impacto en las personas mayores, o incluso a mostrar

el comportamiento contrario, como la relación inversa entre el índice de masa corporal y la calcificación de las arterias coronarias [170]. De hecho, la fisiopatología de la ECV en los ancianos puede ser diferente de la de las personas más jóvenes [171].

De forma similar a lo que ocurría con las proteínas marcadoras de RCV, se observaron diferentes comportamientos entre dichos metabolitos. Mientras que GABA, hipoxantina, oxaloacetato y serina, tendían a restablecer sus niveles hacia los valores del grupo control una vez superado el evento pareciendo reflejar únicamente RCV modificable, 2-hidroxiacetato y oxaloacetato mostraban niveles semejantes en la comparación E vs R pudiendo reflejar por tanto riesgo residual o daño orgánico establecido.

Por su parte, la **HIPOXANTINA** induce disfunción endotelial a través de la producción de ROS y la apoptosis inducida por estrés oxidativo [172]. Como ya se ha comentado, al igual que GUAD, la hipoxantina está implicada en el metabolismo de las purinas. Concretamente, la hipoxantina se convierte en xantina, que a su vez se convierte en ácido úrico (**Figura 47**). El hecho de que tanto GUAD como la hipoxantina se encontrasen aumentadas en la orina de los individuos con factores de RCV, incluso antes de que lo hiciesen los niveles de ácido úrico, apoya por completo un papel de ambas como biomarcadores tempranos de alteración en el metabolismo de las purinas, como también apoyan el papel del ácido úrico como un determinante clave en el RCV [173].

---

**GUAD e HIPOXANTINA**  
**potenciales biomarcadores tempranos de**  
**alteraciones en el metabolismo de las purinas**

---

El **2-HIDROXIBUTIRATO** es un biomarcador temprano de resistencia a la insulina y regulación alterada de la glucosa, y niveles elevados podrían estar relacionados con un aumento de la oxidación de lípidos y estrés oxidativo [174] y con cardiopatía isquémica microvascular [175]. En estudios previos de nuestro laboratorio encontramos niveles séricos elevados de 2-hidroxiacetato en pacientes con síndrome coronario agudo [176]. La excreción urinaria de 2-hidroxiacetato refleja cambios en la velocidad de síntesis del glutatión y, en ese contexto, previamente encontramos niveles disminuidos de glutatión en la aorta aterosclerótica [76]. Por otro lado, se ha demostrado que la **SERINA** disminuye el estrés oxidativo apoyando la síntesis de glutatión [177, 178]. Teniendo en

cuenta la situación de estrés oxidativo en la que se encontraban los sujetos del grupo con RCV, es posible que el aumento de 2-hidroxitirato y serina hallado en la orina al compararlos con el grupo control, esté asociado con un aumento en la demanda de glutatión en condiciones de estrés oxidativo, como parte de un mecanismo compensatorio en condiciones de niveles reducidos de glutatión.

---

**2-HIDROXIBUTIRATO y SERINA  
aumentan ante la demanda de glutatión en  
condiciones de estrés oxidativo**

---

Por el contrario, los sujetos con RCV mostraron niveles más bajos de **GUANIDOACETATO**, una tendencia previamente observada en pacientes con hipertensión agravada por la albuminuria o la diabetes [95, 179]. La arginina es un precursor principal del guanidoacetato y del NO que tiene propiedades antioxidantes [180]. Los niveles de NO se reducen en un ambiente oxidativo, apuntando también a niveles reducidos de arginina, lo que estaría de acuerdo con los niveles más bajos observados de guanidoacetato. También encontramos disminuido en los sujetos con RCV el **GABA**, un metabolito sintetizado y liberado por las células endoteliales que presenta una función protectora en la aterosclerosis al inhibir la generación de ROS y la adhesión de monocitos [181, 182]. Los niveles disminuidos de GABA en la orina podrían ser por tanto consecuencia de un proceso de disfunción endotelial, actuando como un posible marcador de RCV en la orina cuando está disminuido.

---

**Niveles disminuidos de GABA  
consecuencia de disfunción endotelial**

---

## 4.2. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR MANTENIDA A LO LARGO DE LA EDAD

De todos los metabolitos analizados durante el estudio metabolómico, solamente los niveles de glucuronato y TMAO resultaron alterados significativamente en la comparación del grupo R vs C, independientemente del rango de edad investigado (**Figura 45**).

En cuanto al **TMAO**, niveles elevados de este metabolito han sido asociados previamente con una mayor incidencia de mortalidad en pacientes con ERC, enfermedad arterial periférica, diabetes mellitus o insuficiencia cardíaca [183, 184]. Un estudio que analizó los niveles de TMAO en la orina de >1000 pacientes tras sufrir un IAM, reveló un aumento de 2,2 veces en comparación con los sujetos de control [185]. También se ha visto que niveles circulantes elevados de TMAO pueden predecir de forma independiente el riesgo de eventos CV posteriores y la mortalidad [183]. La potencial asociación entre TMAO y ECV podría explicarse por sus potenciales efectos proaterogénicos, ya que se ha demostrado que regula positivamente los receptores CD36 y SRA en la superficie de los macrófagos, promoviendo así la acumulación de colesterol citoplasmático y acelerando el desarrollo de aterosclerosis [186, 187]. Además, puede inhibir el transporte inverso de colesterol y alterar el metabolismo de los esteroides [186, 188, 189]. Por otro lado, el TMAO acelera la activación plaquetaria e inflamación, y genera riesgo de trombosis [190, 191].

Nuestros datos muestran niveles más altos de TMAO en orina asociados a diferentes grados de RCV antes de que ocurra un evento CV, apoyando claramente la propuesta de que TMAO sea candidato a incorporar junto con las herramientas de estratificación de riesgo existentes [184], lo cual, según nuestros hallazgos, estaría recomendado para la población mayor de 30 años.

Por otro lado, los sujetos jóvenes que experimentaron un evento cardiovascular conseguían recuperar los niveles de TMAO del grupo C, pareciendo reflejar únicamente RCV. Sin embargo, los individuos de mediana y avanzada edad del grupo E, mantenían niveles significativamente más altos de TMAO que sus respectivos grupos C, pudiendo indicar RCV residual y una capacidad limitada agravada con la edad para recuperarse del daño orgánico después de un episodio cardiovascular agudo [192].

### **4.3. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR COMÚN ENTRE LAS POBLACIONES DE MEDIANA Y AVANZADA EDAD**

Los metabolitos que mostraron alteraciones en la comparación R vs C solamente en las cohortes de mediana y avanzada edad representan una huella metabólica de RCV que aparece más tarde en la vida, la cual consiste en una disminución en los niveles de citrato, ciclohexanol, glutamina, lisina, pantotenato, pipecolato, treonina y tiramina (**Figura 42**). Además, el hecho de que la tendencia decreciente en el grupo R fuese más pronunciada en los sujetos de edad avanzada que en los de mediana edad para la mayoría de los metabolitos, apunta a una respuesta agravada con la edad que se ve reforzada por la ausencia de variación en los más jóvenes.

Todos los metabolitos de esta huella provenían de los evaluados por haber sido asociados a RCV en estudios previos de nuestro laboratorio y en todos los casos, a excepción de la treonina, mostraron alteraciones con la misma tendencia que lo habían hecho antes. Por ejemplo, los niveles de ciclohexanol, glutamina, lisina, pipecolato y tiramina fueron más bajos en la orina y el tejido aórtico de conejos alimentados con una dieta rica en colesterol para inducir aterosclerosis [76]; el citrato fue menor en la orina de pacientes con enfermedad renal crónica y ECV asociada [96]; y el pantotenato mostró la misma tendencia en sujetos hipertensos en comparación con sujetos no hipertensos, agravada aún más por la presencia de albuminuria y diabetes [95]. En apoyo de nuestros hallazgos, los niveles de lisina y tiramina en orina muestran niveles más bajos en pacientes con síndrome metabólico y se correlacionan negativamente con características cardiometabólicas y biomarcadores inflamatorios [193, 194]. Por su parte, la disminución de los niveles de glutamina en la orina se ha identificado como un biomarcador de hiperlipidemia [71].

Cabe destacar el alto valor pronóstico que presentó el citrato para los sujetos de edad avanzada, mostrando un AUC de 0,942 dejando muy poco margen de mejora a la adición de otros metabolitos al modelo.

---

**TMAO**  
**candidato a incorporar en la**  
**estratificación del RCV a cualquier edad**

---

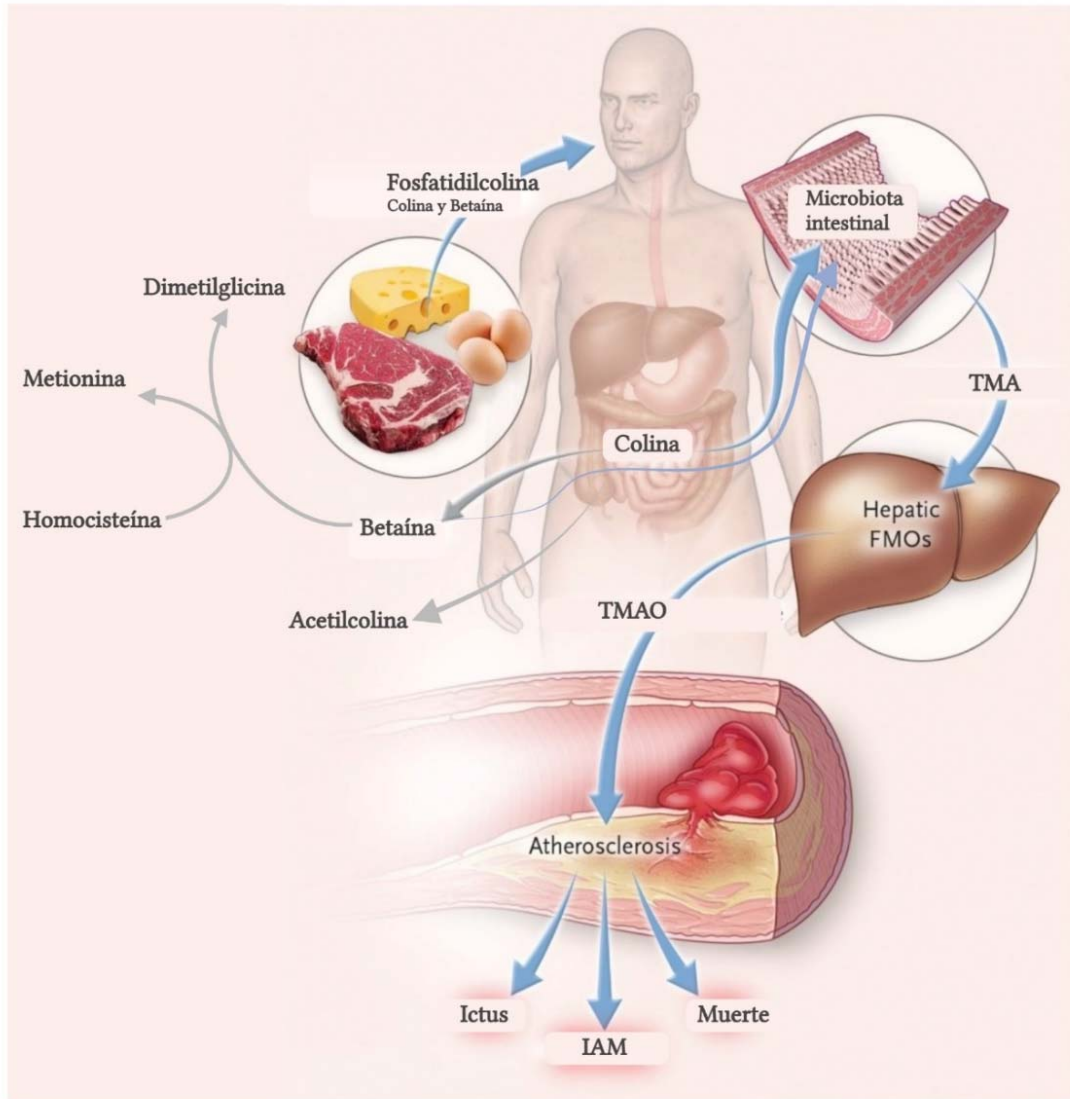
#### 4.4. HUELLA METABÓLICA DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN EDAD AVANZADA

Identificamos metabolitos que se encontraban alterados de forma clara en la orina de la cohorte de edad avanzada (**Figura 44**). Concretamente, 1-metildantoina y acetilcolina (aumentados) y  $\alpha$ -cetoglutarato, malato, betaína y colina (disminuidos) se mostraban significativamente alterados en la comparación R vs C, y todos ellos, a excepción de la colina, tendían a recuperar (significativamente o no) los valores del grupo control tras sufrir un evento CV.

Teniendo en cuenta la importancia del citrato en la huella metabólica del RCV en sujetos de edad avanzada, parece lógico que otros metabolitos pertenecientes al ciclo del ácido cítrico (malato y  $\alpha$ -cetoglutarato) resultasen también alterados, poniendo de relevancia nuevamente la implicación de esta ruta metabólica en el contexto de RCV [195].

Por su parte, las alteraciones en los niveles de colina y betaína encontradas en el grupo R vs C parecen estar relacionadas con la alteración previamente comentada del TMAO (mantenida a lo largo de la edad, aunque más acusada en las poblaciones de mayor edad), a través del metabolismo de la fosfatidilcolina dietética. La fosfatidilcolina de la dieta es la principal fuente de colina, la cual puede oxidarse a betaína, conduciendo el catabolismo de ambas por parte de la microbiota intestinal a producción de trimetilamina (TMA), que se oxida rápidamente a TMAO por las monooxigenasas que contienen flavina hepáticas (FMO) [196] (**Figura 51**). Diversos estudios han relacionado los niveles de estos tres metabolitos (colina, betaína y TMAO) en sangre u orina con ECV [196–198]. Sin embargo, mientras que la asociación con el TMAO ha sido siempre directa, relacionando niveles más altos de este metabolito con aterosclerosis y ECV, en el caso de la colina y la betaína se han descrito tanto relaciones directas [199] como inversas [200]. También se ha descrito la importancia de mantener el equilibrio en la relación betaína/colina, la cual ha sido inversamente relacionada con ECV en individuos con alto RCV [197], coincidiendo con nuestros resultados donde la relación era menor en el grupo de riesgo. Además, parece que dependiendo de la composición de la microbiota intestinal, el riesgo de sufrir un evento cardiovascular adverso es más bajo en individuos con TMAO circulante bajo pese a que las concentraciones de colina y/o betaína en la sangre estén elevadas [199]. Estudios preliminares que incluían la ingesta de suplementos de colina y betaína, la han relacionado con una disminución en los niveles de homocisteína en sangre [201–204] aunque no con una disminución de ECV [205, 206]. Sin embargo, la

suplementación dietética de ratones con colina o TMAO promovió el desarrollo de aterosclerosis [197]. Esta evidencia sugiere que la dieta podría modular la composición de la microbiota intestinal y, posteriormente, la capacidad de sintetizar TMAO, proporcionando así un vínculo mecanicista entre la dieta, la microbiota intestinal y la aterosclerosis [207].



**Figura 51. Relación entre la fosfatidilcolina en la dieta, la microbiota intestinal y los incidentes de eventos cardiovasculares adversos.** FMOs: monooxigenasas que contienen flavina, IAM: infarto agudo de miocardio, TMA: trimetilamina, TMAO: trimetilamina n-óxido. Figura adaptada de N Engl J Med 2013; 368:1575-1584.

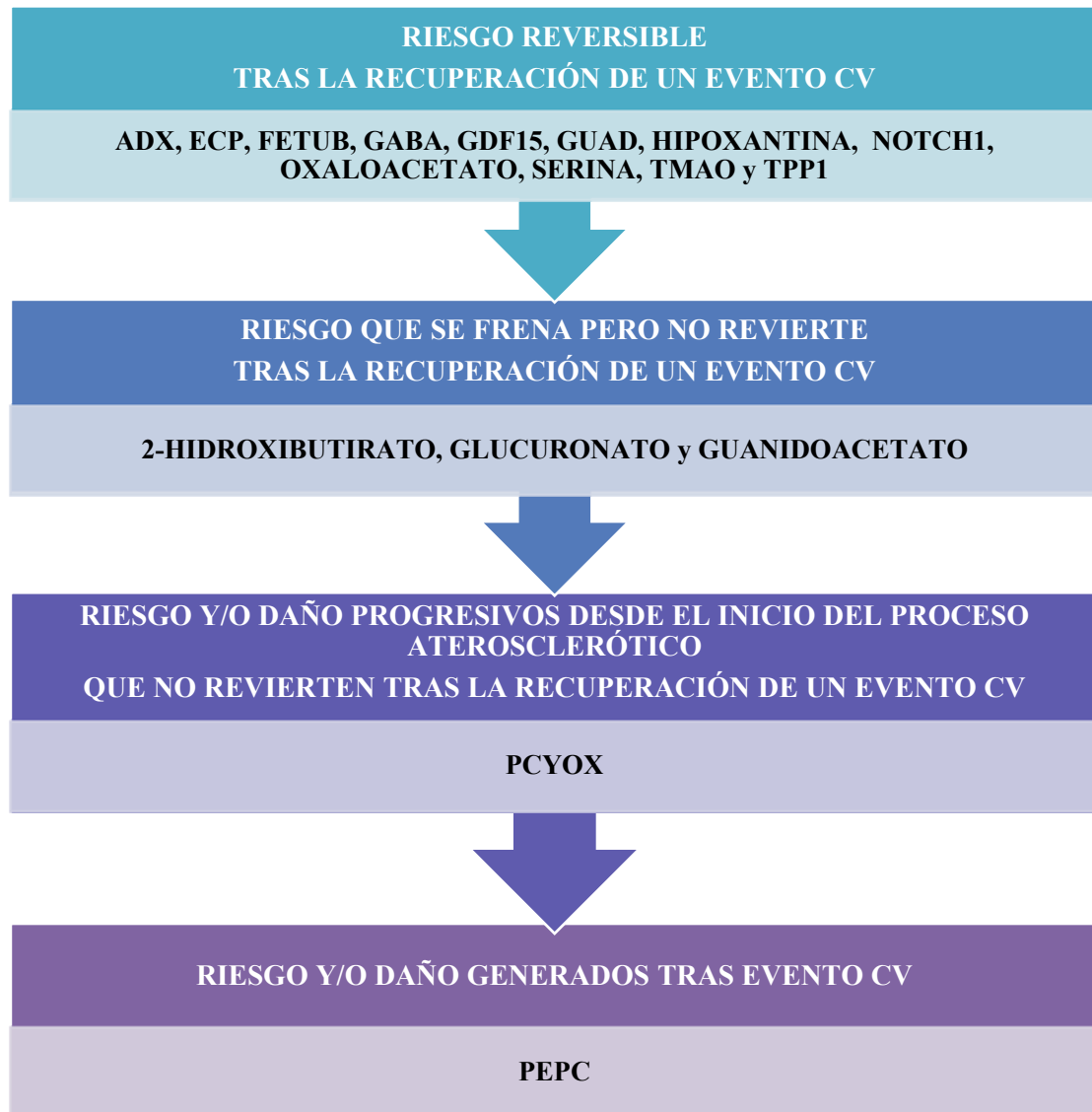
En nuestro estudio, los niveles de colina y betaína estaban disminuidos en la orina de los individuos del grupo de riesgo en población de edad avanzada, quienes presentaban a su vez niveles elevados de TMAO, lo cual podría explicarse por un aumento en la transformación de colina y betaína a TMAO por parte de la microbiota intestinal.

También podríamos pensar que la disminución en los niveles de colina podría estar asociada al aumento hallado en los niveles de acetilcolina, cuyo receptor  $\alpha7nACR$  parece estar implicado en procesos tanto pro como antiaterogénicos [208]. Y dado que la betaína actúa como donante de metilo para convertir la homocisteína en metionina, podríamos hipotetizar que los niveles bajos de betaína estuviesen asociados a niveles elevados de homocisteína, la cual es un factor de RCV independiente [209]. En cualquier caso, nuestros resultados evidencian la relevancia de estos metabolitos en el contexto del RCV.

## **5. INTEGRACIÓN MULTIÓMICA DE LOS BIOMARCADORES MOLECULARES DE RIESGO CARDIOVASULAR Y/O DAÑO HALLADOS EN POBLACIÓN JOVEN**

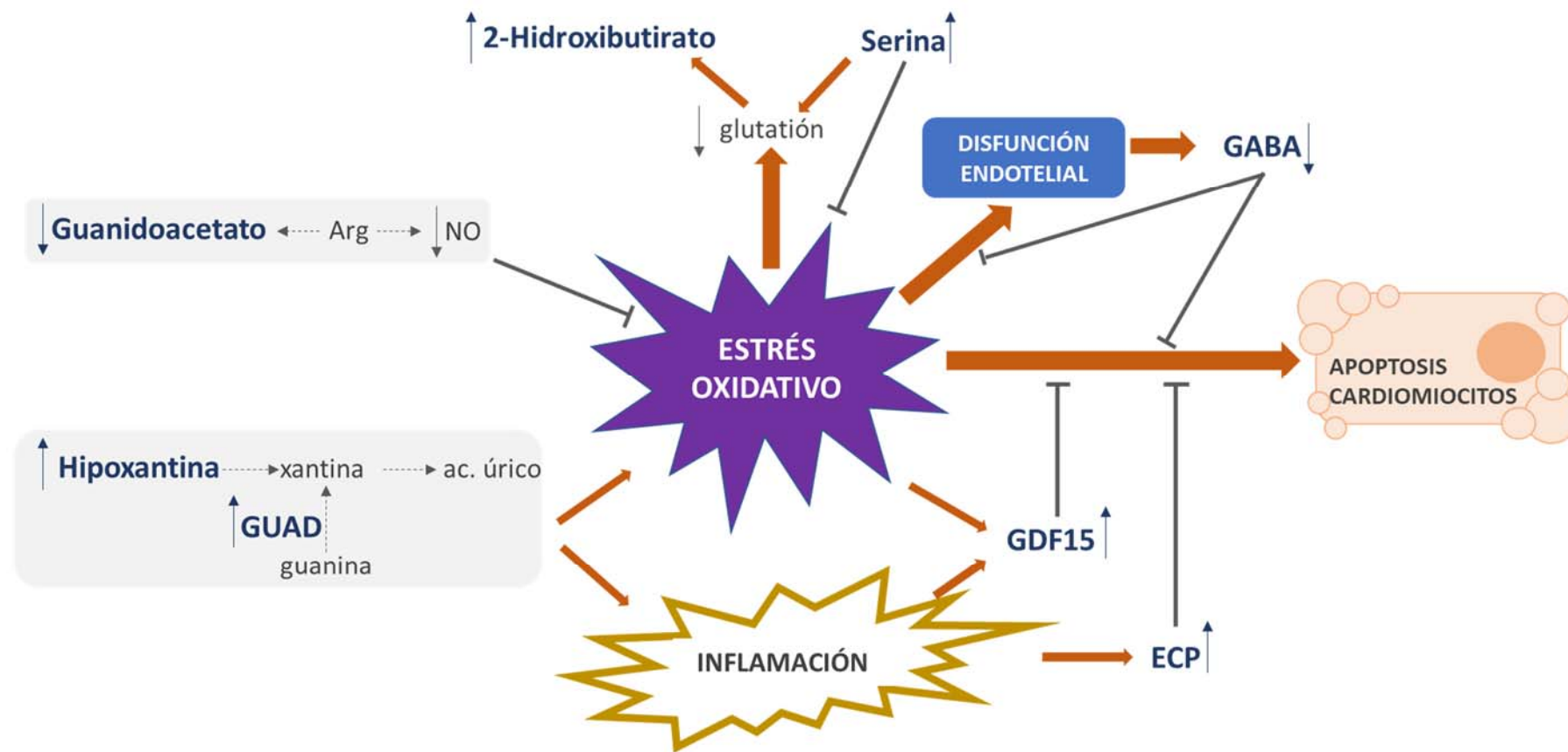
Los biomarcadores moleculares (proteínas y metabolitos) de RCV y/o daño orgánico establecido en población joven obtenidos durante las aproximaciones proteómica y metabolómica se resumen en la **Figura 52**, donde se clasifican según el modo en el que reflejan el riesgo y/o daño antes y después de sufrir un evento CV agudo (y recuperarse del mismo tras tratamiento farmacológico y la adquisición de hábitos saludables por parte del paciente). En concreto se clasifican entre los que reflejan: riesgo reversible tras la recuperación de un evento CV; riesgo que se frena pero no revierte tras la recuperación de un evento CV; riesgo y/o daño progresivos desde el inicio del proceso aterosclerótico que no revierten tras la recuperación de un evento CV; riesgo y/o daño generados tras evento CV.

Como se ha mostrado y discutido a lo largo de esta Tesis Doctoral, la mayoría de ellos muestran alteraciones específicas de población joven, viéndose alterada su abundancia en orina de forma diferente (o no haciéndolo) en las poblaciones de mediana y avanzada edad.



**Figura 52.** Clasificación de los biomarcadores de riesgo cardiovascular y/o daño orgánico establecido tras sufrir un evento agudo obtenidos durante la aproximación multiómica en población joven.

Tal y como se representa en la **Figura 53**, la integración de los resultados obtenidos durante las aproximaciones proteómica y metabolómica señalan a moléculas del metabolismo de las purinas precursoras del ácido úrico (hipoxantina y GUAD), intermediarios de la síntesis de glutatión (2-hidroxitirato y serina) y moléculas involucradas en contrarrestar el estrés oxidativo y la disfunción endotelial (guanidoacetato, GABA, GDF15 y ECP), como los principales biomarcadores moleculares que reflejan el RCV en la orina en población joven.



**Figura 53. Principales biomarcadores moleculares de RCV en orina en población joven.** Las flechas que acompañan a cada biomarcador indican la alteración identificada: niveles elevados (↑) o disminuidos (↓) en individuo con RCV en comparación a sujetos sin riesgo. ECP: proteína catiónica del eosinófilo, GABA: ácido gamma-aminobutírico, GDF15: factor de diferenciación del crecimiento 15, GUAD: guanidino desaminasa, NO: óxido nítrico. Figura adaptada de *Journal of Molecular Medicine*. 98 (11) (2020) 1603-1613

## **6. PERFIL MOLECULAR DE RIESGO CARDIOVASCULAR ASOCIADO AL RIESGO ESTIMADO A LO LARGO DE LA VIDA: POSIBLE HERRAMIENTA DE ESTRATIFICACIÓN PARA LA TOMA DE DECISIONES EN POBLACIÓN JOVEN APARENTEMENTE SANA**

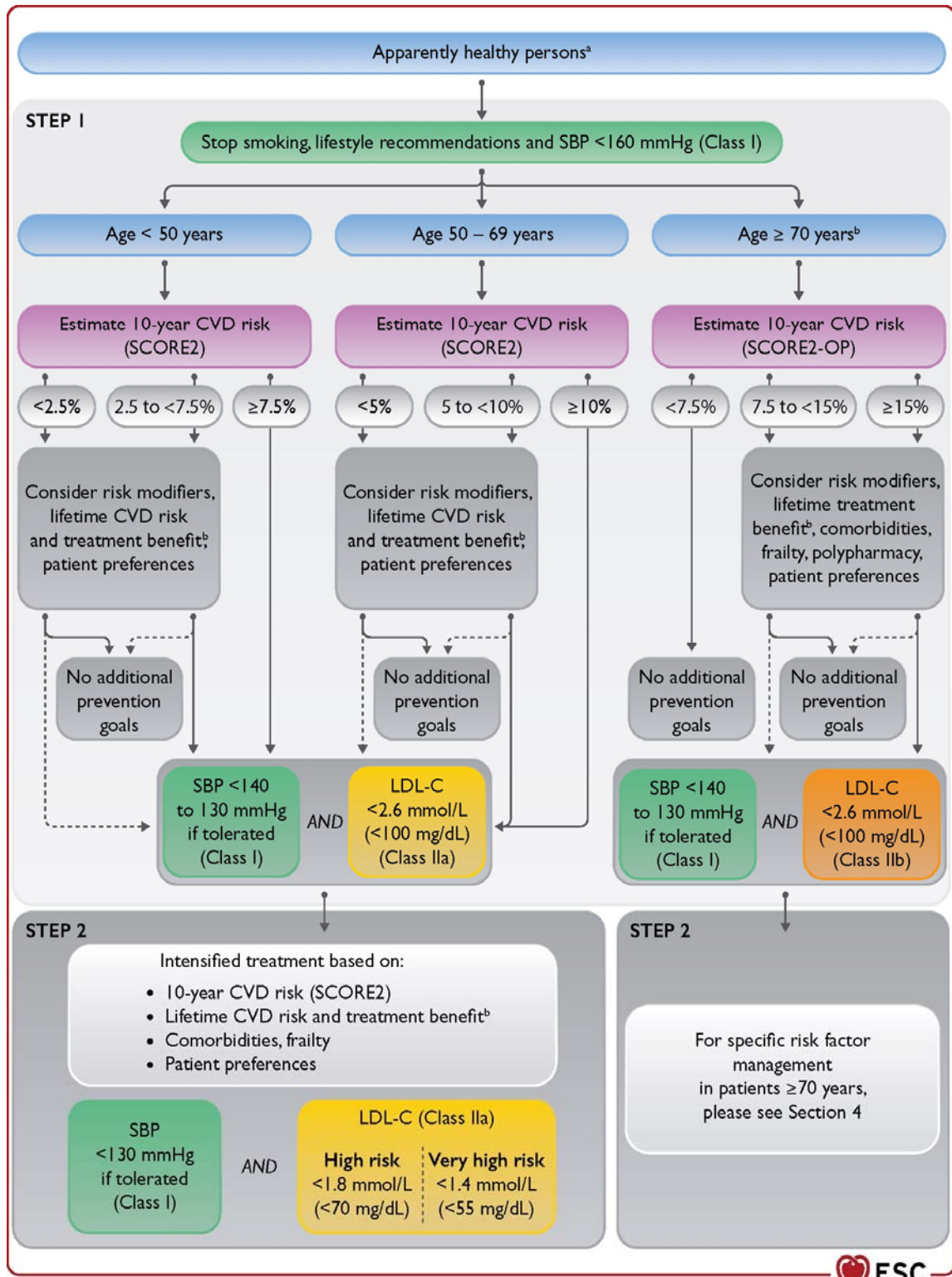
Para evaluar la relación entre las alteraciones moleculares halladas y la estimación a largo plazo del RCV de los sujetos reclutados durante el estudio, decidimos calcular el LTR o riesgo estimado a lo largo de la vida, que como ya se ha comentado está más cerca del RCV total que los estimadores a corto medio plazo. Los resultados de este estudio de correlación mostraron que todos los biomarcadores moleculares alterados de forma específica en población joven a excepción de la serina (ADX, ECP, FETUB, GDF15, GUAD, NOTCH1, hipoxantina, 2-hidroxitirato, oxaloacetato, GABA y guanidoacetato) se correlacionaron significativamente con los valores de LTR (QRISK®), ya fuese positiva o negativamente, respaldando su potencial valor añadido para la evaluación del RCV en población joven cuando se estima a lo largo de la vida (**Figuras 29 y 41**).

Al analizar la correlación de los niveles de cada biomarcador con cada uno de los factores de riesgo tradicionales empleados para el cálculo del QRISK® (edad, sexo, tabaquismo, índice de masa corporal, Col/HDL y PAS), los resultados determinaron que sólo NOTCH1 e hipoxantina muestran una correlación significativa aunque baja ( $r=0,2$  y  $r=-0,2$  respectivamente) con la edad, pudiendo así considerar a los sujetos de entre 30 y 50 años como un grupo homogéneo en relación a la edad para la medida de, al menos, el resto de marcadores. En el caso de las proteínas, casi todas mostraron los mayores grados de correlación con la relación Col/HDL y el sexo, mientras que en los metabolitos las variables con mayor correlación fueron la relación Col/HDL y la PAS.

El hecho de que tanto las proteínas como los metabolitos marcadores de RCV hallados en nuestro estudio se correlacionen con el Col/HDL coincide con los resultados del estudio PESA, donde dicho cociente se encontraba entre los 5 parámetros principales hallados para la predicción de aterosclerosis subclínica en jóvenes del modelo EN-PESA [37]. Los resultados de ambos estudios ponen de manifiesto la importancia del perfil lipídico en el desarrollo de la ECV y especialmente en la aterosclerosis. Pese a que según el GDB no más del 10% de las muertes por ECV se achacan a elevados LDL, otro estudio dice que, si se redujesen los valores de  $LDL < 150\text{mg/dL}$ , la enfermedad aterosclerótica

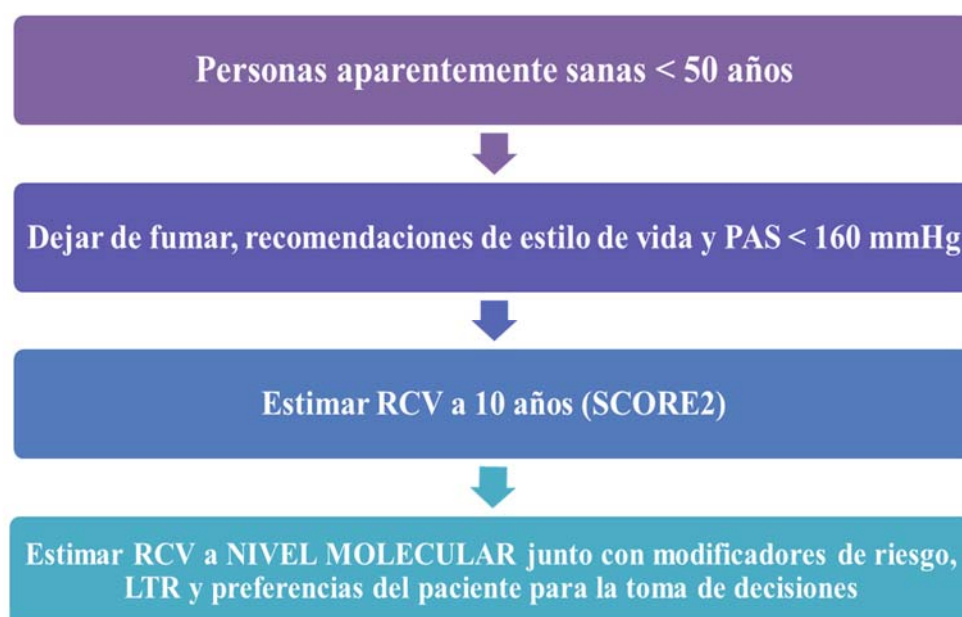
sintomática sería rara [1]. En línea con esto, durante el Congreso de la Sociedad Europea de Aterosclerosis de 2021 han sido varios los grupos que han dado a conocer resultados que enfatizan la implicación de los niveles de LDL en el RCV, así como la importancia de controlarlo de forma óptima desde edades tempranas. Concretamente, un estudio prospectivo a 16 años que incluyó a 4.958 adultos asintomáticos de entre 18 y 30 años, ha determinado que la probabilidad de sufrir un evento CV es mayor cuanto más tiempo se ha estado expuesto a niveles elevados de LDL y además empeora cuanto más temprana es la edad a la que ocurre dicha acumulación [210].

Que la estimación del RCV en población joven es insuficiente es un hecho. La última actualización de las guías europeas publicadas en septiembre de 2021 se centra principalmente, aunque no exclusivamente, en el riesgo y la prevención de la ECV asociada a aterosclerosis [45]. Esto incluye factores de riesgo, predicción de riesgo, modificadores de riesgo, así como condiciones clínicas que a menudo aumentan la probabilidad de sufrir ECV. Identificar a los pacientes que se beneficiarán más del tratamiento de cada factor de riesgo es fundamental en el esfuerzo de la prevención. En general, cuanto mayor es el riesgo absoluto de ECV, mayor es el beneficio absoluto del tratamiento de factor de riesgo. La **Figura 54** muestra el protocolo establecido por estas nuevas guías europeas para el manejo de la prevención de ECV en personas aparentemente sanas en función del grupo de edad al que pertenecen. Entre las novedades de dicho protocolo, además de sustituir el uso del SCORE por el SCORE2 y SCORE2-OP, las nuevas guías recomiendan el cálculo de LTR junto con modificadores del riesgo en sujetos de todas las edades, incluyendo jóvenes de bajo RCV aparentemente sanos. El cálculo del LTR está disponible para varios grupos de pacientes, y permite estimar el beneficio de por vida de intervenciones preventivas como dejar de fumar, hipolipemiantes y tratamiento de la hipertensión. En estas nuevas guías se recomienda utilizar la estimación de riesgos y beneficios a lo largo de la vida para la comunicación en el proceso de toma de decisiones compartido, junto con la consideración de las comorbilidades, la fragilidad y las preferencias del paciente para iniciar el tratamiento (STEP 1) y la intensificación del tratamiento de factores de riesgo (STEP 2) (**Figura 54**).



**Figura 54.** Protocolo establecido por las guías de la Sociedad Europea de Cardiología publicadas en 2021 para el manejo de la prevención de ECV en personas aparentemente sanas. Figura obtenida de *Eur Heart J.* 2021 Sep 7;42(34):3227-3337

Dado que algunos de los biomarcadores de RCV presentes en la orina identificados en esta Tesis Doctoral están significativamente relacionados con LTR, pero ninguno de ellos se comporta exactamente igual que él ( $r=1$ ), hipotetizamos que en esas diferencias de comportamiento existe una estratificación adicional posible del RCV a nivel molecular para pacientes con el mismo LTR y perfil lipídico similar. Por ello, creemos que dichos biomarcadores podrían utilizarse como modificadores del RCV estimado en jóvenes aparentemente sanos, incorporándose al protocolo para el manejo de la prevención de ECV en dicha población (**Figura 55**). Con ello, se posibilitaría que los pacientes jóvenes con mayor riesgo definido a nivel molecular accediesen antes a un tratamiento más estricto o a una prueba de imagen, que de otro modo no tendrían hasta que su RCV estimado según los factores tradicionales aumentase, cuando quizá ya fuese demasiado tarde para revertir el daño o parte del mismo.



**Figura 55. Protocolo propuesto para el manejo de la prevención de ECV en población joven aparentemente sana.** LTR: *Lifetime Risk* o riesgo estimado a lo largo de la vida, PAS: presión arterial sistólica.

---

**Biomarcadores moleculares de RCV identificados en población joven como herramienta de estratificación de riesgo junto con el LTR para la toma de decisiones clínicas en pacientes con factores de RCV aparentemente sanos**

---



# Conclusiones

---



**Tras la consecución del objetivo principal de esta Tesis Doctoral destacamos las siguientes conclusiones:**

1. El proteoma y el metaboloma de la orina reflejan RCV y daño orgánico establecido con alteraciones reversibles o progresivas que varían a lo largo de la edad y con un perfil diferencial entre hombres y mujeres.
2. Un perfil molecular que identifica específicamente el RCV en población joven, y se correlaciona con el LTR, podría utilizarse como modificador del RCV estimado en jóvenes aparentemente sanos, incorporándose al protocolo para el manejo de la prevención de ECV en dicha población.
3. La combinación de las proteínas ECP, GDF15 y GUAD muestra un alto valor diagnóstico para separar a individuos jóvenes con RCV de controles sin riesgo.
4. Las moléculas GUAD e hipoxantina podrían ser útiles para detectar y tratar una alteración subclínica del metabolismo de las purinas, impidiendo el aumento del estrés oxidativo y de los niveles de ácido úrico y sus complicaciones asociadas.
5. El TMAO, un metabolito proaterogénico que refleja RCV a cualquier edad y genera un vínculo mecanicista entre dieta, microbiota y aterosclerosis, debería incorporarse a los estimadores de RCV actuales para posibilitar una estratificación más precisa.



# Limitaciones

---



En cuanto a la identificación del perfil molecular de RCV, nuestro trabajo presenta la limitación de contar con un número reducido de muestras desde el punto de vista clínico. Esta limitación la hemos compensado con la aplicación de estrategias ómicas y de dos fases analíticas (descubrimiento y confirmación) en cohortes diferentes y con distintas tecnologías siempre que ha sido posible.

En cuanto a la evaluación a lo largo de la edad, indudablemente la principal limitación es la ausencia de un grupo de individuos sin ningún factor de RCV en las cohortes de mediana y avanzada edad, ya que, en ambas, el grupo control está constituido por individuos con factores de RCV de bajo grado, seguido por otro de riesgo más severo para aquellos pertenecientes al grupo R. Desde un punto de vista teórico, la comparación habría sido más rigurosa si hubiésemos podido incluir en estas dos cohortes de población, un grupo control similar al de la población joven (sin factores de RCV) y otro constituido por individuos con riesgo leve. Sin embargo, guiados por la práctica clínica habitual nos centramos en grupos representativos en lo que refiere a RCV ajustado a la realidad poblacional en función de su edad.



# Perspectivas de futuro

---



Sería de gran interés poder validar nuestros resultados en población joven en un estudio multicéntrico con cohortes de población más grandes. Además, la realización de un análisis prospectivo nos permitiría confirmar cuáles de estas moléculas tienen potencial pronóstico y por tanto podrían emplearse como modificadores del RCV estimado en jóvenes aparentemente sanos.

Las diferencias encontradas a nivel molecular entre hombres y mujeres de población joven evidencian la posibilidad de llevar a cabo una estratificación adicional diferente en función del sexo. La confirmación de estos nuevos marcadores moleculares específicos formaría parte de una estrategia de medicina personalizada para cada paciente. Además, dado que hay diferencias a lo largo de la edad, se podría hacer lo mismo en población de mediana edad y edad avanzada, posibilitando así una estimación más precisa.



# Anexos

---



# Anexo I

---

**OBJETIVO COMPLEMENTARIO**  
**ESTUDIO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL RESISTENTE**



Los resultados del **ESTUDIO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL RESISTENTE** llevado a cabo como objetivo complementario en esta Tesis Doctoral han dado lugar a la publicación de dos artículos científicos en una revista de primer decil dentro del área PERIPHERAL VASCULAR DISEASE (FI:10,19):

**“Citric Acid Metabolism in Resistant Hypertension Underlying Mechanisms and Metabolic Prediction of Treatment Response”**

*Hypertension*. 2017;70:1049-1056

**Anexo III**

**“Urine Haptoglobin and Haptoglobin-Related Protein Predict Response to Spironolactone in Patients With Resistant Hypertension”**

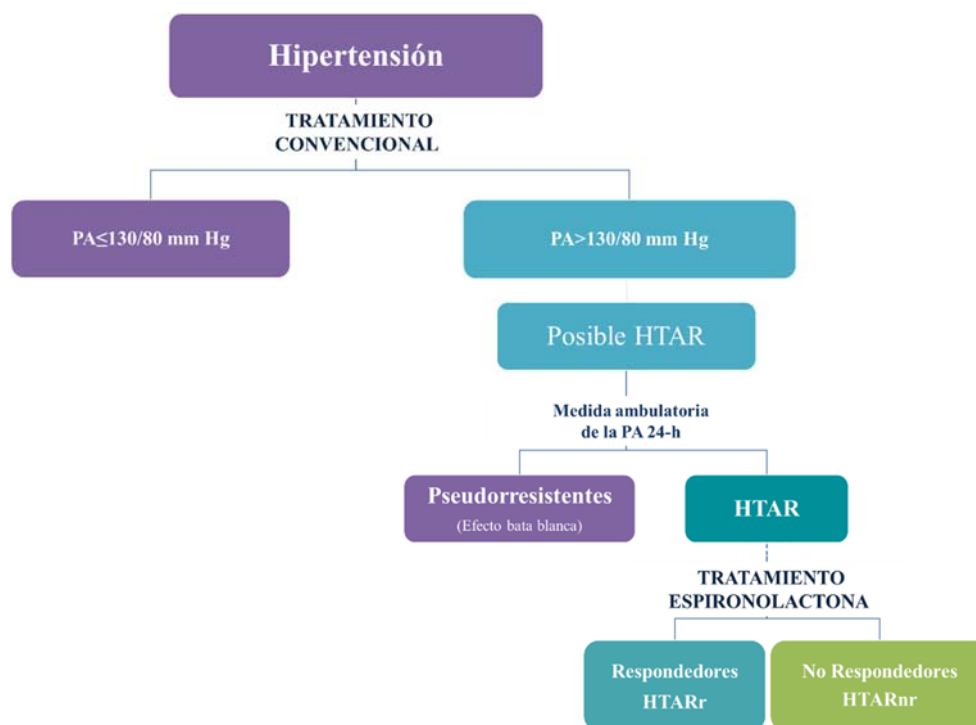
*Hypertension*. 2019;73:794-802

**Anexo III**



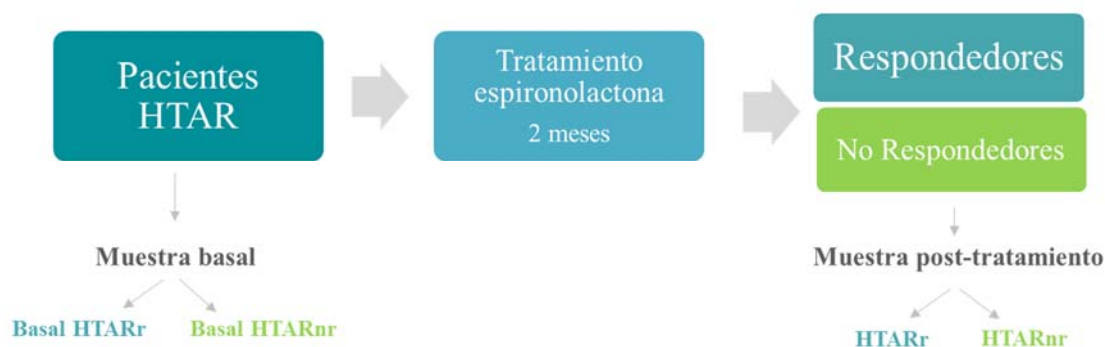
## ESTUDIO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL RESISTENTE

La hipertensión resistente (HTAR) se define como la presión arterial por encima de 130/80 mm Hg a pesar del uso concomitante de 3 antihipertensivos, que incluyan la combinación de un diurético, un inhibidor del sistema renina-angiotensina y un bloqueador de los canales de calcio [211]. La HTAR es un problema clínico de origen multifactorial. Se estima que la prevalencia de esta enfermedad está en el rango del 9% al 12% en la población de pacientes adultos hipertensos, y está aumentando progresivamente [212]. La exposición prolongada a hipertensión arterial está asociada con daño de órganos diana y un aumento del RCV. Pese a ello, los mecanismos responsables de la HTAR y la fisiopatología subyacente son poco conocidos. Según las guías clínica europeas, el tratamiento de elección para los pacientes con HTAR es la espironolactona [45]. Sin embargo, no todos los pacientes responden a este fármaco (**Figura 1**), el cual tiene efectos secundarios negativos con complicaciones asociadas que deben tenerse en cuenta. La identificación de indicadores moleculares capaces de predecir la respuesta de un paciente con HTAR a la espironolactona contribuirá, por tanto, a optimizar el manejo de estos pacientes y el control de su enfermedad y evitar tratar farmacológicamente a aquellos pacientes que no van a responder.



**Figura 1.** Diagnóstico de la hipertensión arterial resistente y respuesta al tratamiento con espironolactona. HTAR: hipertensión resistente, PA: presión arterial.

Con el objetivo de encontrar predictores de respuesta diseñamos un estudio prospectivo (**Figura 2**). Para ello, tomamos una muestra basal a pacientes recién diagnosticados de HTAR, y tras 2 meses de tratamiento con espironolactona, se les tomó otra muestra, que se clasificaba junto con la basal en muestras de pacientes respondedores (HTARr) o pacientes no respondedores al tratamiento (HTARnr). Además, con el objetivo de estudiar los mecanismos subyacentes a la HTAR, se reclutaron pacientes con hipertensión arterial no resistente (controlados) como grupo control.



**Figura 2.** Estudio prospectivo para la predicción de respuesta al tratamiento con espironolactona.

Para llevar a cabo este estudio diseñamos una estrategia multiómica similar a la del objetivo principal de esta Tesis Doctoral, que incluía una aproximación proteómica (descubrimiento por TMT-LC-MS/MS y confirmación por SRM-LC-MS/MS y ELISA) y otra metabolómica (descubrimiento por RMN y confirmación por SRM-LC-MS/MS). Para ello, se reclutaron un total 42 sujetos: 13 controles y 29 pacientes con HTAR, de los cuales 19 resultaron ser HTARr y 10 HTARnr tras el tratamiento.

Los resultados de la aproximación metabolómica determinaron que los metabolitos citrato y oxaloacetato estaban incrementados significativamente en los sujetos con HTAR en comparación a los controles. Tanto estos dos metabolitos, como  $\alpha$ -cetoglutarato y malato, se mostraban aumentados significativamente en las muestras basales de sujetos con HTARnr en comparación a las muestras basales de los HTARr, constituyendo un panel molecular predictor de respuesta al tratamiento con espironolactona. Por otro lado, tras la administración del fármaco, la concentración de oxaloacetato aumentaba en sujetos con HTARr y la de citrato disminuía en los sujetos con HTARnr. En ambos casos, además, se encontraron niveles disminuidos de malato, siendo la variación más acusada en HTARnr. En cuanto a la aproximación proteómica, los resultados mostraron como la

variación más significativa, un aumento de los niveles de las proteínas haptoglobina (HP) y proteína relacionada con la haptoglobina (HRP) en orina basal de sujetos con HTARnr en comparación a los sujetos con HTARr. Ambas proteínas forman un panel predictor de respuesta al tratamiento con espironolactona, el cual fue confirmado tanto por SRM-LC-MS/MS como por ELISA.

Como conclusión de este estudio, identificamos dos patrones moleculares predictores de respuesta al tratamiento de la HTAR con espironolactona, que una vez confirmados en estudios multicéntricos y mediante ensayos clínicos, podrán ser utilizados para la toma de decisiones clínicas sobre el tratamiento de estos pacientes a priori. Ello supondrá evitar un tratamiento con efectos secundarios indeseados en aquellos pacientes para los que sepamos de antemano que no habrá una respuesta positiva al tratamiento. Además, las alteraciones moleculares descritas durante nuestro estudio, suponen un paso en la identificación y el entendimiento de los mecanismos subyacentes a la HTAR, destacando la participación del ciclo de Krebs, entre otros.



# Anexo II

---

**MATERIAL SUPLEMENTARIO**  
**FIGURAS Y TABLAS**



Las **Figuras y Tablas Suplementarias** a las que se ha hecho alusión a lo largo de esta Tesis Doctoral se proporcionan en formato PDF mediante el enlace url y el código QR que se muestran a continuación:

<https://drive.google.com/drive/folders/143c2s2v3H1bPLVewNA4iw3n2FiRE30Ig>





# Anexo III

---

**PUBLICACIONES  
PERTENECIENTES DE ESTA TESIS DOCTORAL**





# Urinary metabolic signatures reflect cardiovascular risk in the young, middle-aged, and elderly populations

Paula J. Martinez<sup>1</sup> · Marta Agudiez<sup>1</sup> · Dolores Molero<sup>2</sup> · Marta Martin-Lorenzo<sup>1</sup> · Montserrat Baldan-Martin<sup>3</sup> · Aranzazu Santiago-Hernandez<sup>1</sup> · Juan Manuel García-Segura<sup>2,4</sup> · Felipe Madruga<sup>5</sup> · Martha Cabrera<sup>6</sup> · Eva Calvo<sup>6</sup> · Gema Ruiz-Hurtado<sup>7,8</sup> · Maria G Barderas<sup>3</sup> · Fernando Vivanco<sup>1,4</sup> · Luis M Ruilope<sup>7,8,9</sup> · Gloria Alvarez-Llamas<sup>1,10</sup>

Received: 14 May 2020 / Revised: 10 July 2020 / Accepted: 3 September 2020 / Published online: 11 September 2020

© The Author(s) 2020

## Abstract

The predictive value of traditional cardiovascular risk estimators is limited, and young and elderly populations are particularly underrepresented. We aimed to investigate the urine metabolome and its association with cardiovascular risk to identify novel markers that might complement current estimators based on age. Urine samples were collected from 234 subjects categorized into three age-grouped cohorts: 30–50 years (cohort I, young), 50–70 years (cohort II, middle-aged), and > 70 years (cohort III, elderly). Each cohort was further classified into three groups: (a) control, (b) individuals with cardiovascular risk factors, and (c) those who had a previous cardiovascular event. Novel urinary metabolites linked to cardiovascular risk were identified by nuclear magnetic resonance in cohort I and then evaluated by target mass spectrometry quantification in all cohorts. A previously identified metabolic fingerprint associated with atherosclerosis was also analyzed and its potential risk estimation investigated in the three aged cohorts. Three different metabolic signatures were identified according to age: 2-hydroxybutyrate, gamma-aminobutyric acid, hypoxanthine, guanidoacetate, oxaloacetate, and serine in young adults; citrate, cyclohexanol, glutamine, lysine, pantothenate, pipercolate, threonine, and tyramine shared by middle-aged and elderly adults; and trimethylamine N-oxide and glucuronate associated with cardiovascular risk in all three cohorts. The urinary metabolome contains a metabolic signature of cardiovascular risk that differs across age groups. These signatures might serve to complement existing algorithms and improve the accuracy of cardiovascular risk prediction for personalized prevention.

## Key messages

- Cardiovascular risk in the young and elderly is underestimated.
- The urinary metabolome reflects cardiovascular risk across all age groups.
- Six metabolites constitute a metabolic signature of cardiovascular risk in young adults.
- Middle-aged and elderly adults share a cardiovascular risk metabolic signature.
- TMAO and glucuronate levels reflect cardiovascular risk across all age groups.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00109-020-01976-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gloria Alvarez-Llamas  
galvarez@fjd.es

<sup>1</sup> Department of Immunology, Immunoallergy and Proteomics Laboratory, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Avenida Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup> CAI-RMN, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Department of Vascular Physiopathology, Hospital Nacional de Paraplégicos SESCAM, Toledo, Spain

<sup>4</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>5</sup> Department of Geriatrics, Hospital Virgen del Valle, SESCAM, Toledo, Spain

<sup>6</sup> Ibermutuamur, Madrid, Spain

<sup>7</sup> Cardiorenal Translational Laboratory, Instituto de Investigación I+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>8</sup> CIBER-CV, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>9</sup> School of Doctoral Studies and Research, Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain

<sup>10</sup> REDINREN, Madrid, Spain

**Keywords** Biomarkers · Cardiovascular risk · Elderly · Early prevention · Lifetime risk · Metabolomics

## Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of premature death worldwide despite continual improvements in primary and secondary prevention. The predominant underlying pathology of CVD is atherosclerosis, a chronic and systemic immunoinflammatory disease of medium- and large-sized arteries. Formation of an atheroma plaque and progressive arterial obstruction takes place silently and asymptotically, which in many cases results in a sudden event with potentially fatal consequences. Because cardiovascular risk is multifactorial and includes genetic and environmental factors, different algorithms have been developed to estimate cardiovascular risk in apparently healthy persons in the short-medium term (5–10 years), and these are based mainly on age, sex/gender, race, cholesterol levels, blood pressure, smoking habits, and the presence of diabetes. The majority of individuals with low cardiovascular risk over the next 10 years, however, show high risk in the long term, which can be calculated over their likely remaining lifetime (lifetime risk calculation or LTR QRISK) [1]. The impact of traditional risk factors for cardiovascular events changes with age [2, 3], and thus currently available estimators in all age groups may be inappropriate [4, 5], particularly, when considering that they are typically developed in middle-aged subjects.

Cardiovascular risk is especially underestimated in young adults. Consequently, few of them reach treatment thresholds for intervention, and prevention strategies are delayed. There is evidence for subclinical coronary atherosclerosis in this population [6], and although the presence of atheroma plaque *per se* might not serve to estimate cardiovascular risk, the extent of coronary artery disease rather than individual plaque lesions and their vulnerability to rupture can be considered evidence of subclinical risk [7, 8]. Healthy lifestyle changes made early in adulthood are known to decrease the risk of cardiovascular events later in life [9], clearly supporting the view that prevention strategies should start early. Thus, novel tools to improve cardiovascular risk assessment are needed to better stratify young individuals and more precisely define whom to target for personalized intervention. At the other extreme, old age is a major risk factor for CVD; however, individuals of the same chronological age may differ considerably with respect to their overall health status, thus limiting the predictive capacity of chronological age alone in determining overall disease risk [10]. Indeed, conventional cardiovascular risk estimators underestimate survival in the elderly [11], and this can result in overmedication [12].

Omics technologies are powerful tools in biomarker discovery and validation, *via* the identification of significant variations in the abundance of proteins or metabolites without the

preselection of molecular targets. The metabolome reflects the ultimate response of an organism to a (physio)pathological condition and provides an integrated profile, or signature, of biological status and metabolic health. Accordingly, defining the chemical phenotypes of health or disease using metabolomics is gaining attraction in cardiovascular risk stratification [13–15]. In a longitudinal study of elderly (mean age at baseline, 71 years) with or without CVD, the simultaneous addition of biomarkers of cardiovascular and renal abnormalities was found to substantially improve the risk stratification for death from cardiovascular causes beyond that of a model based only on established risk factors [16]. Similarly, it was recently shown that a metabolomic signature characterized largely by intermediates of fatty acid oxidation improved the prediction of cardiovascular events in the elderly [17]. Using metabolomics approaches, we previously identified specific metabolic fingerprints in urine reflecting the development of atherosclerosis and acute coronary syndrome/patient recovery [18] and the cardiovascular risk of subjects undergoing coronary artery bypass surgery [19]. By proteomics, we recently identified a urinary cardiovascular risk signature in young adults based on six proteins [20].

In the present study, we sought to investigate the metabolic alterations associated with cardiovascular risk in three independent cohorts stratified by age. Specifically, we aimed to identify metabolic cardiovascular risk markers in young adults (30–50 years old) and then to evaluate the identified metabolic patterns of risk in two older populations—middle-aged (50–70 years) and elderly (> 70 years) cohorts.

## Methods

### Patient selection and urine collection

This is a cross-sectional study of 234 subjects clinically categorized into the following three cohorts stratified by age: cohort I, 30–50 years; cohort II, 50–70 years; and cohort III, > 70 years (Table 1). Each cohort was subclassified into three groups reflecting the presence of cardiovascular risk and considering age-dependent population characteristics: “control” (C) group, “risk factor” (RF) group, and “cardiovascular event” (CVE) group. As the prevalence of traditional cardiovascular risks factors is low in cohort I, the C group included apparently healthy subjects without medication, whereas the RF group included individuals with estimated glomerular filtration rate (eGFR) < 100 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> or albuminuria and at least one of the following conditions: arterial hypertension (or on antihypertensive medication), hyperglycemia (blood glucose > 110 mg/dL), and/or metabolic syndrome. In cohort

**Table 1** Baseline clinical data of different aged-based cohorts expressed as mean ± SD or percentages. Young adults (30–50 years), middle-aged (50–70 years), and elderly (> 70 years)

|                                    | Young adults (discovery) |             |           | Young adults (confirmation) |             |             | Middle-aged |           |           | Elderly   |           |           |
|------------------------------------|--------------------------|-------------|-----------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                    | C                        | RF          | CVE       | C                           | RF          | CVE         | C           | RF        | CVE       | C         | RF        | CVE       |
| <i>n</i>                           | 12                       | 10          | 12        | 33                          | 25          | 25          | 28          | 23        | 25        | 25        | 25        | 25        |
| eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> ) | 92 ± 9                   | 95 ± 19     | 98 ± 27   | 93 ± 10                     | 89 ± 15     | 98 ± 21     | 81 ± 10     | 75 ± 20   | 77 ± 18   | 75 ± 13   | 40 ± 9    | 66 ± 19   |
| DM %                               | 0                        | 10          | 0         | 0                           | 12          | 8           | 4           | 44        | 28        | 40        | 32        | 40        |
| Age (years)                        | 42 ± 6                   | 45 ± 6      | 45 ± 6    | 43 ± 5                      | 44 ± 5      | 45 ± 4      | 60 ± 5      | 62 ± 5    | 61 ± 5    | 83 ± 5    | 86 ± 5    | 83 ± 6    |
| Sex (male), %                      | 50                       | 40          | 67        | 49                          | 72          | 80          | 75          | 91        | 68        | 52        | 48        | 48        |
| Total cholesterol (mg/dL)          | 193 ± 29                 | 211 ± 38    | 158 ± 36  | 193 ± 37                    | 210 ± 37    | 147 ± 40    | 180 ± 21    | 171 ± 24  | 157 ± 37  | 144 ± 29  | 145 ± 35  | 145 ± 26  |
| Triglycerides (mg/dL)              | 86 ± 46                  | 140 ± 110   | 121 ± 72  | 82 ± 38                     | 190 ± 99    | 143 ± 158   | 109 ± 39    | 131 ± 65  | 126 ± 56  | 110       | 88 ± 37   | 103 ± 43  |
| HDL (mg/dL)                        | 69 ± 18                  | 54 ± 15     | 43 ± 10   | 71 ± 17                     | 45 ± 14     | 41 ± 10     | 54 ± 14     | 51 ± 16   | 52 ± 18   | 44 ± 15   | 45 ± 14   | 41 ± 11   |
| LDL (mg/dL)                        | 108 ± 31                 | 132 ± 32    | 90 ± 33   | 105 ± 32                    | 135 ± 33    | 81 ± 38     | 105 ± 22    | 95 ± 21   | 80 ± 35   | 79 ± 23   | 70 ± 20   | 78 ± 22   |
| Glycemia (mg/dL)                   | 80 ± 7                   | 100 ± 41    | 100 ± 24  | 80 ± 8                      | 97 ± 31     | 107 ± 43    | 102 ± 13    | 123 ± 24  | 118 ± 40  | 104 ± 25  | 110 ± 44  | 113 ± 44  |
| Creatinine (mg/dL)                 | 0.9 ± 0.1                | 0.81 ± 0.13 | 0.9 ± 0.2 | 0.81 ± 0.12                 | 0.90 ± 0.12 | 0.90 ± 0.18 | 0.9 ± 0.2   | 1.1 ± 0.3 | 1.0 ± 0.3 | 0.8 ± 0.2 | 1.4 ± 0.3 | 1.0 ± 0.4 |
| Uric acid (mg/dL)                  | 4.9 ± 1.4                | 5.1 ± 1.0   | 5.7 ± 1.4 | 4.6 ± 1.2                   | 6.3 ± 1.7   | 5.8 ± 1.4   | 6.2 ± 1.4   | 6.4 ± 1.7 | 6.1 ± 1.4 | 4.9 ± 1.2 | 8 ± 2     | 5.7 ± 1.9 |
| SBP                                | 113 ± 9                  | 130 ± 8     | 122 ± 16  | 113 ± 9                     | 135 ± 12    | 122 ± 19    | 136 ± 11    | 141 ± 14  | 143 ± 16  | 140 ± 23  | 131 ± 21  | 150 ± 27  |
| DBP                                | 73 ± 8                   | 84 ± 9      | 75 ± 10   | 71 ± 8                      | 88 ± 9      | 76 ± 12     | 80 ± 8      | 81 ± 9    | 84 ± 11   | 76 ± 15   | 71 ± 15   | 77 ± 14   |
| LTR QRISK                          | 24 ± 7                   | 34 ± 8      | -         | 23 ± 6                      | 42 ± 10     | -           | -           | -         | -         | -         | -         | -         |

C control group, CVE cardiovascular event group, DBP diastolic blood pressure, DM mellitus diabetes, eGFR estimated glomerular filtration rate, HDL high-density lipoprotein, LDL low-density lipoprotein, LTR QRISK lifetime risk, SBP systolic blood pressure, RF cardiovascular risk factor group

II, the C group included individuals without traditional cardiovascular risk factors and with blood pressure in the high-normal range according to the 2013 ESH/ESC European guidelines ( $\geq 130/85$  mm Hg), whereas the RF group included individuals with blood pressure in the high-normal range and eGFR of 20–60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> or albuminuria. In cohort III, the C group included subjects with eGFR > 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, and the RF group included individuals with eGFR of 20–60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. In all three cohorts, the CVE group included individuals who had had a stroke or acute myocardial infarction in the previous 3 years (Table 1). All subjects included in the study underwent a detailed medical history interview, physical examination, and biochemical profile. Lifetime risk or LTR QRISK (thereafter referred to as LTR in the manuscript) was estimated using the lifetime cardiovascular risk calculator (<https://qrisk.org/lifetime/>).

A spot urine sample was collected from each participant in a sterile container. Samples were centrifuged at 16,200×g for 10 min, and supernatants were collected and stored at –80 °C until analysis. The study was approved by the Ethics Committee of Ibermutuamur, Hospital 12 de Octubre, and Hospital del Valle, as appropriate, and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All patients signed written informed consent before inclusion.

### Metabolite analysis by NMR

In a first discovery phase, we aimed to identify novel metabolites linked to cardiovascular risk in urine samples from cohort I ( $n = 34$ ), using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) as described [18, 21] (Table 1). Briefly, an aliquot of 300 μL of urine samples was diluted (1:1) in 200 mmol/L sodium phosphate buffer in D<sub>2</sub>O containing 0.01 mmol/L sodium trimethylsilyl propionate for chemical shift referencing. NMR analysis was performed at 278 K on a Bruker 700 MHz AVANCE III instrument equipped with a 5-mm triple resonance, z axis gradient cryoprobe. Spectra were processed using TOPSPIN (v3.2, Bruker BioSpin) and analyzed with AMIX software (v3.6.8, Bruker BioSpin). Each spectrum was partitioned into small spectral regions of 0.04 ppm (buckets). Normalization was performed based on the total intensity of the spectrum. The distribution of every bucket over the ensemble of spectra was evaluated by AMIX software for the significance analysis of variables (buckets) using a confidence level of 90%. Those discriminating buckets ( $p$  value < 0.05) resulting from the statistical comparison of the CVD groups were further considered for identification. The human metabolome database (HMDB version 4.0) and Chenomx NMR Suite 8.30 profiler (Chenomx) were used for theoretical identification [22]. Two-dimensional NMR analysis, including homonuclear correlation spectroscopy <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H (COSY), total correlated spectroscopy (TOCSY), and heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy

(<sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HSQC), was used for unequivocal identification in our particular samples.

### Mass spectrometry target analysis

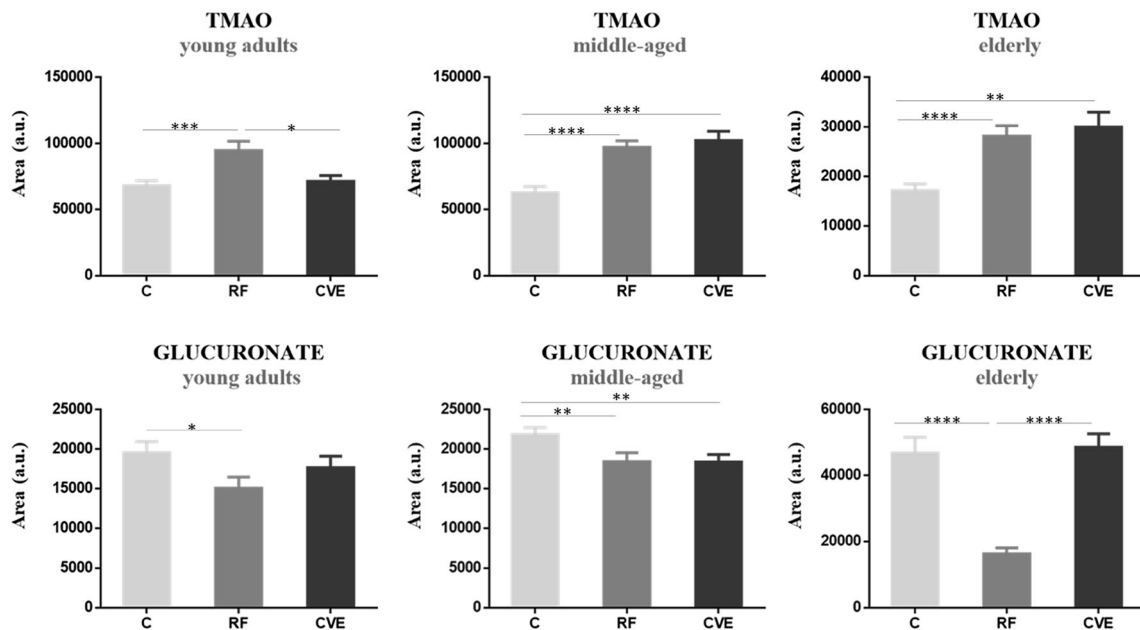
Confirmation of the variations in metabolites according to cardiovascular risk was accomplished by mass spectrometry (MS) target analysis in selected reaction monitoring (SRM) mode using all urine samples of cohort I ( $n = 83$ ) (Table 1). Those metabolites showing abundance changes linked to cardiovascular risk were also analyzed in cohorts II and III. A 6460 Triple Quadrupole LC-MS/MS (1200 Series, Agilent Technologies) controlled by Mass Hunter Software (v4.0 Agilent Technologies) was used as described [18, 19, 21]. Briefly, a 100 μL sample of urine was used for analysis, and proteins were removed by organic precipitation. Metabolite separation took place at 0.4 mL/min in an acetonitrile gradient for 5 min in positive or negative mode. Optimal conditions of analysis were established by analyzing commercial metabolite standards (Online Resource 1). Peak areas were used for intergroup comparison.

### Testing a CVD metabolic fingerprint for cardiovascular risk estimation

The following metabolites, previously identified by our group associated with atherosclerosis development and cardiovascular risk, were also analyzed in the three cohorts ( $n = 234$ ): citrate, cyclohexanol, glucuronate, glutamine, guanidoacetate, lysine, oxaloacetate, malate, pantothenate, pipercolate, serine, threonine, trimethylamine N-oxide (TMAO), 1-methylhydantoin, and tyramine [18, 19, 21]. Analysis was carried out by SRM as described above.

### Statistical analysis

For the NMR analysis, the discriminating buckets were obtained by AMIX software using significance analysis of variables (90% confidence level) and Welch's ANOVA. Statistical analysis of SRM data was performed using the Mann-Whitney nonparametric test, applying ROUT method to detect outliers (setting Q to 5%), by GraphPad Prism (v6.01, GraphPad Prism Software). Univariate and multivariate receiver operating characteristic (ROC) curves were generated by Monte Carlo cross-validation (MCCV) using balanced subsampling on the Metaboanalyst web server. In each MCCV, two-thirds (2/3) of the samples are used to evaluate the feature importance, and the top important features are then used to build classification models that are then validated on the remaining 1/3 of the samples. This procedure was repeated multiple times to calculate the performance and confidence interval of each model. Random forests was selected as the feature ranking built-in method for features selection. Though



**Fig. 1** Urinary TMAO and glucuronate reflect cardiovascular risk in young adults, middle-aged, and elderly adults. Variation in metabolite abundance variation in the three age-based cohorts investigated (30–50 years, 50–70 years, and > 70 years) is shown. Differences in abundance

between control (C), cardiovascular risk factor (RF), and cardiovascular event (CVE) groups are represented as mean ± SEM. \**p* value < 0.05; \*\**p* value < 0.01; \*\*\**p* value < 0.001; \*\*\*\**p* value < 0.0001 (Online Resource 2)

the area under the curve values (AUC) may be overestimated as they are not derived from independent sample, we calculated them for additional comparison between the proposed models. Correlation between metabolites abundance and estimated LTR values was investigated using Spearman’s test.

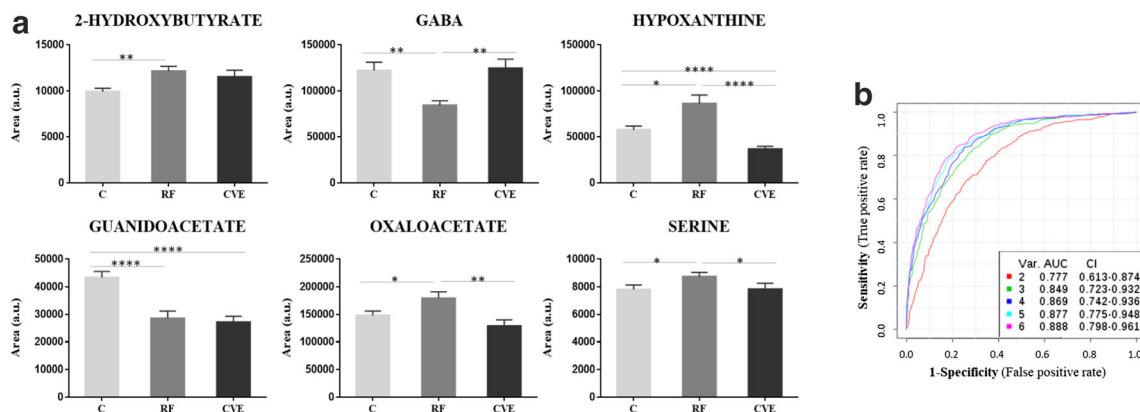
Baseline characteristics of the different study population cohorts are shown in Table 1.

**Results**

We analyzed the metabolic profile of urine samples with the aim of identifying novel indicators of cardiovascular risk. A second aim was to determine whether the alterations found in young adults are also evident in the middle-aged and elderly.

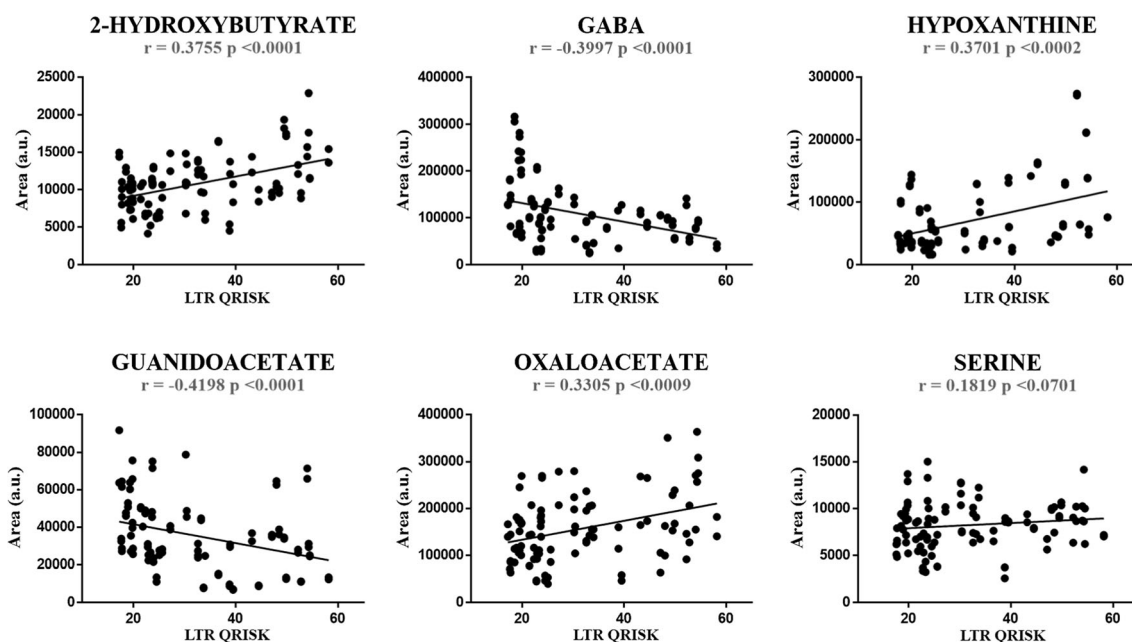
**Metabolic alterations linked to cardiovascular risk in young, middle-aged, and elderly populations**

Of all the metabolites identified by NMR analysis, only TMAO and glucuronate showed significant changes in abundance according to cardiovascular risk in all three aged-based cohorts. The same trend of alteration was observed between the RF group and the C group for both metabolites, with TMAO significantly higher and glucuronate significantly lower in the RF group. By contrast, the trend for TMAO and



**Fig. 2** Cardiovascular risk metabolic signature in young adults. Panel a shows the variation in metabolite abundance between control (C), cardiovascular risk factor (RF), or cardiovascular event (CVE) groups in young adults (30–50 years) represented as mean ± SEM. \**p* value <

0.05; \*\**p* value < 0.01; \*\*\*\**p* value < 0.0001 (Online Resource 3). Panel b shows receiver operating characteristic curves including area under the curve (AUC) values



**Fig. 3** Correlation between metabolite abundance and lifetime risk. Lifetime risk was estimated using LTR QRISK®, and Spearman correlation was performed. \* $p$  value  $< 0.05$ ; \*\* $p$  value  $< 0.01$ ; \*\*\* $p$  value  $< 0.0001$

glucuronate in the CVE group was more heterogeneous across the cohorts (Fig. 1).

### A urinary metabolic pattern is associated with cardiovascular risk specifically in young adults

In the first discovery phase by NMR in the young population, we identified several novel metabolites potentially associated with cardiovascular risk (discovery cohort, Table 1). Three metabolites were further confirmed by SRM, showing significant changes in levels between the RF and C groups in a confirmation cohort of young adults (Table 1): 2-hydroxybutyrate and hypoxanthine (higher) and gamma-aminobutyric acid (GABA) (lower) (Fig. 2a). We also analyzed urine metabolites that we previously identified in CVD [18, 19] using SRM in the confirmation cohort, finding that guanidoacetate abundance was significantly lower in the RF group than in the C group, whereas the opposite was seen for oxaloacetate and serine (Fig. 2a). We calculated ROC curves for the six individual metabolites, finding that the combination of all six yielded the best performance with an AUC value of 0.888 (Fig. 2b). We then assessed whether these metabolic alterations were also evident in middle-aged and elderly subjects. None of the six metabolites showed the same trend of variation in the other two populations investigated (cohorts II and III).

We next examined for potential correlations between the levels of the identified metabolites in urine and the LTR score evaluated in young adults, finding significant correlations for all with the exception of serine (Spearman correlation values: 2-hydroxybutyrate,  $r = 0.3755$   $p < 0.0001$ ; hypoxanthine,  $r =$

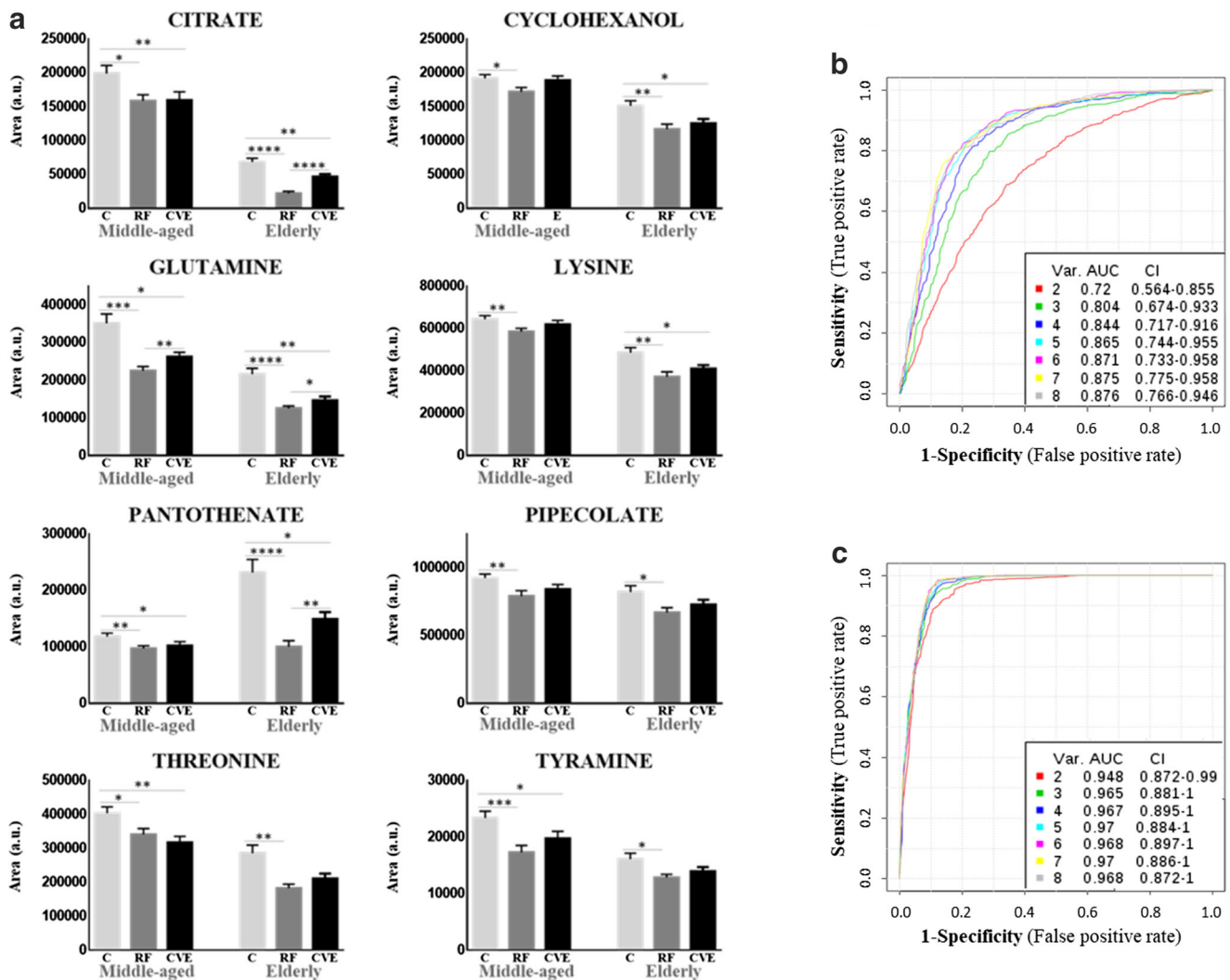
$0.3701$   $p < 0.0002$ ; oxaloacetate,  $r = 0.3305$   $p < 0.0009$ ; guanidoacetate,  $r = -0.4198$   $p < 0.0001$ ; GABA,  $r = -0.3997$   $p < 0.0001$ ) (Fig. 3).

### Middle-aged and elderly subjects share a common metabolic feature linked to cardiovascular risk

We identified a specific metabolic signature in cohorts II and III without evident variation in young adults. Levels of citrate, cyclohexanol, glutamine, lysine, pantothenate, pipecolate, threonine, and tyramine were lower in the RF group than in the C group in both cohorts (Fig. 4a). The sensitivity and specificity of metabolites were evaluated in cohorts II and III separately (Fig. 4b, c). ROC curve analysis showed that in cohort II, the best performance was obtained when the eight metabolites were combined, with AUC values from 0.72 to 0.876 (Fig. 4b), and the added value of sequentially including metabolites in the model was clear. In cohort III, the performance of the model did not change as dramatically, varying from 0.948 to 0.968 when 2 or 8 metabolites were combined, respectively (Fig. 4c), and with an individual AUC value for citrate of 0.942. Additionally, two metabolites showed an altered profile in the cardiovascular risk factor group uniquely in the elderly: malate (lower) and 1-methylhydantoin (higher).

## Discussion

In the present study, we report differences in the urinary metabolome associated with cardiovascular risk. We additionally identified specific metabolic signatures in age-based cohorts.



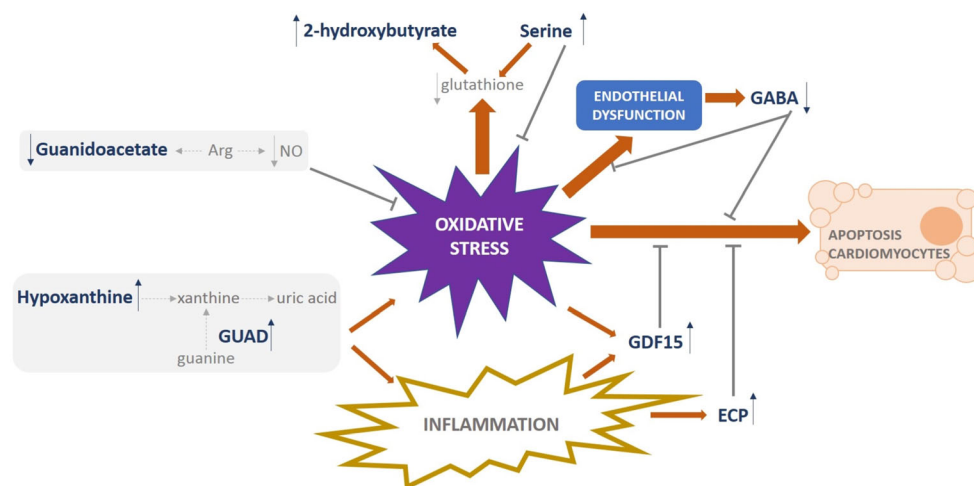
**Fig. 4** Cardiovascular risk metabolic signature shared by middle-aged and elderly populations. Panel **a** shows variation in metabolite abundance between control (C), cardiovascular risk factor (RF), or cardiovascular event (CVE) groups in middle-aged (50–70 years) and elderly (> 70 years) cohorts, represented as mean ± SEM (**a**). \**p* value

< 0.05; \*\**p* value < 0.01; \*\*\**p* value < 0.001; \*\*\*\**p* value < 0.0001 (Online Resource 4). Panels **b** and **c** show receiver operating characteristic (ROC) curves including area under the curve (AUC) values for cohorts II and III, respectively

**Cardiovascular risk in the young population: oxidative stress underlies main alterations in urinary metabolites**

Oxidative stress is known to be involved in the pathogenesis of CVD [23–25], and prior metabolomics studies in human urine point to an important contribution for oxidative stress in acute coronary syndrome [26] and hypertension in persons < 50 years [27]. In the same line, our previous proteomic study highlighted oxidative stress as a major functional category that is altered by cardiovascular risk factors already present in young adults [20]. Our present metabolomic study, performed in the same cohort, also provides clear evidence for the existence of metabolic deregulation under conditions of oxidative stress and points to specific targets that can be easily monitored (Fig. 5). Hypoxanthine induces endothelial dysfunction

through ROS production and oxidative stress-induced apoptosis [28]. We found higher urinary levels of hypoxanthine associated with cardiovascular risk factors. Hypoxanthine is converted to xanthine, which in turn is converted to uric acid, and an increase in these three purine metabolites has been reported in response to cardiac ischemia [29]. The conversion of guanine to xanthine in the uric acid cycle is performed by the aminohydrolase guanine deaminase (GUAD) [30]. Interestingly, GUAD was one of the main urinary proteins found altered (higher) in the presence of cardiovascular risk factors in our previous proteomics study [20], altogether supporting a potential role for hypoxanthine and GUAD as biomarkers of CVD early in life and also the contribution of uric acid—the final produce of purine metabolism—as a key determinant in cardiovascular risk, previously described [31]. We also found higher levels of 2-hydroxybutyrate with



**Fig. 5** Cardiovascular risk is reflected in urine by metabolic regulation under oxidative stress conditions in young adults. Purine metabolites precursors of uric acid (hypoxanthine and GUAD), intermediates in glutathione synthesis (2-hydroxybutyrate and serine), and molecules involved in counteracting oxidative stress, endothelial dysfunction, or cardiomyocytes apoptosis (guanidoacetate, GABA, GDF15, and ECP)

are shown as the main molecular players reflecting cardiovascular risk in urine. Bold letter represents identified urinary metabolites and proteins showing altered levels associated with cardiovascular risk. Arrows represent higher (↑) or lower (↓) variation. *ECP* eosinophil cationic protein, *GABA* gamma-aminobutyric acid, *GDF15* growth differentiation factor 15, *GUAD* guanine deaminase, *NO* nitric oxide

increased cardiovascular risk, in agreement with the reported elevated levels in patients with microvascular ischemic heart disease [32]. 2-Hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and impaired glucose regulation, and higher levels might be related to increased lipid oxidation and oxidative stress [33]. We previously found higher serum levels of 2-hydroxybutyrate in patients with an acute coronary syndrome [34]. Additionally, urinary secretion of 2-hydroxybutyrate reflects shifts in the rate of glutathione synthesis. In this context, we previously found diminished levels of glutathione in the atherosclerotic aorta [19], and here, we associate higher levels of this metabolite with an increase in the demand for glutathione in oxidative stress conditions. Of note, serine has previously been shown to decrease oxidative stress while supporting glutathione synthesis [35, 36], in line with our observations here (higher in the RF group) and supporting a compensatory mechanism in conditions of reduced glutathione levels. By contrast, subjects with cardiovascular risk showed lower levels of guanidoacetate, a trend previously observed in patients with hypertension and further aggravated by albuminuria or diabetes [21, 37]. Arginine is a main precursor of nitric oxide (NO) and guanidoacetate and has antioxidant properties [38]. Levels of NO are reduced in an oxidative environment, pointing also to reduced levels of arginine, which would be in accord with the observed lower levels of guanidoacetate. We also found that GABA, a metabolite synthesized and released by endothelial cells, was lower in subjects with cardiovascular risk, which might be explained in terms of its protective function by inhibiting ROS generation and monocyte adhesion [39]. A hypothesis has been established on an inhibitory role for GABA in atherosclerosis [40], acting as a potential urinary marker of cardiovascular

risk when it is diminished, which is in line with our previous observations in GDF15 (growth differentiation factor 15) and ECP (eosinophil cationic protein) [20].

All of the altered metabolites with the exception of serine significantly correlated with LTR: 2-hydroxybutyrate, hypoxanthine, and oxaloacetate positively and guanidoacetate and GABA negatively, supporting their potential added value in assessing cardiovascular risk when estimated along the lifetime.

### The cardiovascular risk metabolic signature differs with age

Changes in the dynamics of biological processes during aging and their influence over cardiovascular risk are to be expected, and traditional cardiovascular risk factors tend to have less impact in older individuals or even show the opposite behavior, such as the inverse relationship between body mass index and coronary artery calcification [41]. Indeed, the pathophysiology of CVD in the elderly may be different from that of younger people [42]. Along this line, there is evidence supporting the central role of mitochondrial oxidative stress, mitochondrial damage, and biogenesis, in addition to crosstalk between mitochondria and cellular signaling in cardiac and vascular aging [43].

The metabolites found altered in cohorts II and III represent a cardiovascular risk urinary signature that appears later in life. Interestingly, the trend in the RF group was more pronounced in people > 70 years than in those aged 50–70 years for most metabolites, pointing to an aggravated response with age. This is further supported by the lack of variation in people aged 30–50 years.

All of the metabolites examined here showing alteration in their levels, with the exception of threonine, also displayed altered levels in our previous studies in CVD with the same trend as reported in the present study. For instance, the levels of cyclohexanol, glutamine, lysine, pipercolate, and tyramine were lower in the urine and aortic tissue of rabbits fed a cholesterol-rich diet to induce atherosclerosis [18]; citrate was lower in the urine from patients with chronic kidney disease (CKD) with associated CVD [44]; and pantothenate showed the same trend in hypertensives *versus* non-hypertensive subjects, further aggravated by albuminuria [21]. Supporting our findings, levels of urinary lysine and tyramine levels show lower levels in patients with the metabolic syndrome patients (aged between 24–72 years) and correlate negatively with cardiometabolic features and inflammatory biomarkers [45, 46]. Also, decreased levels of glutamine in urine have been identified as a hyperlipidemia biomarker (aged 25–65 years) [47].

### TMAO, a robust urinary biomarker of cardiovascular risk at any age

TMAO and glucuronate levels were significantly altered in those individuals with cardiovascular risk independently of the age range investigated. These observations further underpin the utility of TMAO as a potential biomarker of CVD, supporting previous evidence of its association with a higher incidence of mortality in patients with CKD, peripheral arterial disease, diabetes mellitus, or heart failure [48, 49]. It has also been reported that higher circulating levels of TMAO may independently predict the risk of subsequent cardiovascular events and mortality [48], and consequently, TMAO is a good candidate for incorporation into existing risk stratification tools [49]. Indeed, analysis of urine TMAO levels in > 1000 patients with myocardial infarction revealed a 2.2-fold increase compared with control subjects [50]. Our data show that higher levels of urinary TMAO are associated with cardiovascular risk before a cardiovascular event occurs. In young adults, TMAO levels in the CVE group were not significantly different to those in the C group, and this was also the case for GABA, hypoxanthine, oxaloacetate, and serine, thus uniquely reflecting cardiovascular risk itself. However, middle-aged and elderly individuals who experienced a cardiovascular event had higher levels of TMAO than the respective C groups. This observation might indicate that elderly individuals have a limited capacity to recover from organ damage after an acute cardiovascular event [51]. Guanidoacetate or 2-hydroxybutyrate might also reflect established organ damage in young adults, as altered levels were also observed in the CVE group.

### Limitations

The present study fulfilled the requirements of an omics study in terms of group size and technical workflow [52]; however, one limitation was the relatively low number of patients from a clinical perspective, and further studies are warranted in larger cohorts before considering the use of these new urinary biomarkers in clinical practice. Differences in medication resulting from lifestyle and CVD prevention strategies adjusted individually might have influenced the observed data. Even so, the identified metabolic signatures may still have value in addition to current estimators once the individual is being controlled by available therapy. That being said, the strength of the correlations found in this study and the fact that the metabolic variations reported here confirm previous observations from our group and others linked to cardiovascular risk raise the possibility that the required larger cohorts would simply confirm our data. Future prospective trials with clinical cardiovascular endpoints would be needed to address whether the metabolites shown here can complement traditional risk factors.

### Conclusions

We identified three different metabolic signatures in urine associated with cardiovascular risk according to age: specific to young adults (30–50 years), shared by middle-aged (50–70 years), and elderly (> 70 years) adults and common to all three age-based cohorts. These data confirm previous findings on specific biomarkers and provide novel molecular indicators to be evaluated for lifetime risk of cardiovascular disease. The metabolic signatures identified differ between those individuals with cardiovascular risk and control subjects. A trend towards control values after overcoming a cardiovascular event could be observed mainly in young adults, indicating potentially better cardiovascular recover with pharmacological treatment in this population.

**Acknowledgments** The authors acknowledge Lucía Guerrero and María Cruz Casal (Hospital 12 de Octubre), Paloma Martínez (Ibermutuamur), and Tamara Sastre (Hospital Nacional de Parapléjicos) for their participation in sample collection and patients' classification.

**Authors' contributions** FM, EC, GRH, MGB, FV, LMR, and GAL contributed to the conception or design of the work. PJM, MA, DM, MML, MBM, ASH, JMGS, MC, EC, GRH, MGB, FV, LMR, and GAL contributed to the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work. PJM, MML, LMR, and GAL drafted the manuscript. MA, DM, MBM, ASH, JMGS, FM, MC, EC, GRH, and MGB critically revised the manuscript. All gave final approval and agree to be accountable for all aspects of work ensuring integrity and accuracy.

**Funding** This work was supported by grants from the ISCIII co-supported by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Fondos FEDER)

PI14/01650, PI14/01917, PI14/01841, PI16/01334, IF08/3667-1, FI12/00126, CPII15/00027, CP15/00129, PT13/0001/0013, PI17/01093, PI17/01193, PI18/00995, Grant PRB3 (IPT17/0019 ISCIIS-GEFI/ERDF); REDinREN (RD12/0021/0001, RD16/0009); CAM (2018-T2/BMD-11561); Sociedad Española de Cardiología para la Investigación Básica 2017; Fundación SENEFRO, Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo; and Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz. Results are lined up with the Spanish initiative on the Human Proteome Project.

## Compliance with ethical standards

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

**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/>.

## References

- Karmali KN, Lloyd-Jones DM (2013) Adding a life-course perspective to cardiovascular-risk communication. *Nat Rev Cardiol* 10:111–115
- Anand SS, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Yusufali AH, Keltai M, Diaz R, Rangarajan S, Yusuf S et al (2008) Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *Eur Heart J* 29:932–940
- Lind L, Sundström J, Ärnlöv J, Lampa E (2018) Impact of aging on the strength of cardiovascular risk factors: a longitudinal study over 40 years. *J Am Heart Assoc* 7. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007061>
- Sacramento-Pacheco J, Duarte-Clíments G, Gómez-Salgado J, Romero-Martín M, Sánchez-Gómez MB (2019) Cardiovascular risk assessment tools: a scoping review. *Aust Crit Care* 32:540–559
- Cooney MT, Dudina AL, Graham IM (2009) Value and limitations of existing scores for the assessment of cardiovascular risk: a review for clinicians. *J Am Coll Cardiol* 54:1209–1227
- Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, Ibañez B, López-Melgar B, Laclaustra M, Oliva B, Mocoora A, Mendiguren J, Martínez de Vega V et al (2015) Prevalence, vascular distribution, and multiterritorial extent of subclinical atherosclerosis in a middle-aged cohort: the PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation* 131:2104–2113
- Arbab-Zadeh A, Fuster V (2015) The myth of the “vulnerable plaque”: transitioning from a focus on individual lesions to atherosclerotic disease burden for coronary artery disease risk assessment. *J Am Coll Cardiol* 65:846–855
- Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G et al (2003) From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 108:1772–1778
- Spring B, Moller AC, Colangelo LA, Siddique J, Roehrig M, Daviglius ML, Polak JF, Reis JP, Sidney S, Liu K (2014) Healthy lifestyle change and subclinical atherosclerosis in young adults: coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Circulation* 130:10–17
- Johnson LC, Parker K, Aguirre BF, Nemkov TG, D’Alessandro A, Johnson SA, Seals DR, Martens CR (2019) The plasma metabolome as a predictor of biological aging in humans. *Geroscience* 41:895–906
- Störk S, Feelders RA, van den Beld AW, Steyerberg EW, Savelkoul HFJ, Lamberts SWJ, Grobbee DE, Bots ML (2006) Prediction of mortality risk in the elderly. *Am J Med* 119:519–525
- Christiaens T (2008) Cardiovascular risk tables. *BMJ* 336:1445–1446
- Newgard CB (2017) Metabolomics and metabolic diseases: where do we stand? *Cell Metab* 25:43–56
- Ruiz-Canela M, Hruba A, Clish CB, Liang L, Martínez-González MA, Hu FB (2017) Comprehensive metabolomic profiling and incident cardiovascular disease: a systematic review. *J Am Heart Assoc* 6. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005705>
- Yap IKS, Brown IJ, Chan Q, Wijeyesekera A, Garcia-Perez I, Bictash M, Loo RL, Chadeau-Hyam M, Ebbels T, Iorio MD et al (2010) Metabolome-wide association study identifies multiple biomarkers that discriminate north and south Chinese populations at differing risks of cardiovascular disease: INTERMAP study. *J Proteome Res* 9:6647–6654
- Zethelius B, Berglund L, Sundström J, Ingelsson E, Basu S, Larsson A, Venge P, Ärnlöv J (2008) Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 358:2107–2116
- Rizza S, Copetti M, Rossi C, Cianfarani MA, Zucchelli M, Luzi A, Pecchioli C, Porzio O, di Cola G, Urbani A et al (2014) Metabolomics signature improves the prediction of cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis* 232:260–264
- Martin-Lorenzo M, Zubiri I, Maroto AS, Gonzalez-Calero L, Posada-Ayala M, de la Cuesta F, Mourino-Alvarez L, Lopez-Almodovar LF, Calvo-Bonacho E, Ruilope LM et al (2015) KLL1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery. *Metabolomics* 11:1056–1067
- Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, Maroto AS, Martinez PJ, Zubiri I, de la Cuesta F, Mourino-Alvarez L, Barderas MG, Heredero A, Aldamiz-Echevarría G et al (2016) Cytoskeleton de-regulation and impairment in amino acids and energy metabolism in early atherosclerosis at aortic tissue with reflection in plasma. *Biochim Biophys Acta* 1862:725–732
- Martínez PJ, Baldán-Martín M, López JA, Martín-Lorenzo M, Santiago-Hernández A, Agudiez M, Cabrera M, Calvo E, Vázquez J, Ruiz-Hurtado G et al (2019) Identification of six cardiovascular risk biomarkers in the young population: a promising tool for early prevention. *Atherosclerosis* 282:67–74
- Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, Martínez PJ, Baldan-Martín M, Ruiz-Hurtado G, Segura J, de la Cuesta F, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F et al (2016) Hypertensive patients exhibit an altered metabolism. A specific metabolite signature in urine is able to predict albuminuria progression. *Transl Res* 178:25–37.e7
- Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, Sajed T, Johnson D, Li C, Karu N et al (2018) HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res* 46:D608–D617
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18:655–673
- Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS (2002) Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* 34:379–388

25. Ruiz-Hurtado G, Condezo-Hoyos L, Pulido-Olmo H, Aranguéz I, del Carmen González M, Arribas S, Cerezo C, Segura J, Praga M, Fernández-Alfonso MS et al (2014) Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *J Hypertens* 32:2082–2091 discussion 2091
26. Wang Y, Sun W, Zheng J, Xu C, Wang X, Li T, Tang Y, Li Z (2018) Urinary metabolomic study of patients with acute coronary syndrome using UPLC-QTOF/MS. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 1100–1101:122–130
27. Zhao H, Liu Y, Li Z, Song Y, Cai X, Liu Y, Zhang T, Yang L, Li L, Gao S et al (2018) Identification of essential hypertension biomarkers in human urine by non-targeted metabolomics based on UPLC-Q-TOF/MS. *Clin Chim Acta* 486:192–198
28. Kim Y-J, Ryu H-M, Choi J-Y, Cho JH, Kim CD, Park SH, Kim YL (2017) Hypoxanthine causes endothelial dysfunction through oxidative stress-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 482:821–827
29. Farthing DE, Farthing CA, Xi L (2015) Inosine and hypoxanthine as novel biomarkers for cardiac ischemia: from bench to point-of-care. *Exp Biol Med (Maywood)* 240:821–831
30. Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V (2016) Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol* 213: 8–14
31. Muiesan ML, Agabiti-Rosei C, Paini A, Salvetti M (2016) Uric acid and cardiovascular disease: an update. *Eur Cardiol* 11:54–59
32. Deidda M, Piras C, Cadeddu Dessalvi C, Congia D, Locci E, Ascedu F, de Candia G, Cadeddu M, Lai G, Pirisi R et al (2017) Blood metabolomic fingerprint is distinct in healthy coronary and in stenosing or microvascular ischemic heart disease. *J Transl Med* 15:112
33. Gall WE, Beebe K, Lawton KA, Adam K-P, Mitchell MW, Nakhle PJ, Ryals JA, Milburn MV, Nannipieri M, Camastra S et al (2010) alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS One* 5:e10883
34. Laborde CM, Mourino-Alvarez L, Posada-Ayala M, Alvarez-Llamas G, Serranillos-Reus MG, Moreu J, Vivanco F, Padial LR, Barderas MG (2014) Plasma metabolomics reveals a potential panel of biomarkers for early diagnosis in acute coronary syndrome. *Metabolomics* 10:414–424
35. Zhou X, He L, Wu C, Zhang Y, Wu X, Yin Y (2017) Serine alleviates oxidative stress via supporting glutathione synthesis and methionine cycle in mice. *Mol Nutr Food Res* 61. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700262>
36. Zhou X, He L, Zuo S, Zhang Y, Wan D, Long C, Huang P, Wu X, Wu C, Liu G et al (2018) Serine prevented high-fat diet-induced oxidative stress by activating AMPK and epigenetically modulating the expression of glutathione synthesis-related genes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864:488–498
37. Huemer M, Carvalho DR, Brum JM, Ünal Ö, Coskun T, Weisfeld-Adams JD, Schragger NL, Scholl-Bürgi S, Schlune A, Donner MG et al (2016) Clinical phenotype, biochemical profile, and treatment in 19 patients with arginase 1 deficiency. *J Inher Metab Dis* 39:331–340
38. Tousoulis D, Antoniades C, Tentolouris C, Goumas G, Stefanadis C, Toutouzas P (2002) L-arginine in cardiovascular disease: dream or reality? *Vasc Med* 7:203–211
39. Sen S, Roy S, Bandyopadhyay G, Scott B, Xiao D, Ramadoss S, Mahata SK, Chaudhuri G (2016)  $\gamma$ -Aminobutyric acid is synthesized and released by the endothelium: potential implications. *Circ Res* 119:621–634
40. Yang Y, Luo H, Cheng L-X, Liu K (2013) Inhibitory role for GABA in atherosclerosis. *Med Hypotheses* 81:803–804
41. Kovacic JC, Lee P, Baber U, Karajgikar R, Evrard SM, Moreno P, Mehran R, Fuster V, Dangas G, Sharma SK et al (2012) Inverse relationship between body mass index and coronary artery calcification in patients with clinically significant coronary lesions. *Atherosclerosis* 221:176–182
42. Freitas WM, Carvalho LSF, Moura FA, Sposito AC (2012) Atherosclerotic disease in octogenarians: a challenge for science and clinical practice. *Atherosclerosis* 225:281–289
43. Dai D-F, Rabinovitch PS, Ungvari Z (2012) Mitochondria and cardiovascular aging. *Circ Res* 110:1109–1124
44. Posada-Ayala M, Zubiri I, Martin-Lorenzo M, Sanz-Maroto A, Molero D, Gonzalez-Calero L, Fernandez-Fernandez B, de la Cuesta F, Laborde CM et al (2014) Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease. *Kidney Int* 85:103–111
45. Reddy P, Leong J, Jialal I (2018) Amino acid levels in nascent metabolic syndrome: a contributor to the pro-inflammatory burden. *J Diabetes Complicat* 32:465–469
46. Patel A, Thompson A, Abdelmalek L, Adams-Huet B, Jialal I (2019) The relationship between tyramine levels and inflammation in metabolic syndrome. *Horm Mol Biol Clin Invest* 40. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2019-0047>
47. Yang L, Li Z, Song Y, Liu Y, Zhao H, Liu Y, Zhang T, Yuan Y, Cai X, Wang S et al (2019) Study on urine metabolic profiling and pathogenesis of hyperlipidemia. *Clin Chim Acta* 495:365–373
48. Kanitsoraphan C, Rattanawong P, Charoensri S, Senthong V (2018) Trimethylamine N-oxide and risk of cardiovascular disease and mortality. *Curr Nutr Rep* 7:207–213
49. Qi J, You T, Li J, Pan T, Xiang L, Han Y, Zhu L (2018) Circulating trimethylamine N-oxide and the risk of cardiovascular diseases: a systematic review and meta-analysis of 11 prospective cohort studies. *J Cell Mol Med* 22:185–194
50. Cieslarova Z, Magaldi M, Barros LA, do Lago CL, Oliveira DR, Fonseca FAH, Izar MC, Lopes AS, Tavares MFM, Klassen A (2019) Capillary electrophoresis with dual diode array detection and tandem mass spectrometry to access cardiovascular biomarkers candidates in human urine: Trimethylamine-N-Oxide and l-carnitine. *J Chromatogr A* 1583:136–142
51. Suzuki T, Heaney LM, Jones DJL, Ng LL (2017) Trimethylamine N-oxide and risk stratification after acute myocardial infarction. *Clin Chem* 63:420–428
52. Rifai N, Gillette MA, Carr SA (2006) Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 24:971–983

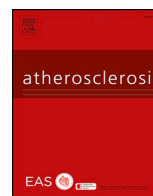
**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Atherosclerosis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/atherosclerosis](http://www.elsevier.com/locate/atherosclerosis)

## Identification of six cardiovascular risk biomarkers in the young population: A promising tool for early prevention



Paula J. Martínez<sup>a</sup>, Montserrat Baldán-Martín<sup>b</sup>, Juan A. López<sup>c</sup>, Marta Martín-Lorenzo<sup>a</sup>, Aránzazu Santiago-Hernández<sup>a</sup>, Marta Agudiez<sup>a</sup>, Martha Cabrera<sup>d</sup>, Eva Calvo<sup>d</sup>, Jesús Vázquez<sup>c</sup>, Gema Ruiz-Hurtado<sup>e</sup>, Fernando Vivanco<sup>f</sup>, Luis M. Ruilope<sup>e,g,h,\*\*</sup>, María G. Barderas<sup>b</sup>, Gloria Alvarez-Llamas<sup>a,i,\*</sup>

<sup>a</sup> Immunoallergy and Proteomics Laboratory, Department of Immunology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Vascular Physiopathology, Hospital Nacional de Paraplégicos SESCAM, Toledo, Spain

<sup>c</sup> Laboratory of Cardiovascular Proteomics CNIC, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Ibermutuamur, Madrid, Spain

<sup>e</sup> Cardiorenal Translational Laboratory, Instituto de Investigación I+12, Hospital Universitario 12 de Octubre/CIBER-CV, Madrid, Spain

<sup>f</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, I Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>g</sup> Hypertension Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>h</sup> School of Doctoral Studies and Research, Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain

<sup>i</sup> REDINREN, Madrid, Spain

### HIGHLIGHTS

- Cardiovascular risk in the young/middle-age population is underestimated.
- The urinary proteome reflects changes modulated by CV risk or existing damage.
- Six proteins compose a fingerprint in asymptomatic individuals with CV risk factors.
- This tool would improve the accuracy of CV risk estimation and prevention criteria.

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Cardiovascular risk  
Early prevention  
Lifetime risk  
Proteomics  
Systems biology analysis  
Biomarkers

### ABSTRACT

**Background and aims:** The predictive value of traditional CV risk calculators is limited. Novel indicators of CVD progression are needed particularly in the young population. The main aim of this study was the identification of a molecular profile with added value to classical CV risk estimation.

**Methods:** Eighty-one subjects (30–50 years) were classified in 3 groups according to their CV risk: healthy subjects; individuals with CV risk factors; and those who had suffered a previous CV event. The urine proteome was quantitatively analyzed and significantly altered proteins were identified between patients' groups, either related to CV risk or established organ damage. Target-MS and ELISA were used for confirmation in independent patients' cohorts. Systems Biology Analysis (SBA) was carried out to identify functional categories behind CVD. **Results:** 4309 proteins were identified, 75 of them differentially expressed. ADX, ECP, FETUB, GDF15, GUAD and NOTCH1 compose a fingerprint positively correlating with lifetime risk estimate (LTR QRISK). Best performance ROC curve was obtained when ECP, GDF15 and GUAD were combined (AUC = 0.96). SBA revealed oxidative stress response, dilated cardiomyopathy, signaling by Wnt and proteasome, as main functional processes related to CV risk. **Conclusions:** A novel urinary protein signature is shown, which correlates with CV risk estimation in young individuals. Pending further confirmation, this six-protein-panel could help in CV risk assessment.

**Abbreviations:** ADX, adrenodoxin; ECP, eosinophil cationic protein; FETUB, fetuin B; GDF15, growth differentiation factor 15; GUAD, guanine deaminase; LTR, lifetime risk; NOTCH1, neurogenic locus notch homolog protein 1; SBA, system biology analysis; SRM, selected monitoring reaction; TMT, tandem mass tag

\* Corresponding author. IIS-Fundación Jiménez Díaz, Avenida Reyes Católicos 2, 28040, Madrid, Spain.

\*\* Corresponding author. Unidad de Hipertensión, Instituto de Investigación i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida de Córdoba s/n, 28041, Madrid, Spain.

E-mail addresses: [ruilope@icloud.com](mailto:ruilope@icloud.com) (L.M. Ruilope), [galvarez@fjd.es](mailto:galvarez@fjd.es) (G. Alvarez-Llamas).

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.01.003>

Received 12 September 2018; Received in revised form 26 December 2018; Accepted 10 January 2019

Available online 14 January 2019

0021-9150/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of premature death worldwide despite improvements in outcomes. Cardiovascular (CV) risk is the result of multiple and interacting factors, and different algorithms are available to estimate CV risk in apparently healthy persons in the short-medium term (5–10 years), mainly based on age, gender, race, cholesterol levels, blood pressure, smoking habits and existence of diabetes. The Systematic Coronary Risk Evaluation (SCORE), recommended by the European Society of Cardiology (ESC) prevention guidelines [1], estimates the 10-year risk of a fatal atherosclerotic event, including coronary artery disease (CAD), stroke and abdominal aortic aneurysm. Therefore, CV risk of mortality rather than total CV risk (fatal and nonfatal) is assessed. The ESC guidelines suggest that the risk of total CVD may be calculated from the risk of CVD mortality using a fixed multiplier ( $3 \times$ ). Nevertheless, the use of a fixed multiplier to estimate the 10-year total CVD risk from CVD mortality risk is controversial [2,3]. On the other hand, American guidelines define the 10-year risk as the risk of developing a first atherosclerotic CV event as nonfatal myocardial infarction or coronary heart disease death or fatal or nonfatal stroke over a 10-year period [4]. In any case, estimations in the short-medium-term have limitations since the majority of patients with low CV risk over the next 10 years show high risk at long-term if the estimation is calculated along their likely remaining lifetime (Lifetime Risk calculation or LTR QRISK) [5–8]. As age is one of the most contributing factors in these algorithms, CV risk of young population is particularly underestimated. As result, few young individuals reach treatment thresholds for intervention and, consequently, efficient prevention strategies are delayed. This limitation collides with the fact that the atherosclerotic process begins early in life and optimum prevention strategies should start in young population. In agreement, the prevalence and progression of subclinical atherosclerosis in individuals of  $\leq 50$  years with low 10-year CV risk but high LTR is greater than in individuals with low 10-year and low LTR [9].

Despite the knowledge of main risk factors and the enormous efforts dedicated to improve prevention, the asymptomatic and silent course of atherosclerosis hampers an accurate and individualized CV risk evaluation. Additional strategies and novel tools are needed to add further knowledge of molecular subjacent mechanisms taking place in atherosclerosis development. Omics technologies allow the identification of significant changes in proteins or metabolites abundance in CVD without pre-selection of molecular targets to be investigated, meaning that no-bias is introduced in the study [10,11]. Our group previously identified

proteins and metabolites in urine, showing an altered response in acute coronary syndrome and reflecting patient's recovery [12]. Significant alterations directly occurring at arterial tissue were also identified with reflection in plasma [13,14]. Specific molecular fingerprints in urine and plasma were previously identified in hypertensive patients developing albuminuria as those of higher CV risk [15–21]. In those sense, omics not only allow identification of novel markers to improve early diagnosis but also to monitor patient's prognosis [22]. Following these approaches, here we aimed to identify novel urinary targets linked to CV risk in the young population (30–50 years), with added value to current estimations based on LTR. When ordinary CV risk factors are elevated in young people, they predict a significant increase in cardio-renal damage at later stages in life. On the other hand, subclinical atherosclerosis is already present in the middle-age population and, in a small percentage of young people, CV events or even death can occur [23]. However, in the great majority of this population, CV risk factors are within normal levels. In this work, we recruited young subjects who were classified in three groups to represent the general population at that age concerning CV risk.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patient selection and urine collection

Urine samples were collected from 81 subjects aged between 30 and 50 years, who were classified according to their CV risk in 3 groups: “control” group (C) ( $n = 32$ ) of healthy subjects with no medication; “factor” group (F) ( $n = 24$ ), including individuals with glomerular filtration rate  $< 100$  or albuminuria, and at least one of: arterial hypertension or patients treated with anti-hypertensive medications, hyperglycaemia (glucose in blood  $> 110$  mg/dL) and/or metabolic syndrome; and “CV event” group (E) ( $n = 25$ ), including non-diabetic individuals who had suffered a nonfatal stroke or acute myocardial infarction (AMI) in the previous 3 years. All subjects included in the study were screened with detailed medical history, physical examination and biochemical profile. Lifetime Risk or LTR QRISK, referred as LTR in the manuscript, was estimated with the calculator <https://qrisk.org/lifetime/>. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital 12 de Octubre and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All patients signed written informed consent before inclusion. Urine samples were collected in sterile containers, centrifuged at 3000g, 10 min, and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

**Table 1**

Baseline clinical data of different cohorts expressed as mean  $\pm$  S.D. or percentages.

|                                   | DISCOVERY PHASE |               |              | SRM CONFIRMATION |              |              | ELISA CONFIRMATION |              |
|-----------------------------------|-----------------|---------------|--------------|------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|
|                                   | C               | F             | E            | C                | F            | E            | C                  | F            |
| n                                 | 10              | 8             | 12           | 15               | 16           | 13           | 30                 | 24           |
| Age (years)                       | 44 $\pm$ 5      | 44 $\pm$ 6    | 45 $\pm$ 5   | 42 $\pm$ 5       | 44 $\pm$ 5   | 45 $\pm$ 4   | 42 $\pm$ 5         | 44 $\pm$ 5   |
| Sex (male), %                     | 60              | 50            | 67           | 13               | 88           | 92           | 53                 | 75           |
| Glycaemia (mg/dl)                 | 79 $\pm$ 7      | 104 $\pm$ 45  | 100 $\pm$ 24 | 80 $\pm$ 8       | 95 $\pm$ 22  | 117 $\pm$ 54 | 80 $\pm$ 8         | 98 $\pm$ 32  |
| eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> ) | 91 $\pm$ 8      | 97 $\pm$ 21   | 98 $\pm$ 27  | 95 $\pm$ 11      | 85 $\pm$ 9   | 98 $\pm$ 15  | 94 $\pm$ 10        | 89 $\pm$ 15  |
| Systolic blood pressure (mmHg)    | 113 $\pm$ 10    | 131 $\pm$ 8   | 122 $\pm$ 16 | 111 $\pm$ 8      | 139 $\pm$ 13 | 122 $\pm$ 22 | 112 $\pm$ 9        | 136 $\pm$ 12 |
| Diastolic blood pressure (mmHg)   | 73 $\pm$ 8      | 84 $\pm$ 10   | 75 $\pm$ 10  | 70 $\pm$ 8       | 90 $\pm$ 8   | 77 $\pm$ 14  | 71 $\pm$ 8         | 88 $\pm$ 9   |
| Metabolic syndrome, %             | 10              | 13            | 0            | 0                | 81           | 15           | 3                  | 54           |
| Total cholesterol (mg/dl)         | 197 $\pm$ 30    | 207 $\pm$ 36  | 158 $\pm$ 36 | 192 $\pm$ 41     | 208 $\pm$ 35 | 138 $\pm$ 41 | 196 $\pm$ 8        | 208 $\pm$ 35 |
| HDL cholesterol (mg/dl)           | 70 $\pm$ 19     | 53 $\pm$ 12   | 43 $\pm$ 10  | 73 $\pm$ 16      | 38 $\pm$ 9   | 40 $\pm$ 11  | 71 $\pm$ 17        | 43 $\pm$ 12  |
| LDL cholesterol (mg/dl)           | 112 $\pm$ 32    | 131 $\pm$ 34  | 90 $\pm$ 33  | 102 $\pm$ 31     | 135 $\pm$ 33 | 73 $\pm$ 40  | 108 $\pm$ 31       | 134 $\pm$ 33 |
| Triglycerides (mg/dl)             | 88 $\pm$ 50     | 140 $\pm$ 121 | 121 $\pm$ 72 | 80 $\pm$ 29      | 220 $\pm$ 72 | 105 $\pm$ 35 | 85 $\pm$ 39        | 193 $\pm$ 99 |
| Uric acid (mg/dl)                 | 5 $\pm$ 1.5     | 5 $\pm$ 0.9   | 6 $\pm$ 1.4  | 4 $\pm$ 0.9      | 7 $\pm$ 1.7  | 6 $\pm$ 1.4  | 5 $\pm$ 1.2        | 6 $\pm$ 1.7  |
| Current smoking, %                | 0               | 25            | 50           | 27               | 25           | 69           | 17                 | 25           |
| Antihypertensives, %              | 0               | 25            | 8            | 0                | 50           | 54           | 0                  | 42           |
| Lipid-lowering agents, %          | 0               | 13            | 8            | 0                | 25           | 46           | 0                  | 21           |
| LTR QRISK                         | 24 $\pm$ 8      | 34 $\pm$ 8    | -            | 21 $\pm$ 3       | 47 $\pm$ 7   | -            | 23 $\pm$ 6         | 42 $\pm$ 10  |

C: control group, E: CV event group, eGFR: estimated glomerular filtration rate, F: CV risk factor group.

## 2.2. Quantitative differential analysis by TMT

In a first discovery phase, the urine proteome from 30 subjects (n: (C) = 10; (F) = 8; (E) = 12, Table 1) was quantitatively analyzed by isobaric labeling (TMT, Thermo Fisher Scientific) following manufacturer's instructions, as previously published [24]. Urine proteins were subject to tryptic digestion and the resulting peptides were TMT-labeled, desalted and fractionated by high-pH reverse phase chromatography. The fractions were analyzed by LC-MS/MS on an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher). All spectra were analyzed with Proteome Discoverer (version 2.1.0.81, Thermo Fisher Scientific) using SEQUEST-HT (Thermo Fisher Scientific). Database searching was performed at the Uniprot database containing all sequences from human and contaminants (May 14th, 2016; 70611 entries). Peptide identification was performed using the probability ratio method [25], and the false discovery rate (FDR) was calculated using inverted databases and the refined method [26] with an additional filtering for precursor mass tolerance of 15 ppm [27]. Identified peptides had a FDR equal or lower than 1% FDR. Only those peptides were used to quantify the relative abundance of each protein from reporter ion intensities, and statistical analysis of quantitative data was performed using the WSPP statistical model previously described [28,29]. In this model, protein log<sub>2</sub>-ratios are expressed as standardized variables, i.e., in units of standard deviation according to their estimated variances (Zq values).

Proteins that were identified with at least two peptides and showed homogeneous Zq values within each group (Student's t-test  $p < 0.05$ ) were selected, being eliminated those proteins that showed differences according to gender. Changes in protein abundances between groups were calculated by comparing their Zq mean values, considering differentially expressed those proteins with differences of mean  $Zq \geq |1.5|$ .

## 2.3. System biology analysis (SBA)

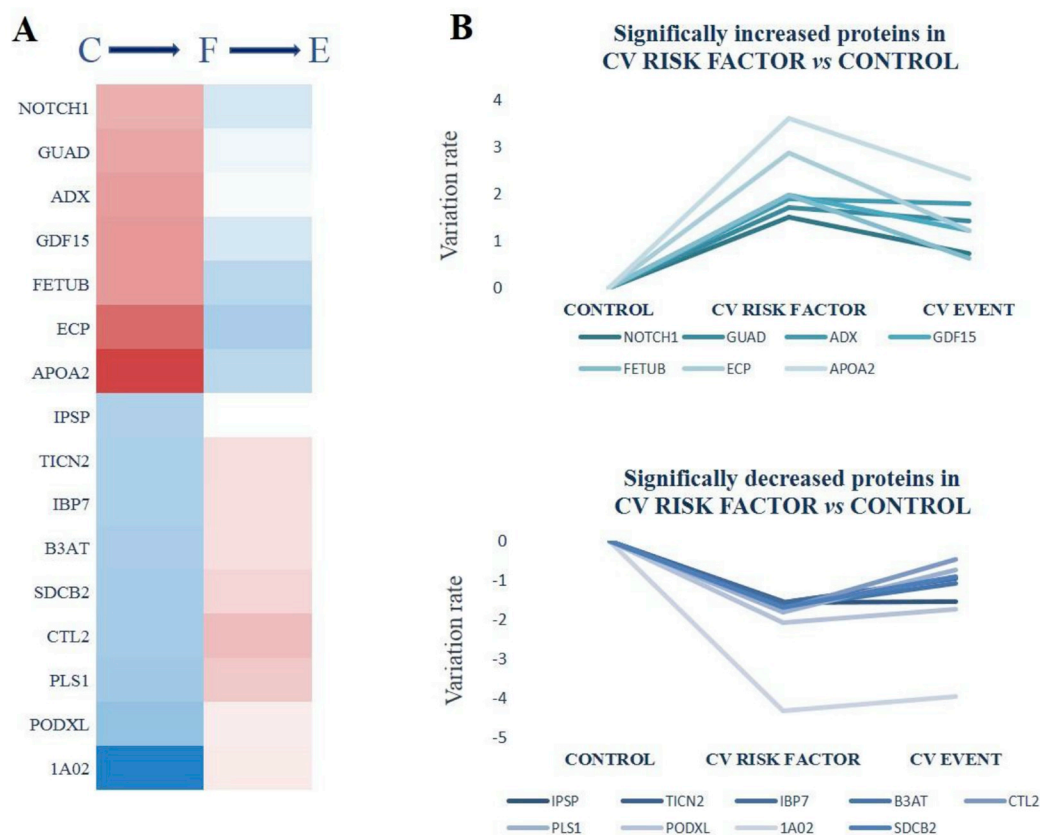
Functional protein analysis of the whole set of quantified proteins was performed using the Systems Biology Triangle, a novel algorithm specifically developed for the analysis of coordinated protein responses in high-throughput quantitative proteomics experiments [29]. This algorithm correlates the performance of a group of proteins inside a category (biological process) in terms of their quantitative behavior (relative abundance); thus, changes can be detected in functional biological processes far beyond individual protein responses. As a result of this coordinated behavior, a Z value is assigned to each category (Zcat). To identify the significant biological process altered in disease progressions, F and E groups were compared to the control group applying  $Zcat \geq 2.9$  and  $FDR < 0.05$ . Variations in the abundance of functional categories were visualized by comparing the cumulative frequency (sigmoid) plots of the standardized variable with that of the normal distribution as performed previously [28].

## 2.4. Targeted protein analysis

Confirmation of protein variations in response to CV risk was done by either mass spectrometry using Selected Reaction Monitoring (SRM) (n: (C) = 15; (F) = 16; (E) = 13) or by ELISA (n: (C) = 30; (F) = 24) in independent cohorts of subjects compared to those used in the discovery phase (Table 1).

### 2.4.1. SRM analysis

Targeted SRM analysis was performed as previously described [12,14,15,18,30]. Briefly, urine proteins were digested and proteotypic peptides were analyzed on a 6460QQQ MS connected to ChipCube-



**Fig. 1.** Urine proteins showing significantly altered levels in subjects with CV risk factors compared to healthy controls: a link to CV risk. (A) Proteins with significant variation in F with respect to C. Differences in abundance between groups are represented in Zq average by color code: decreased (blue, from -4 to 0), increased (red, from 0 to +4). (B) Variation of these proteins, showing a recovery towards the “healthy” status in most cases. C: control group, E: CV event group, F: CV risk factor group.

nanoLC (Agilent Technologies). SRM transitions were manually inspected and analysis conditions were set-up for each transition. The fragmentor was set to 130 V, dwell time to 20 ms and delta EMV to 600 V (Supplementary Table 1). Peak areas were used for inter-group comparison and statistical analyses were performed by GraphPad Prism 6 (version 6.01). The ROUT method was applied to detect outliers based on the FDR, setting Q value to 5%. Mann-Whitney non-parametric test (95% confidence level) was performed. Univariate and multivariate ROC curves were calculated with MetabolAnalyst software using ROC curve based model evaluation (Tester) and Random forest algorithm.

2.4.2. ELISA analysis

Confirmation by ELISA was performed in urine from individual samples (Table 1), following manufacturer's instructions of human GDF-15 ELISA Kit (Abcam), human RNASE3/ECP ELISA Kit (Elabscience) and human GDA ELISA Kit (Elabscience). Standard curves can be found in Supplementary Fig. 1. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6 (version 6.01) applying Mann-Whitney non-parametric test (95% confidence level).

2.4.3. Data statement

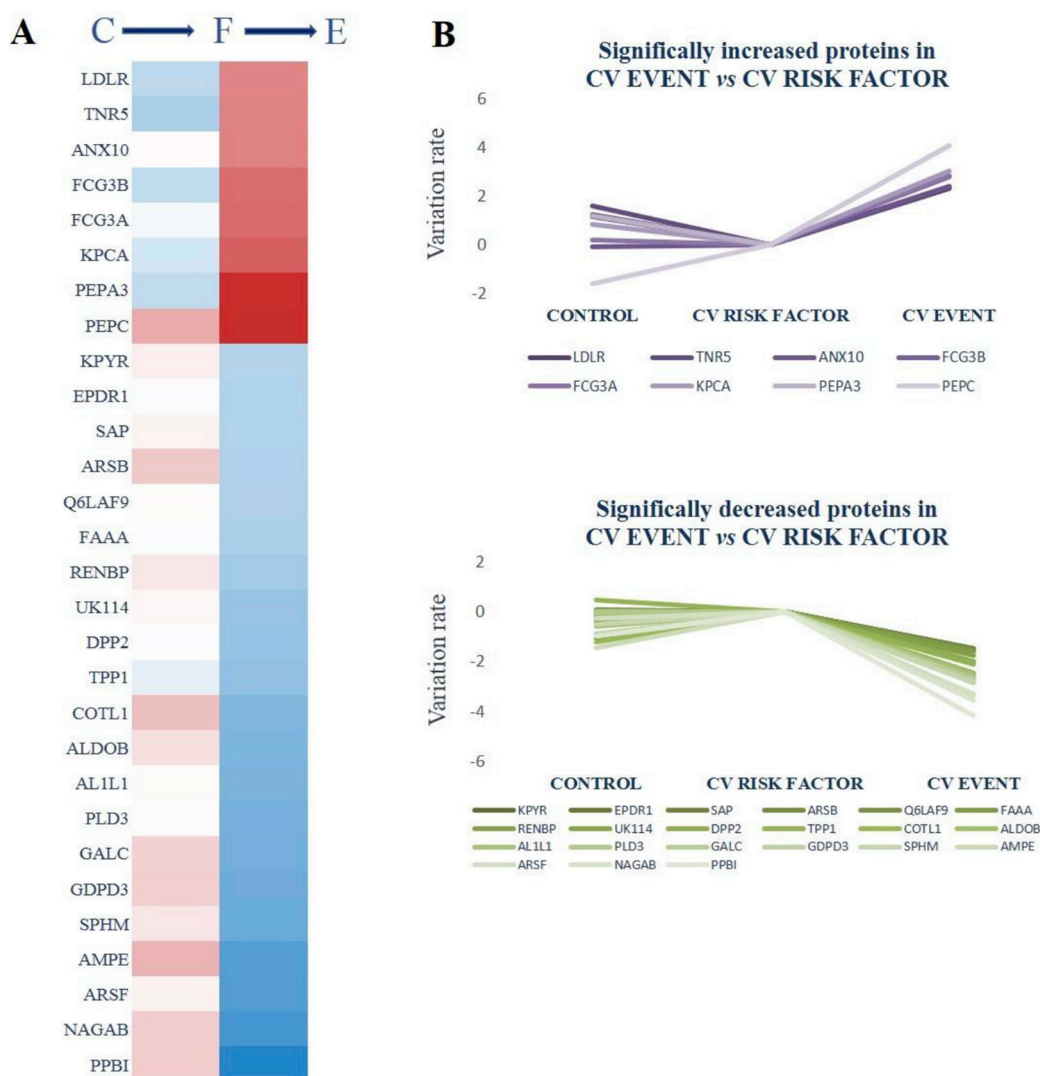
Datasets are in the process of being deposited.

3. Results

Characteristics of the study population are listed in Table 1, corresponding to the 81 recruited subjects classified as control (C), CV risk factor group (F) or those who had suffered a CV acute event (E). All subjects were aged between 30 and 50 years. As expected, the main differences observed between groups are those resulting from their CV risk status, e.g. hypertension, glycaemia, lipid profile or pharmacological treatment.

3.1. The urine proteome varies with CV risk and established damage after an acute event

A total of 4309 proteins were identified by mass spectrometry in urine (Supplementary Table 2), from which 75 proteins showed statistically significant abundance changes (Supplementary Table 3). Sixteen proteins showed differences in abundance between risk factors group (F) and control group (C): 7 increased and 9 decreased in F (Fig. 1A). Analysis of



**Fig. 2.** Urine proteins showing altered levels in individuals recovered from an acute event compared to subjects with CV risk factors: a link to established organ damage. (A) Proteins with significant variation in E with respect to F. Differences in abundance between groups are represented in Zq average by color code: decreased (blue, from -4 to 0), increased (red, from 0 to +4). (B) Protein variation, showing protein responses to established CV damage despite full recovery after a CV event. C: control group, E: CV event group, F: CV risk factor group.

the changes of these proteins along the three populations (Fig. 1B) revealed that most proteins levels tend to recover (towards control values) in those individuals who had suffered an acute event (E). When looking for proteins altered in the event group (E) compared to the factor group (F), 29 proteins significantly varied in abundance: 8 increased and 21 decreased in E (Fig. 2A). These 29 proteins showed minor differences between C and F groups (Fig. 2B), thus mainly reflecting established damage for these patients once recovered from the acute event. Forty-four proteins showed significant alteration between groups E and C (7 increased and 37 decreased in E) (Supplementary Table 3).

3.2. Systems biology analysis revealed altered biological processes linked to CV risk estimate

SBA of the whole set of 4309 proteins enabled to identify functional categories with significant alteration in young individuals with CV risk. A functional category involves a group of proteins with coordinated behavior

and may arise as significant even if the proteins are not significantly altered individually. As such, this analysis provided added value to the individual protein analysis previously described. Oxidative stress response, dilated cardiomyopathy, chronic kidney disease, cell death of cardiomyocytes, signaling by Wnt and several categories related to protein biosynthesis, proteasome and cytoskeleton, were significantly increased in CV risk factors group (F) with respect to control group (C) (Supplementary Fig. 2 and Supplementary Table 4A). Functional categories related to coagulation, extracellular matrix, calcium flux, hemostasis and vascular system were significantly decreased in F group (Supplementary Fig. 2 and Supplementary Table 4B).

3.3. A urinary fingerprint composed by six proteins varies with CV risk in the young population

Our last goal was to identify molecular indicators associated with CV risk estimate in the young population. Thus, we focused on those proteins

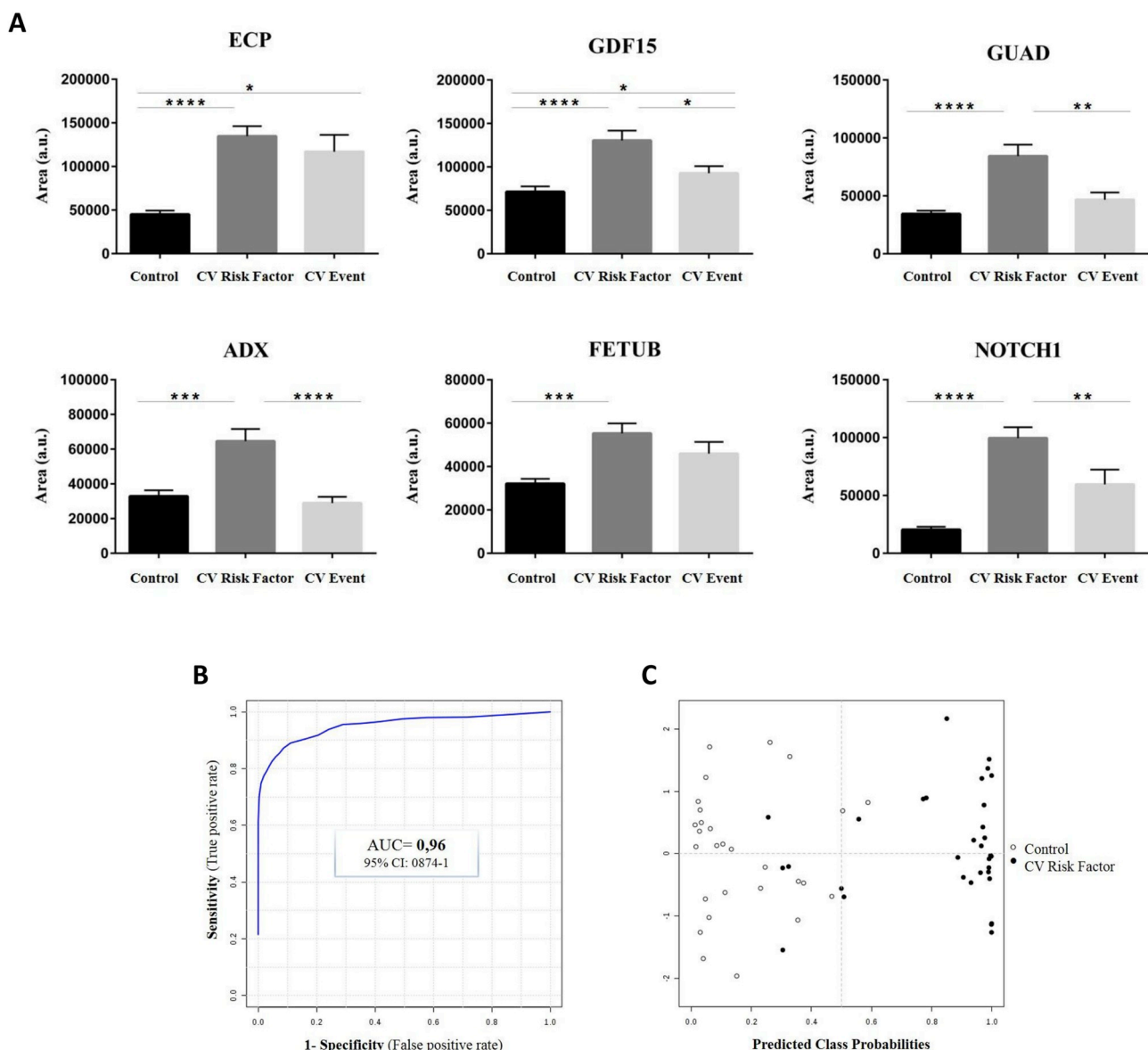


Fig. 3. Confirmation by target mass spectrometry and evaluation of clinical sensitivity and specificity. (A) Target analysis by selected reaction monitoring (SRM) of proteins associated with CV risk. (B) Multivariate receiver operating curve (ROC) and (C) predicted class graph for the CV risk proteins ECP, GDF15 and GUAD. AUC, area under the curve; CI, confidence interval; ADX, adrenodoxin; ECP, eosinophil cationic protein; FETUB, fetuin B; GDF15, growth differentiation factor 15; GUAD, guanine deaminase; NOTCH1, neurogenic locus notch homolog protein 1. Mann-Whitney non-parametric test (95% confidence level) was performed. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

significantly increased in urine from individuals with CV risk factors (F) with respect to healthy controls (C) (Fig. 1A, Supplementary Table 3). Adrenodoxin (ADX), eosinophil cationic protein (ECP), fetuin B (FETUB), growth differentiation factor 15 (GDF15), guanine deaminase (GUAD) and neurogenic locus notch homolog protein 1 (NOTCH1) proteins were analyzed for confirmation using a different technical approach (SRM), and in a different group of individual samples (Table 1). Increased abundance in the CV risk group (F) was confirmed for the 6 proteins (Fig. 3A). Area under the curve (AUC) values from individual and multivariate ROC curves showed the best performance when ECP, GDF15 and GUAD are combined, resulting in AUC = 0.96 (Fig. 3B). Predicted class probabilities graph also shows good separation between patients groups (Fig. 3C). By ELISA, significant variation was found for these three proteins in the risk factors group (F) versus control group (C), thus confirming again previous data in a different cohort of subjects (Fig. 4). Supplementary Table 5 shows the correlations of the identified proteins with parameters used to estimate CV risk.

### 3.4. The urinary biomarker panel correlates with lifetime risk

Correlation between proteins abundance and LTR was investigated. Significant correlation was found for the 6 proteins as shown in Supplementary Fig. 3 (Spearman correlation values: ADX  $r = 0.4889$   $p < 0.0001$ ; ECP  $r = 0.6221$   $p < 0.0001$ ; FETUB  $r = 0.4762$   $p < 0.0001$ ; GDF15  $r = 0.5570$   $p < 0.0001$ ; GUAD  $r = 0.5549$   $p < 0.0001$ ; and NOTCH1  $r = 0.6493$   $p < 0.0001$ ), showing a positive correlation in all cases. It means that both the LTR and the values of these 6 proteins in the urine of patients increase while increasing their CV risk estimate, showing a pattern represented by the correlation coefficient that could be considered as adequate in any biological background.

## 4. Discussion

The need to overcome current limitations of CV risk available estimations, particularly in the young population, prompts the identification of novel indicators with added value to existing algorithms. In this sense, the ultimate goal to reduce CVD mortality is to introduce novel and easily quantifiable molecular targets in the clinic, which can serve to monitor the general population at early stages of atherosclerosis development [23]. The actual proteomic strategies offer the possibility to identify thousands of proteins in a biological context while identifying the most relevant variations linked to a certain pathological status, not only in individual proteins but also in biological processes [29].

### 4.1. The urinary proteome correlates with CV risk estimate

This study shows how the urinary proteome reflects specific protein changes, which are modulated by the status of CV risk or existing damage. Different sub-sets of proteins were identified with altered urine levels either in subjects with CV risk factors, or in those who had

suffered an acute CV event despite being fully recovered, as recently reported by our group in plasma [24]. Following quantitative analysis of the whole urinary proteome by different technical approaches and in different patients' cohorts, we highlight six proteins with significantly increased urinary levels in individuals with CV risk factors compared to healthy subjects: ADX, ECP, FETUB, GDF15, GUAD and NOTCH1. It was found a significant and positive correlation between the 6 proteins and LTR. The variation in these proteins decreases after an acute nonfatal event, showing their association with CV risk more than organ damage. With regard to the latter, their reduced levels in the event group could be attributed to the fact that these patients have been accordingly managed following the event and have a better lifestyle, thus reducing their CV risk. Interestingly, we developed a novel target mass spectrometry assay based on SRM methodology. SRM high throughput and automation capacity allow a significant shortening of the analysis time compared to non-mass spectrometry-based approaches, thus improving the cost-effectiveness compared to conventional procedures.

### 4.2. Oxidative stress, inflammation and CV risk

In line with previous findings from our group in hypertensive patients who develop albuminuria [19,21,30], SBA showed oxidative stress response as a significantly increased functional category in individuals with CV risk factors with respect to healthy controls. Oxidative stress is known to be involved in the pathogenesis of CVD as myocardial infarction, atherosclerosis, cardiac hypertrophy or congestive heart failure [31,32]. GUAD is an aminohydrolase enzyme that converts guanine to xanthine in the uric acid cycle, in which also participates xanthine oxidase, one of the major sources of ROS in the human heart, since it produces  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  while catalyzing the conversion of hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid [33]. Hyperuricemia has been considered a key risk factor for the development of gout, renal dysfunction, hypertension, hyperlipidemia, diabetes and obesity [33,34]. An increase in GUAD gene expression was associated with the development of hypertensive cardiac hypertrophy or diastolic heart failure, in a study with spontaneously hypertensive rats [35]. Moreover, uric acid levels, even below the clinical threshold for hyperuricemia, are associated with increased CV risk by increasing oxidative stress, promoting endothelial dysfunction and enhancing inflammation [36]. GDF15 is expressed and secreted by macrophages, cardiomyocytes, vascular smooth muscle cells, adipocytes and endothelial cells, in response to inflammation, oxidative stress, hypoxia or mechanical stress [37,38]. GDF15 has a CV protective function, since it regulates signaling pathways essential for cardioprotection [39]. It has been shown to be strongly associated with future CV events and complements established risk predictors in CVD progression and prognosis [40–42].

In the inflammatory context of CVD, macrophages increase the expression of CCL5/RANTES chemokine, which could attract activated eosinophils through its CCR3 receptor. Several studies have shown an association between eosinophils and CVD [43,44]. ECP is a marker of

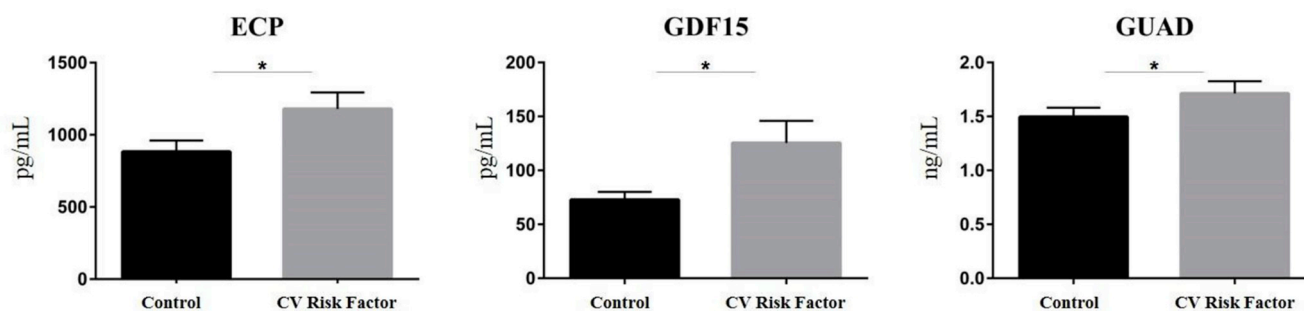


Fig. 4. ELISA analysis of proteins associated with CV risk. Mann-Whitney non-parametric test (95% confidence level) was performed. \* $p < 0.05$ . ECP, eosinophil cationic protein; GDF15, growth differentiation factor 15; GUAD, guanine deaminase.

eosinophil activity and degranulation, which has been proposed as biomarker of coronary atherosclerosis [45] and risk marker for ischemic stroke [46]. A protective role of ECP under oxidative stress has been described, as it inhibits ROS-induced apoptosis in cardiomyocytes via PI3K-Akt pathway [47].

Related to FETUB, serum levels were significantly higher in patients with CAD when compared to healthy controls, being proposed as a potential biomarker for CAD [48]. Besides, expression level of FETUB was significantly increased in patients with AMI compared with stable angina subjects, suggesting that serum FETUB is involved in the development of AMI by influencing atherosclerotic plaque rupture [49]. Our data are in alignment with these observations, as FETUB increases in young individuals with CV risk factors. With the same trend, we identified NOTCH1. Endothelial NOTCH1 acts as an antagonist of endothelial cell activation preventing inflammation in the aorta, and circulating lipids were shown to decrease NOTCH1 expression and signaling in human aortic endothelial cells [50]. With this evidence, a reduction of endothelial NOTCH1 has been proposed as a predisposing factor of initiation of atherosclerosis. However, expression and activation of NOTCH1 in podocytes, which is mostly silenced in the glomeruli of normal mature human kidney, has been correlated with development of proteinuria, glomerulosclerosis and kidney dysfunction [51–54].

#### 4.3. Cardio-renal damage and urinary pattern

The cross-talk between the heart and the kidneys is clearly evidenced [55]. Observational and clinical data showed that acute/chronic worsening of kidney function directly contributes to acute/chronic cardiac disease and *viceversa*, deriving in the simultaneous presence of the cardio-renal damage [56]. In early stages, chronic kidney disease (CKD) develops silently and asymptomatic, which enormously complicates early diagnosis and intervention. Surprisingly, although none of our patients showed albuminuria, systems biology analysis detected an alteration in the behavior of CKD-related proteins, arising as a category significantly increased in the CV risk factor group compared to healthy controls. Interestingly, this pattern is not coincidental with the one that we described in hypertensive subjects chronically RAS suppressed [15,22,30]. This indicates that the proteomic urinary pattern changes during long-term evolution of cardio-renal damage. Sustained activation of Notch and Wnt signaling in podocytes was shown to be causally related to albuminuria development in genetically modified animal models, being albuminuria a strong and independent indicator of increased CV risk and supporting our findings shown here in a young population [57]. Wnt signaling was also identified in individuals with CV risk, in agreement with an upregulation of Wnt signaling described in atherosclerosis and cardiometabolic diseases [58–60].

#### 4.4. Limitations

The study fulfilled the requirements of an omics study in terms of group size and technical workflow [61]. Protein variations identified in a first discovery stage were confirmed by different technical approaches and in different patients' cohorts. The main limitation could be the relatively low number of patients from a clinical point of view and prior to translation to clinical practice, further studies (e.g. multicentric, wider cohorts) should follow. However, the strength of the correlations found in this trial enhances the possibility that the required larger multicenter cohorts to further confirm their potential use in CV risk stratification could simply confirm our data. Future prospective trials with clinical CV endpoints would be needed to address if the proteins here shown are risk markers up and above traditional risk estimates, reflecting risks factors, organ damage or response to organ damage. The role of these proteins may be different in primary and secondary prevention.

#### 4.5. Conclusions

We have identified ADX, ECP, FETUB, GDF15, GUAD and NOTCH1, as urinary proteins linked to CV risk estimate in young individuals with traditional CV risk factors. This finding correlates with LTR being a potential tool to improve the accuracy of CV risk estimation in the young population.

#### Conflict of interests

The authors declared they do not have anything to disclose regarding conflict of interest with respect to this manuscript.

#### Author contributions

PJM, MBM, JAL and MA performed the experiments. PJM, MBM, JAL, MML, ASH, JV participated in data analysis/interpretation, figures and literature search. MC and EV participated in clinical data collection. GRH, FV, LMR, MGB and GAL designed the study and contributed to data interpretation, and manuscript drafting.

#### Financial support

ISCIII co-supported by FEDER grants (PI14/01650, PI14/01917, PI14/01841, PI16/01334, IF08/3667-1, FI12/00126, CPII5/00027, CP15/00129, PT13/0001/0013, PI17/01093, PI17/01193, PRB3 (IPT17/0019 ISCIIS-GEFI/ERDF, REDinREN (RD12/0021/0001, RD16/0009)), Fundación SENEPRO, Fundación Íñigo Álvarez de Toledo and Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz. Results are lined up with the Spanish initiative on the Human Proteome Project.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge Lucía Guerrero and Maria Cruz Casal (Hospital 12 de Octubre) for their participation in samples collection and patients' classification.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.01.003>.

#### References

- [1] M.F. Piepoli, A.W. Hoes, S. Agewall, et al., European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: the sixth joint task force of the European society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European association for cardiovascular prevention & rehabilitation (EACPR), *Eur. Heart J.* 37 (2016) 2315–2381 2016.
- [2] H.T. Jørstad, E.B. Colkesen, S.M. Boekholdt, et al., Estimated 10-year cardiovascular mortality seriously underestimates overall cardiovascular risk, *Heart Br. Card. Soc.* 102 (2016) 63–68.
- [3] K.N. Karmali, D.M. Lloyd-Jones, Using a multiplier of 10-year cardiovascular mortality underestimates cardiovascular risk in younger individuals and women, *Evid. Based Med.* 21 (2016) 150.
- [4] D.C. Goff, D.M. Lloyd-Jones, G. Bennett, et al., ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American college of Cardiology/ American heart association task force on practice guidelines, *J. Am. Coll. Cardiol.* 63 (2013) 2935–2959 2014.
- [5] K.N. Karmali, D.M. Lloyd-Jones, Adding a life-course perspective to cardiovascular risk communication, *Nat. Rev. Cardiol.* 10 (2013) 111–115.
- [6] A.K. Marma, J.D. Berry, H. Ning, S.D. Persell, D.M. Lloyd-Jones, Distribution of 10-year and lifetime predicted risks for cardiovascular disease in US adults: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 2003 to 2006, *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* 3 (2010) 8–14.
- [7] J.D. Berry, A. Dyer, X. Cai, et al., Lifetime risks of cardiovascular disease, *N. Engl. J. Med.* 366 (2012) 321–329.
- [8] J. Hippisley-Cox, C. Coupland, J. Robson, P. Brindle, Derivation, validation, and evaluation of a new QRISK model to estimate lifetime risk of cardiovascular disease: cohort study using QResearch database, *BMJ* 341 (2010) c6624.
- [9] J.D. Berry, K. Liu, A.R. Folsom, et al., Prevalence and progression of subclinical atherosclerosis in younger adults with low short-term but high lifetime estimated

- risk for cardiovascular disease: the coronary artery risk development in young adults study and multi-ethnic study of atherosclerosis, *Circulation* 119 (2009) 382–389.
- [10] M. Martín-Lorenzo, G. Alvarez-Llamas, L.A. McDonnell, F. Vivanco, Molecular histology of arteries: mass spectrometry imaging as a novel *ex vivo* tool to investigate atherosclerosis, *Expert Rev. Proteomics* 13 (2016) 69–81.
- [11] M.G. Barderas, C.M. Laborde, M. Posada, et al., Metabolomic profiling for identification of novel potential biomarkers in cardiovascular diseases, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 790132.
- [12] M. Martín-Lorenzo, I. Zubiri, A.S. Maroto, et al., KLK1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery, *Metabolomics*, 11 (2015) 1056–1067.
- [13] M. Martín-Lorenzo, B. Balluff, A.S. Maroto, et al., Molecular anatomy of ascending aorta in atherosclerosis by MS Imaging: specific lipid and protein patterns reflect pathology, *J. Proteomics* 126 (2015) 245–251.
- [14] M. Martín-Lorenzo, L. Gonzalez-Calero, A.S. Maroto, et al., Cytoskeleton deregulation and impairment in amino acids and energy metabolism in early atherosclerosis at aortic tissue with reflection in plasma, *Biochim. Biophys. Acta* 1862 (2016) 725–732.
- [15] M. Martín-Lorenzo, L. Gonzalez-Calero, P.J. Martínez, et al., Immune system deregulation in hypertensive patients chronically RAS suppressed developing albuminuria, *Sci. Rep.* 7 (2017) 8894.
- [16] A.D. Bates, L.F. Bernini, A.T. Natarajan, et al., Detection of somatic mutants in man: HPRT mutations in lymphocytes and hemoglobin mutations in erythrocytes, *Mutat. Res.* 213 (1989) 73–82.
- [17] M. Baldan-Martin, L. Mourino-Alvarez, L. Gonzalez-Calero, et al., Plasma molecular signatures in hypertensive patients with renin-angiotensin system suppression: new predictors of renal damage and de novo albuminuria indicators, *Hypertension (Dallas)* 68 (2016) 157–166.
- [18] L. Gonzalez-Calero, M. Martín-Lorenzo, F. de la Cuesta, et al., Urinary alpha-1 antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression, *Cardiovasc. Diabetol.* 15 (2016) 8.
- [19] H. Pulido-Olmo, C.F. García-Prieto, G. Álvarez-Llamas, et al., Role of matrix metalloproteinase-9 in chronic kidney disease: a new biomarker of resistant albuminuria, *Clin. Sci. Lond. Engl.* 130 (1979) 525–538 2016.
- [20] M. Baldan-Martin, F. de la Cuesta, G. Alvarez-Llamas, et al., Prediction of development and maintenance of high albuminuria during chronic renin-angiotensin system suppression by plasma proteomics, *Int. J. Cardiol.* 196 (2015) 170–177.
- [21] G. Ruiz-Hurtado, L. Condezo-Hoyos, H. Pulido-Olmo, et al., Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression, *J. Hypertens.* 32 (2014) 2082–2091.
- [22] M. Baldan-Martin, E. Rodríguez-Sánchez, L. González-Calero, et al., Translational science in albuminuria: a new view of de novo albuminuria under chronic RAS suppression, *Clin. Sci. Lond. Engl.* 132 (1979) 739–758 2018.
- [23] B. López-Melgar, L. Fernández-Friera, B. Oliva, et al., Subclinical atherosclerosis burden by 3D ultrasound in mid-life: the PESA study, *J. Am. Coll. Cardiol.* 70 (2017) 301–313.
- [24] M. Baldan-Martin, J.A. Lopez, N. Corbacho-Alonso, et al., Potential role of new molecular plasma signatures on cardiovascular risk stratification in asymptomatic individuals, *Sci. Rep.* 8 (2018) 4802.
- [25] S. Martínez-Bartolomé, P. Navarro, F. Martín-Maroto, et al., Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method, *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008) 1135–1145.
- [26] P. Navarro, J. Vázquez, A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 1792–1796.
- [27] E. Bonzon-Kulichenko, F. García-Marques, M. Trevisan-Herraz, J. Vázquez, Revisiting peptide identification by high-accuracy mass spectrometry: problems associated with the use of narrow mass precursor windows, *J. Proteome Res.* 14 (2015) 700–710.
- [28] P. Navarro, M. Trevisan-Herraz, E. Bonzon-Kulichenko, et al., General statistical framework for quantitative proteomics by stable isotope labeling, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 1234–1247.
- [29] F. García-Marqués, M. Trevisan-Herraz, S. Martínez-Martínez, et al., A novel systems-biology algorithm for the analysis of coordinated protein responses using quantitative proteomics, *Mol. Cell. Proteomics MCP* 15 (2016) 1740–1760.
- [30] L. Gonzalez-Calero, P.J. Martínez, M. Martín-Lorenzo, et al., Urinary exosomes reveal protein signatures in hypertensive patients with albuminuria, *Oncotarget* 8 (2017) 44217–44231.
- [31] N.S. Dhalla, R.M. Tamsah, T. Netticadan, Role of oxidative stress in cardiovascular diseases, *J. Hypertens.* 18 (2000) 655–673.
- [32] D.B. Sawyer, D.A. Siwik, L. Xiao, D.R. Pimentel, K. Singh, W.S. Colucci, Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34 (2002) 379–388.
- [33] J. Maiuolo, F. Oppedisano, S. Gratteri, C. Muscoli, V. Mollace, Regulation of uric acid metabolism and excretion, *Int. J. Cardiol.* 213 (2016) 8–14.
- [34] J. Wang, G.-J. Tan, L.-N. Han, Y.-Y. Bai, M. He, H.-B. Liu, Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction, *J. Geriatr. Cardiol. JGC* 14 (2017) 135–150.
- [35] J. Rysä, H. Leskinen, M. Ilves, H. Ruskoaho, Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hypertensive heart failure, *Hypertension (Dallas)* 45 (2005) 927–933.
- [36] Y.L. Jin, T. Zhu, L. Xu, et al., Uric acid levels, even in the normal range, are associated with increased cardiovascular risk: the Guangzhou Biobank Cohort Study, *Int. J. Cardiol.* 168 (2013) 2238–2241.
- [37] X. Xu, Z. Li, W. Gao, Growth differentiation factor 15 in cardiovascular diseases: from bench to bedside, *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 16 (2011) 466–475.
- [38] L. Wallentin, Z. Hijazi, U. Andersson, et al., Growth differentiation factor 15, a marker of oxidative stress and inflammation, for risk assessment in patients with atrial fibrillation: insights from the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) trial, *Circulation* 130 (2014) 1847–1858.
- [39] R. Adela, S.K. Banerjee, GDF-15 as a target and biomarker for diabetes and cardiovascular diseases: a translational prospective, *J. Diabetes Res.* 2015 (2015) 490842.
- [40] J.J. De Haan, S. Haitjema, H.M. den Ruijter, et al., Growth differentiation factor 15 is associated with major amputation and mortality in patients with peripheral artery disease, *J. Am. Heart Assoc.* 6 (2017) e006225.
- [41] K.C. Wollert, T. Kempf, L. Wallentin, Growth differentiation factor 15 as a biomarker in cardiovascular disease, *Clin. Chem.* 63 (2017) 140–151.
- [42] E. Hagström, C. Held, R.A.H. Stewart, et al., Growth differentiation factor 15 predicts all-cause morbidity and mortality in stable coronary heart disease, *Clin. Chem.* 63 (2017) 325–333.
- [43] G. Niccoli, N. Cosentino, Eosinophils: a new player in coronary atherosclerotic disease, *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 35 (2012) 269–271.
- [44] R.L. Prentice, T.P. Szatrowski, T. Fujikura, H. Kato, M.W. Mason, H.H. Hamilton, Leukocyte counts and coronary heart disease in a Japanese cohort, *Am. J. Epidemiol.* 116 (1982) 496–509.
- [45] G. Niccoli, G. Ferrante, N. Cosentino, et al., Eosinophil cationic protein: a new biomarker of coronary atherosclerosis, *Atherosclerosis* 211 (2010) 606–611.
- [46] L. Lind, A. Siegbahn, B. Lindahl, M. Stenemo, J. Sundström, J. Ärnlöv, Discovery of new risk markers for ischemic stroke using a novel targeted proteomics chip, *Stroke* 46 (2015) 3340–3347.
- [47] H. Ishii, S. Kamikawa, S. Hirohata, et al., Eosinophil cationic protein shows survival effect on H9c2 cardiac myoblast cells with enhanced phosphorylation of ERK and akt/GSK-3 $\beta$  under oxidative stress, *Acta Med. Okayama* 69 (2015) 145–153.
- [48] K. Zhu, Y. Wang, P. Shu, et al., Increased serum levels of fetuin B in patients with coronary artery disease, *Endocrine* 58 (2017) 97–105.
- [49] S.H. Jung, K.-J. Won, K.P. Lee, et al., The serum protein fetuin-B is involved in the development of acute myocardial infarction, *Clin. Sci. Lond. Engl.* 129 (2015) 27–38.
- [50] A. Briot, M. Civelek, A. Seki, et al., Endothelial NOTCH1 is suppressed by circulating lipids and antagonizes inflammation during atherosclerosis, *J. Exp. Med.* 212 (2015) 2147–2163.
- [51] M.T. Sweetwyne, A. Gruenwald, T. Niranjan, R. Nishinakamura, L.J. Strobl, K. Susztak, Notch1 and Notch2 in podocytes play differential roles during diabetic nephropathy development, *Diabetes* 64 (2015) 4099–4111.
- [52] T. Niranjan, B. Bielez, A. Gruenwald, et al., The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease, *Nat. Med.* 14 (2008) 290–298.
- [53] M. Murea, J.-K. Park, S. Sharma, et al., Expression of Notch pathway proteins correlates with albuminuria, glomerulosclerosis, and renal function, *Kidney Int.* 78 (2010) 514–522.
- [54] K. Asanuma, J.A. Oliva Trejo, E. Tanaka, The role of Notch signaling in kidney podocytes, *Clin. Exp. Nephrol.* 21 (2017) 1–6.
- [55] G. Ruiz-Hurtado, P. Sarafidis, M.S. Fernández-Alfonso, B. Waeber, L.M. Ruilope, Global cardiovascular protection in chronic kidney disease, *Nat. Rev. Cardiol.* 13 (2016) 603–608.
- [56] L. Gonzalez-Calero, M. Martín-Lorenzo, G. Alvarez-Llamas, Exosomes: a potential key target in cardio-renal syndrome, *Front. Immunol.* 5 (2014) 465.
- [57] H. Kato, K. Susztak, Repair problems in podocytes: Wnt, Notch, and glomerulosclerosis, *Semin. Nephrol.* 32 (2012) 350–356.
- [58] W. Matthijs Blankesteijn, K.C.M. Hermans, Wnt signaling in atherosclerosis, *Eur. J. Pharmacol.* 763 (2015) 122–130.
- [59] I. Albanese, K. Khan, B. Barratt, H. Al-Kindi, A. Schwertani, Atherosclerotic calcification: Wnt is the hint, *J. Am. Heart Assoc.* 7 (2018) e007356.
- [60] A. Gay, D.A. Towler, Wnt signaling in cardiovascular disease: opportunities and challenges, *Curr. Opin. Lipidol.* 28 (2017) 387–396.
- [61] N. Rifai, M.A. Gillette, S.A. Carr, Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 971–983.

# Urine Haptoglobin and Haptoglobin-Related Protein Predict Response to Spironolactone in Patients With Resistant Hypertension

Marta Martin-Lorenzo,\* Paula J. Martinez,\* Montserrat Baldan-Martin, Juan A. Lopez, Pablo Minguez, Aranzazu Santiago-Hernandez, Jesus Vazquez, Julian Segura, Gema Ruiz-Hurtado, Fernando Vivanco, Maria G. Barderas, Luis M. Ruilope, Gloria Alvarez-Llamas

**Abstract**—Resistant hypertension prevalence is progressively increasing, and prolonged exposure to suboptimal blood pressure control results in higher cardiovascular risk and end-organ damage. Among various antihypertensive agents, spironolactone seems the most effective choice to treat resistant hypertension once triple therapy including a diuretic fails. However success in blood pressure control is not guaranteed, adverse effects are not negligible, and no clinical tools are available to predict patient's response. Complementary to our previous study of resistant hypertension metabolism, here we investigated urinary proteome changes with potential capacity to predict response to spironolactone. Twenty-nine resistant hypertensives were included. A prospective study was conducted and basal urine was collected before spironolactone administration. Patients were classified in responders or nonresponders in terms of blood pressure control. Protein quantitation was performed by liquid chromatography–mass spectrometry; ELISA and target mass spectrometry analysis were performed for confirmation. Among 3310 identified proteins, HP (haptoglobin) and HPR (haptoglobin-related protein) showed the most significant variations, with increased levels in nonresponders compared with responders before drug administration (variation rate, 5.98 and 7.83, respectively). Protein-coordinated responses were also evaluated by functional enrichment analysis, finding oxidative stress, chronic inflammatory response, blood coagulation, complement activation, and regulation of focal adhesions as physiopathological mechanisms in resistant hypertension. In conclusion, protein changes able to predict patients' response to spironolactone in basal urine were here identified for the first time. These data, once further confirmed, will support clinical decisions on patients' management while contributing to optimize the rate of control of resistant hypertensives with spironolactone. (*Hypertension*. 2019;73:00-00. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12242.) • [Online Data Supplement](#)

**Key Words:** blood pressure ■ haptoglobin ■ human ■ proteomics ■ resistant hypertension ■ spironolactone

Resistant hypertension (RH) is defined as blood pressure (BP) above target despite the concurrent use of 3 antihypertensive drugs, including a diuretic, a renin-angiotensin inhibitor, and a calcium channel blocker, prescribed at optimal doses. The prevalence of RH, including pseudoresistant hypertension, is about 13% of hypertensive adults estimated with a threshold of  $\geq 140/90$  mmHg.<sup>1</sup> The consequent increase in cardiovascular disease, end-stage renal disease, and death is about 2- to 6-fold compared with nonresistant hypertensives.<sup>2</sup> These data highlight the importance of an appropriate management of RH. Spironolactone is an aldosterone antagonist to treat RH, being able to decrease BP in 22/10 (ASCOT

study [Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial])<sup>3</sup> or 9.8/1.0 mmHg (ASPIRANT study [Addition of Spironolactone in Patients With Resistant Arterial Hypertension]).<sup>4</sup> It has been strongly demonstrated as the most suitable fourth drug to be added to the commonly prescribed triple-antihypertension therapy. The ASPIRANT and ASPIRANT EXTENSION<sup>4,5</sup> trials first and the PATHWAY-2 study (The Prevention and Treatment of Hypertension With Algorithm-Based Therapy)<sup>6</sup> later showed that spironolactone was more effective than placebo or other BP-lowering drugs and the best fourth drug option.<sup>7</sup> Nonpharmacological treatment has been also evaluated, mainly renal denervation, concluding again on the

Received October 15, 2018; first decision October 30, 2018; revision accepted January 10, 2019.

From the Laboratory of Immunoallergy and Proteomics, Department of Immunology (M.M.-L., P.J.M., A.S.-H., G.A.-L.) and Department of Genetics (P.M.), IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, Madrid, Spain; Department of Vascular Physiopathology, Hospital Nacional de Paraplégicos SESCAM, Toledo, Spain (M.B.-M., M.G.B.); Laboratory of Cardiovascular Proteomics CNIC, Madrid, Spain (J.A.L., J.V.); Department of Nephrology, Hypertension Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain (J.S., L.M.R.); Cardiorenal Translational Laboratory, Instituto de Investigación I+12 Hospital Universitario 12 de Octubre/CIBER-CV, Madrid, Spain (G.R.-H., L.M.R.); Department of Biochemistry and Molecular Biology, I Universidad Complutense, Madrid, Spain (F.V.); School of Doctoral Studies and Research, Universidad Europea de Madrid, Spain (L.M.R.); and REDINREN, Madrid, Spain (G.A.-L.).

\*These authors contributed equally to this work.

The online-only Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12242>.

Correspondence to Gloria Alvarez-Llamas, Department of Immunology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Avenida Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. Email galvarez@fjd.es

© 2019 American Heart Association, Inc.

*Hypertension* is available at <https://www.ahajournals.org/journal/hyp>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12242

Table 1. Baseline Clinical Data of Patients With RH Included in the Study

| Characteristics                              | RH                    |                       |         |
|--|-----------------------|-----------------------|---------|
|  | RHr (n=19)            | RHnr (n=10)           | P Value |
| Age, y                                       | 61±12                 | 68±11                 | 0.161   |
| Sex, %men                                    | 58                    | 50                    | 0.709   |
| Current smoking, %                           | 21                    | 10                    | 0.483   |
| Diabetes mellitus, %                         | 37                    | 50                    | 0.519   |
| Previous CVD, %                              | 11                    | 10                    | 1.000   |
| Duration of hypertension, y                  | 14±25                 | 22±13                 | 0.597   |
| SBP, mm Hg                                   |                       |                       |         |
| Office                                       | 157.1±10              | 169.8±21              | 0.063   |
| 24 h   | 143.7±9               | 147.7±7               | 0.251   |
| Daytime                                      | 146.9±9               | 151±8                 | 0.251   |
| Nighttime                                    | 134.8±12              | 137.8±10              | 0.370   |
| Central                                      | 135.7±11              | 138±20                | 0.755   |
| DBP, mm Hg                                   |                       |                       |         |
| Office                                       | 93.11±10              | 85.4±11               | 0.056   |
| 24 h   | 88.68±8               | 80.5±10               | 0.035   |
| Daytime                                      | 91.21±9               | 82.8±10               | 0.046   |
| Nighttime                                    | 81.42±10              | 73.9±12               | 0.090   |
| Central                                      | 91.83±10              | 84.3±8                | 0.061   |
| Albumin/creatinine, mg/g                     | 13.27<br>(5.67–33.54) | 27.06<br>(7.94–330.6) | 0.176   |
| eGFR by MDRD, mL/min per 1.73 m <sup>2</sup> | 89.54±26              | 82.23±14              | 0.506   |
| ARR  | 0.69<br>(0.47–0.87)   | 1.11<br>(0.61–1.18)   | 0.065   |
| BMI, kg/m <sup>2</sup>                       | 31.12±5               | 30.37±4               | 0.598   |
| Total cholesterol, mg/dL                     | 183.2±30              | 192.2±34              | 0.598   |
| HDL cholesterol, mg/dL                       | 53.06±15              | 60.74±20              | 0.396   |
| LDL cholesterol, mg/dL                       | 102.2±24              | 103.9±32              | 0.630   |
| Triglycerides, mg/dL                         | 127.4±68              | 138.3±57              | 0.551   |
| Antihypertensive drugs, in total             |                       |                       |         |
| ACE inhibitor, %                             | 4                     | 4                     | 0.504   |
| ARB, %                                       | 32                    | 20                    | 0.534   |
| Diuretic, %                                  | 74                    | 80                    | 0.734   |
| Calcium channel blocker, %                   | 84                    | 100                   | 0.208   |
| β-Blocker agent, %                           | 89                    | 80                    | 0.514   |
| α-Blocker agent, %                           | 53                    | 70                    | 0.390   |
| Spironolactone, %                            | 21                    | 20                    | 0.974   |
| Spironolactone, %                            | 100                   | 100                   | 1       |
| Concomitant therapies                        |                       |                       |         |
| Anticoagulant, %                             | 11                    | 0                     | 0.321   |

(Continued)

Table 1. Continued

| Characteristics      | RH         |             |         |
|----------------------|------------|-------------|---------|
|                      | RHr (n=19) | RHnr (n=10) | P Value |
| Statins, %           | 42         | 80          | 0.059   |
| Insulin, %           | 5          | 0           | 0.514   |
| Oral antidiabetic, % | 21         | 40          | 0.300   |

ACE indicates angiotensin-converting enzyme; ARB, angiotensin receptor; ARR, aldosterone-to-renin ratio; BMI, body mass index; CVD, cardiovascular disease; DBP, diastolic blood pressure; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; MDRD, modification of diet in renal disease; RH, resistant hypertension; RHnr, resistant hypertension, nonresponders to spironolactone; RHr, resistant hypertension, responders to spironolactone; and SBP, systolic blood pressure.

superiority of spironolactone administration.<sup>8,9</sup> However, success in BP control by spironolactone therapy is not guaranteed, adverse effects are not negligible (eg, gynecomastia and hyperkalemia), and no clinical tools are available to predict which patients will show a positive response in terms of BP diminishment. Physiopathology behind RH development is greatly unknown, and studies at molecular level are scarce. By evaluating patients' response to different pharmacological treatment, salt retention was recently proposed as the physiopathological condition behind RH, which could explain spironolactone positive action through mineralocorticoid receptor blockade.<sup>10,11</sup> Recently, we identified metabolic alterations subjacent to RH detectable in urine.<sup>12</sup> The citric acid cycle was revealed as the most significantly altered pathway, and a specific metabolic signature composed by oxaloacetate, malate, citrate, and α-ketoglutarate showed increased levels in RH non-responder (RHnr) patients compared with responders (RHr). Interestingly, these 4 urinary metabolites showed altered levels in urine collected before spironolactone administration, thus demonstrating a predictive capacity in patient's response. Complementary to these previous data, here we investigate molecular changes also in basal urine (before drug administration) at the proteome level subjacent to RH with potential capacity to predict response to spironolactone.

## Methods

The authors declare that all supporting data are available within the article and its [online-only Data Supplement](#).

## Patient Selection

We enrolled a total of 29 hypertensive patients arriving at the Hypertension Unit Hospital 12 de Octubre. They were considered as RH patients if they fulfilled the following entry criteria: age ≥18 years and BP levels with mean values on a 24-hour ambulatory BP monitoring >130/80 mm Hg while receiving ≥3 drugs at adequate doses. A 24-hour ambulatory BP monitoring was performed at baseline to confirm true RH. Patients with secondary hypertension were excluded. A prospective study was conducted, aimed to predict response to spironolactone at protein level. Urine samples were collected before spironolactone administration (basal samples). Patients with RH were then treated with 25/50 mg/day of spironolactone, added on top of former antihypertensive treatment. According to patients' response to spironolactone in terms of BP control and not based on modulation on particular protein alterations, patients were classified into RHr and RHnr. RHr were those patients whose 24-hour ambulatory systolic BP dropped ≥20 mm Hg (or attaining systolic BP levels ≤130 mm Hg post-spironolactone). In Table 1, clinical characteristics of patients

are shown. The study was conducted according to the recommendations of the Declaration of Helsinki, it was approved by the local ethics committee, and all subjects gave informed consent. Urine samples were processed and stored as described before.<sup>13–15</sup>

## BP Measurements

BP was measured at the office with a validated semiautomatic oscillometric device, after 5-minute rest in a sitting position. BP values were estimated as the mean of 3 readings. Thereafter, 24-hour ambulatory BP monitoring was performed using PaceLabs 90207 (SpaceLabs, Inc, Redmond, WA) automated noninvasive oscillometric device, programed to register BP at 20-minute intervals for the daytime period and at 30-minute intervals for the nighttime period. The majority of measurements were performed on working days, and the patients were instructed to maintain their usual activities, return the following morning for device removal, and keep the arm extended and immobile at the time of each cuff inflation. Daytime and nighttime periods were defined individually according to the patient self-reported data of going-to-bed and getting-up times.

## Protein Alterations in RH: Tandem Mass Tag Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (MS)/MS Quantitative Analysis of the Urine Proteome

### Protein Digestion and Peptide Isobaric Labeling

Massive protein identification and proteomics analysis of urine samples were performed by liquid chromatography online coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) using isobaric labeling. Tandem Mass Tag (TMT; Thermo Fisher) kit contains different isobaric compounds with the same mass and chemical structure to label urinary peptide samples in parallel. For each sample, a unique reporter mass is used to measure relative protein expression levels during peptide fragmentation and tandem mass spectrometry. In detail, urine proteins were first subjected to tryptic digestion using the FASP (Filter Aided Sample Prep) protocol as described previously<sup>16</sup> with minor modifications. Proteins were digested with modified trypsin (Promega) using a protein:trypsin ratio 30:1 (w/w). The resulting peptides were desalted onto C18 Oasis-HLB cartridges and dried down for further analysis. For stable isobaric labeling, the peptides were dissolved in 100 mmol/L triethylammonium bicarbonate buffer, and the peptide concentration was determined by measuring amide bonds with the Direct Detect system (Millipore). Equal amounts of each peptide sample were labeled using the 10-plex TMT reagents according to manufacturer's protocol. For increasing proteome coverage, TMT-labeled samples were fractionated by high-pH reverse-phase chromatography (High-pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit; Pierce) before analysis.

### Peptide Analysis by LC-MS/MS in Tandem

Labeled peptides were analyzed by LC-MS/MS using a C18 reversed-phase nanocolumn (75  $\mu$ m ID $\times$ 50 cm, 2  $\mu$ m particle size, Acclaim PepMap RSLC, 100 C18; Thermo Fisher Scientific) in a continuous acetonitrile gradient on an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher). An enhanced Fourier-transform resolution spectrum (resolution, 70 000) followed by the MS/MS spectra from the most intense parent ions was analyzed along the chromatographic run. Dynamic exclusion was set at 40 seconds.

### Peptide Identification

For peptide identification, all spectra were analyzed with Proteome Discoverer (version 2.1.0.81; Thermo Fisher Scientific) using SEQUEST-HT (Thermo Fisher Scientific). For database searching, the Uniprot database containing all sequences from human and contaminants (May 14, 2016; 70 611 entries) was used. Peptide identification was performed using the probability ratio method, and false discovery rate (FDR) was calculated using inverted databases and the refined method<sup>17</sup> with an additional filtering for precursor mass tolerance of 15 ppm.<sup>18</sup> Identified peptides had an FDR  $\leq$  1%.

### Statistical Analysis TMT Experiment

Statistical analyses were performed using the WSPP (Weighted Spectrum, Peptide, and Protein) statistical model described previously.<sup>19</sup>

In this model, protein log<sub>2</sub>-ratios are expressed as standardized variables, that is, in units of SD according to their estimated variances ( $Z_q$  values). Proteins identified with  $<3$  peptides and those not showing homogeneous  $Z_q$  values within each group were discarded. Protein abundance changes between groups were calculated by comparing their  $Z_q$  mean values for each protein (RHr versus RHnr).

## Confirmation of Protein Variations in RH: Target Analysis by ELISA and Selected Reaction Monitoring

Individual urine samples from the 29 hypertensive patients were analyzed by commercial ELISA assays and by Selected Reaction Monitoring (SRM-LC-MS/MS). For ELISA analysis, manufacturer protocols were followed and optimal conditions were established for urine samples analyses (Table S1 in the [online-only Data Supplement](#)). SRM-LC-MS/MS was performed as published previously.<sup>13–15</sup> Briefly, tryptic digest from 30  $\mu$ g total protein was analyzed in a 6460 Triple Quadrupole LC/MS/MS online connected to nanoLC in a Chip-format configuration (ChipCube Interface; Agilent Technologies) and 1200 Series LC Modules (Agilent Technologies). Peptide separation was performed onto a ProtID Zorbax 300B-C18-5  $\mu$ m chip with 43 $\times$ 0.075 mm analytical column and 40 nL enrichment column (Agilent Technologies). Two microliters of sample were injected at 3  $\mu$ L/min, and separation took place at 0.4  $\mu$ L/min as follows: (1) 0 to 3 minutes 5% B, (2) At 10 minutes 70% B, (3) At 12 minutes 95% B, (4) At 14 minutes 95% B, and (5) 14.2 to 16 minutes 5% B (A=0.1% formic acid in double distilled water; B=0.1% formic acid in acetonitrile). The fragmentor was set to 130 V, dwell time to 20 ms, delta electron multiplier voltage to 600 V, and collision energy was optimized for each SRM transition (Table S2). The system was controlled by Mass Hunter LC-MS Acquisition Software (v4.01). Individual signals were normalized based on urinary creatinine, and normalized peak areas were calculated for intergroup comparison in both cases, ELISA and SRM analysis.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by means of GraphPad Prism 6 (version 6.01) software. The ROUT method (robust regression and outlier removal) was applied to detect outliers based on the FDR, setting  $Q$  value to 5%. Mann-Whitney nonparametric test (95% confidence level) was performed. For those proteins showing alteration between RHr and RHnr, a multivariate analysis (combined receiver operating characteristics curve) was performed to evaluate their predictor potential using MetaboAnalyst webserver.<sup>20,21</sup> The multivariate receiver operating characteristics curve was obtained using random forest algorithm as built-in method.

### Functional Enrichment Analysis

We applied the functional enrichment method FatiGO,<sup>22</sup> as implemented in the Babelomics platform v5,<sup>23</sup> to the list of upregulated proteins (FDR  $<0.05$  and fold change  $>2$ ) in each (RHr and RHnr) condition. Gene Ontology (GO) was used for the protein annotation. GO terms with FDR  $<0.05$  were taken as significantly overrepresented. GO terms were represented with their ontological relationships using own scripts and the cytoscape tool.<sup>24</sup>

## Results

### Prediction of RH Patients' Response to Spironolactone Treatment

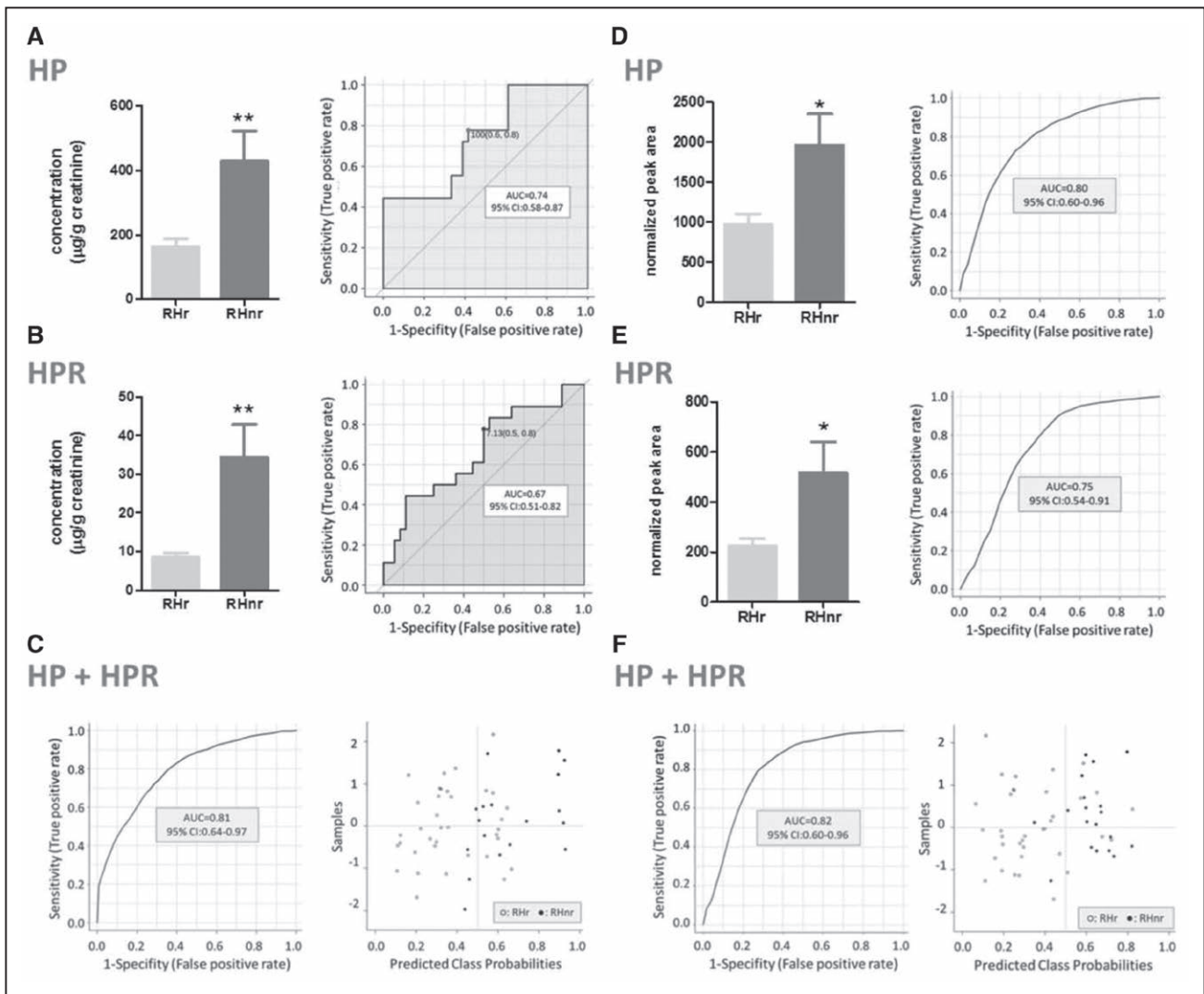
Spironolactone reduced systolic BP in RHr by  $-21.4$  mmHg (95% CI,  $-26.6$  to  $-16.1$ ) compared with a reduction of  $-2.6$  mmHg in RHnr (95% CI,  $-11.9$  to 6.6). We investigated significant protein alterations able to identify those patients with RH who will respond to spironolactone. For that purpose, quantitative proteomics was accomplished in basal urine samples (ie, those collected before treatment). Once known patient's clinical response, individuals were classified in RHr or those remaining

with uncontrolled BP (RHnr). Table 1 compiles patient's clinical characteristics. No significant variation between RHr and RHnr was observed in the presence of diabetes mellitus, smoking habits, previous cardiovascular disease, duration of hypertension, cholesterol, or concomitant therapies, among others.

In the first discovery stage, urine samples were submitted to protein digestion, and resulting peptides were isobaric labeled by TMT methodology and analyzed by LC-MS/MS. Among the 3310 identified proteins, the most significant variations were found for HPR (haptoglobin-related protein) and HP (haptoglobin) showing increased levels in basal urine of RHnr compared with RHr (variation rate of 7.83 for HPR and 5.98 for HP). For confirmation, ELISA assays were performed for absolute protein quantitation (Figure 1A through 1C) finding  $163.6 \pm 146.3 \mu\text{g HP/g creatinine}$  and  $8.5 \pm 6.6 \mu\text{g HPR/g creatinine}$  for RHr and  $430.4 \pm 387.7 \mu\text{g HP/g creatinine}$  and  $34.5 \pm 35.5 \mu\text{g HPR/g creatinine}$  for RHnr ( $P=0.0046$  for HP and  $P=0.0051$  for HPR). Data confirmed increased values for

both proteins in RHnr (Table 2). Sensitivity and specificity were evaluated by means of univariate and multivariate receiver operating characteristic curve, resulting in the area under the curve of 0.74 for HP (Figure 1A) and 0.67 for HPR (Figure 1B). Increased performance was obtained when combined both potential predictors, resulting in the area under the curve value of 0.81 (Figure 1C).

As alternative to conventional ELISA assays of great potential in the clinical setting in terms of cost-effectiveness, easy of automatization, and high-throughput, we developed a target mass spectrometry assay based on SRM methodology. SRM methodology allows significantly shortening the analysis time compared with non-mass spectrometry-based approaches. The best-performing analysis conditions for each protein are detailed in Table S2. SRM analysis (target approach) confirmed again the variation found in the discovery stage (untargeted) with  $P=0.024$  for HP and  $P=0.0479$  for HPR (Figure 1D through 1F). In this case, area under the curve values were



**Figure 1.** HP (haptoglobin) and HPR (HP-related protein) in urine distinguish between patients with resistant hypertension (RH) who respond to spironolactone (RHr) and nonresponder (RHnr) patients. **(A)** HP analysis by ELISA assay and receiver operating characteristics (ROC) curve; **(B)** HPR analysis by ELISA assay and ROC curve; **(C)** combined ROC curve and predicted class probabilities graph with ELISA data, showing good separation between RHr and RHnr; **(D)** HP analysis by SRM-LC/MS/MS and ROC curve (transition  $m/z$  720.3  $\rightarrow$  881.4); **(E)** HPR analysis by SRM-LC/MS/MS and ROC curve (transition  $m/z$  916.4  $\rightarrow$  1122.0); **(F)** combined ROC curve and predicted class probabilities graph with SRM-LC/MS/MS data, showing good separation between RHr and RHnr. All analyses were performed in basal urine samples before drug administration. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ . AUC indicates area under the curve.

0.80 for HP (Figure 1D), 0.75 for HPR (Figure 1E), and 0.82 when combined HP and HPR (Figure 1F). Best performance was obtained when combined HP and HPR proteins, for both ELISA and SRM assays, and, individually, SRM performed better than ELISA for HP and for HPR. Thus, SRM-LC-MS/MS represents a real alternative in clinical routine, with reduced analysis time and superior performance than ELISA for HP and HPR. A positive correlation with the albumin to creatinine ratio was found for both HP ( $r=0.3735$ ;  $P=0.0017$ ) and HPR ( $r=0.5684$ ;  $P=0.0021$ ). When adjusted the potential influence of baseline characteristics as diastolic BP, pulse pressure, eGFR, age, or aldosterone/renin ratio, the predictability of HP and HPR is still significant (Table S3).

### Coordinated Behavior of Proteins in RH

The 3310 proteins identified in the discovery stage are compiled in Table S4. Coordinated responses of upregulated proteins either in RHr or in RHnr were evaluated by functional enrichment analysis. Single enrichment method was applied considering altered proteins with ratio of change  $\geq 2.0$  and compared with the rest of the genome. Figures 2 and 3 show GO terms overrepresented in RHr (upregulated genes in RHr) or RHnr (upregulated genes in RHnr), respectively. Tables S5 and S6 compile the GO terms identified (FDR-adjusted  $P<0.05$ ) and proteins included in each GO term. As can be seen in Figure 2, biological processes significantly overrepresented in RHr point to cellular response to oxidative stress, NADP/H (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) metabolic process, chronic inflammatory response, glucose catabolic process, and regulation of NF- $\kappa$ B transcription factor, among others. Those changes involve alterations in the proteins ANXA1 (annexin A1), CAT (catalase), HBA1 (hemoglobin subunit alpha), HBB (hemoglobin subunit beta), MPO (myeloperoxidase), PGD (6-phosphogluconate dehydrogenase), PLA2G2A (phospholipase A2), PRDX2 (peroxiredoxin-2), S100A12 (protein S100-A12), S100A7, S100A8, S100A9, TALDO1 (transaldolase), and TXN (thioredoxin).

In RHnr, overrepresented proteins are AHSG (alpha-2-HS-glycoprotein), ALB (albumin), C8G (complement component

C8), C9 (complement component C9), CFB (complement factor B), FTL (ferritin light chain), HP, HPX (hemopexin), HRG (histidine-rich glycoprotein), KDR (vascular endothelial growth factor receptor 2), MLLT4 (afadin), MUC6 (mucin-6), NAPSA (napsin-A), ORM1 (alpha-1-acid glycoprotein 1), ORM2, PIP (prolactin-inducible protein), PLG (plasminogen), SERPINA1 (alpha-1-antitrypsin), and TF (serotransferrin) and point to regulation of blood coagulation, complement activation, acute inflammatory response, immune response, VEGF (vascular endothelial growth factor)-signaling pathway, iron homeostasis, and regulation of focal adhesions as main subjacent physiopathological mechanisms (Figure 3).

### Discussion

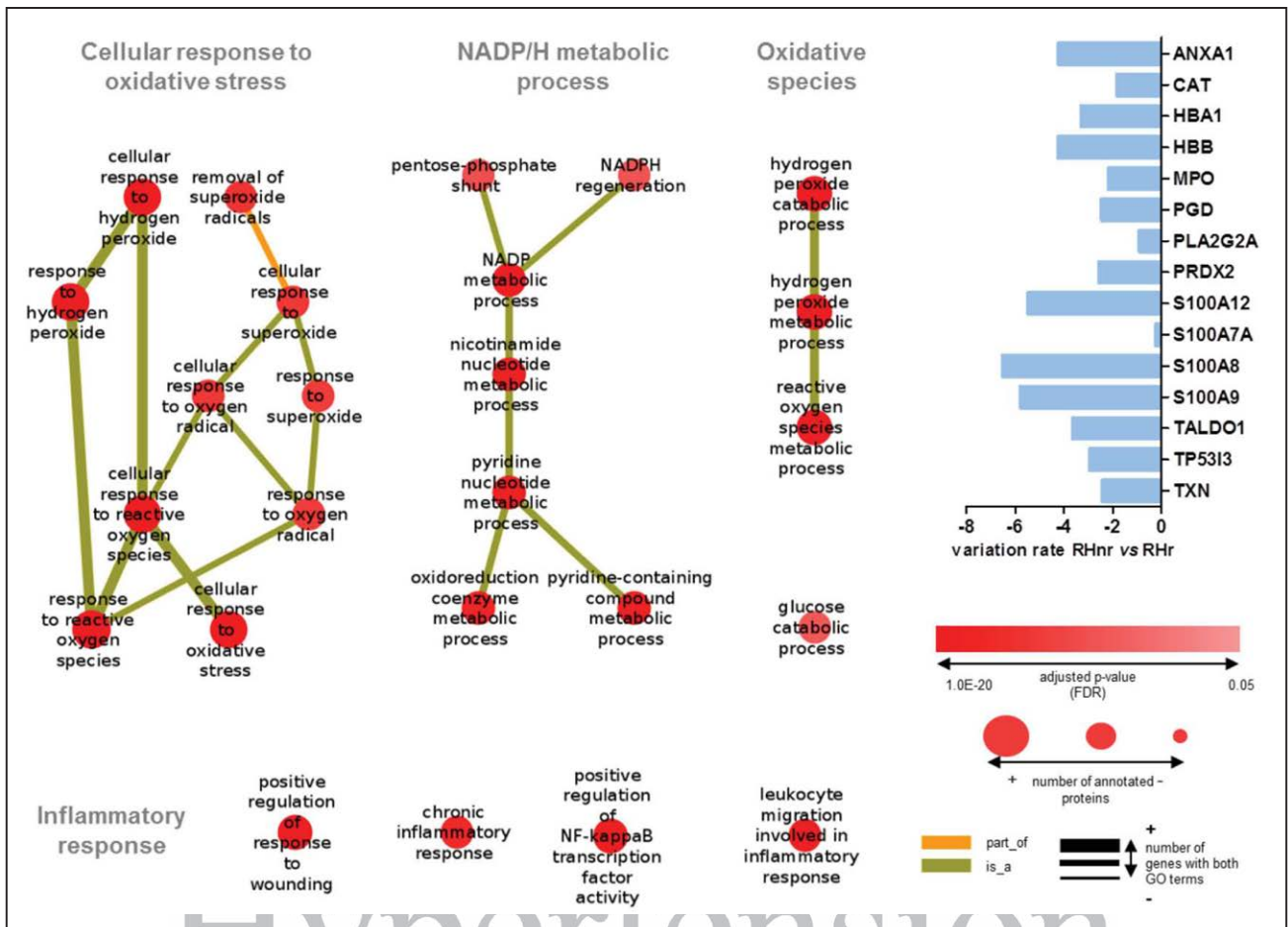
HP and HPR were the most significant changes identified in the protein pattern (with the highest rate of variation), being able to distinguish between RHr and RHnr in basal urine, that is, before spironolactone had been administered. HP and HPR have been mainly described in plasma, and it is known that circulating HP is 10-fold higher than HPR.<sup>25,26</sup> As shown here (Figure 1A and 1B), this ratio is conserved in urine. Previous studies proposed HP to creatinine ratio as predictor of nephropathy complications in type 2 diabetic patients.<sup>27</sup> Here we show, for the first time, its added value in predicting spironolactone response of patients with RH. Both proteins share  $\approx 91\%$  of their sequences and have high affinity for free Hb (hemoglobin) leading to HP-Hb and HPR-Hb complexes. However, these complexes present a significant difference in binding preferences after formation. HP-Hb present high affinity for the scavenger receptor CD163, whereas HPR-Hb complex has higher affinity for HDL (high-density lipoprotein) particles.<sup>26</sup> These affinities differently contribute to immune response. The link between hypertension and immune response was shown previously by our group specifically in patients developing albuminuria under the renin-angiotensin system inhibition.<sup>14,28</sup> Here, we show its activation in RH.

Pathological release of Hb in the blood stream triggers proinflammatory and oxidative injury. Several studies demonstrated a positive correlation between Hb levels and hypertension and even between Hb and BP rise in healthy individuals, both men and women.<sup>29,30</sup> HP is a circulating glycoprotein and the primary Hb scavenger by irreversible binding, thus eliminating free Hb and neutralizing the oxidative damage.<sup>31,32</sup> Hypertensive and oxidative effects induced by free Hb were reduced by HP administration or endogenous synthesis stimulation.<sup>33</sup> As acute phase protein, plasma HP was higher in coronary artery disease,<sup>34</sup> and it was also found increased in plasma from hypertensive patients developing albuminuria by our group.<sup>35</sup> In agreement, urine HP level was shown to predict type 2 diabetic patients at risk of renal function decline before macroalbuminuria development,<sup>27</sup> which was further corroborated while demonstrating the HP-improved predictive performance compared with albuminuria.<sup>36</sup> Here, we demonstrate a predictive capacity for HP and HPR in terms of spironolactone response when administered to patients with RH. Similar to albumin, an increased glomerular permeability would result in the observed higher levels of HP in urine from patients who do not respond to spironolactone. In this sense, both HP and HPR positively

**Table 2. Protein Variation Rates Found for HP and HPR in the Discovery and Confirmation Stages**

|   | RHr   | RHnr  | $\Delta Zq$ Value | P Value |
|---|-------|-------|-------------------|---------|
| <b>Discovery</b>                            |       |       |                   |         |
| Zq individual average                       |       |       |                   |         |
| HP  | -2.59 | 3.39  | 5.98              | 0.00279 |
| HPR   | -3.65 | 4.17  | 7.83              | 0.00009 |
| <b>Quantitation</b>                         |       |       |                   |         |
| Concentration ( $\mu\text{g/g}$ creatinine) |       |       |                   |         |
| HP  | 163.6 | 430.4 |                   | 0.0046  |
| HPR   | 8.51  | 34.47 |                   | 0.0051  |

By TMT-LC-MS/MS, protein abundance was expressed in terms of Zq mean values. By ELISA, concentration values were calculated referred to creatinine. Zq values: log2-ratios expressed as standardized variables. HP indicates haptoglobin; HPR, haptoglobin-related protein; RHnr, resistant hypertension, nonresponders to spironolactone; and RHr, resistant hypertension, responders to spironolactone.

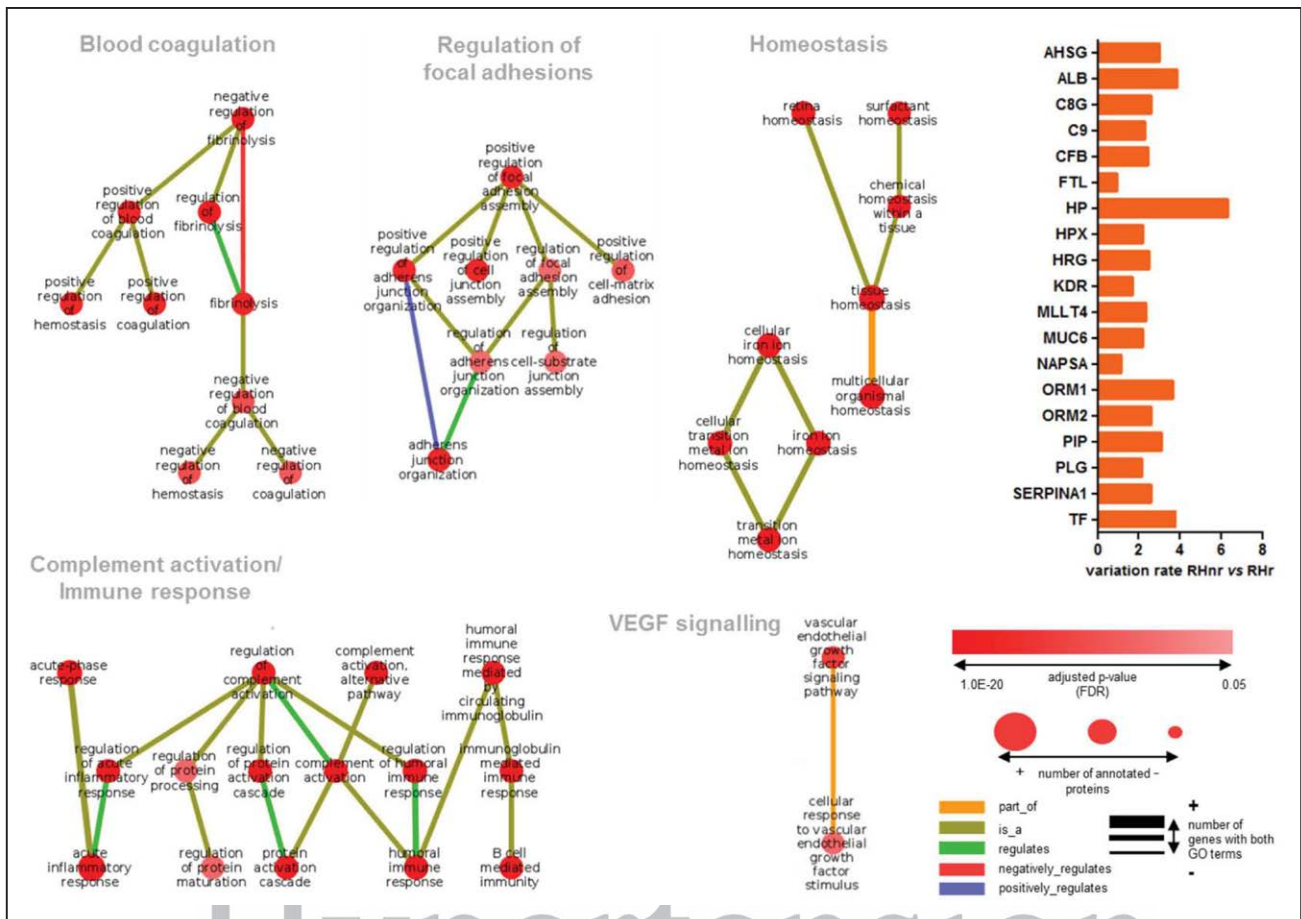


**Figure 2.** Coordinated responses of proteins upregulated in resistant hypertension (RH) patients, responders (RHr) to spironolactone. Functional enrichment analysis was performed considering altered proteins in comparison with the rest of the genome. Overrepresented Gene Ontology (GO) terms in RHr are shown, together with individual protein variation rate when compared RHr vs nonresponders (RHnr). Terms are grouped according to their ontological relationships. Nonconnected GO terms do not have a direct link in GO database. FDR indicates false discovery rate. ANXA1 indicates annexin A1; CAT, catalase; HBA1, hemoglobin subunit alpha; HBB, beta-globin; MPO, myeloperoxidase; PGD, 6-phosphogluconate dehydrogenase; PLA2G2A, phospholipase A2; PRDX2, peroxiredoxin-2; S100A12, protein S100-A12; TALDO1, transaldolase; TP53I3, quinone oxidoreductase PIG3; and TXN, thioredoxin.

correlate with the albumin to creatinine ratio. The fact that HP and HPR correlate with albuminuria indicates that an early damage in renal function, namely increased permeability of glomerular barrier, is present in those who do not respond to spironolactone. This indicates that this form of early renal damage is related to the poor response of BP to spironolactone in RH. More advanced degrees of renal damage have been shown to prevent the response to antihypertensive therapy in RH.<sup>37</sup> On the contrary, some authors point to increased expression of HP in the kidney as a protective mechanism against oxidative injury. In the same way, HPR is hypothesized to protect the circulatory system from oxidative properties of Hb by the binding of HPR-Hb with ApoA-I.<sup>26</sup> In RH, vascular dysfunction is even more aggravated than in controlled hypertension with impaired endothelial homeostasis and vascular stiffness. Increased HP and HPR levels found in basal urine of future RHnr may also reflect an increased renal expression in an attempt to compensate negative effects of RH at vascular level.

Functional enrichment analysis revealed regulation of blood coagulation and focal adhesion assembly, tissue homeostasis, complement activation, immune response, homeostasis,

and VEGF signaling as biological responses overrepresented in RHnr upregulated signature. These physiological mechanisms, and specific proteins as ANXA1, MPO, S100A8, S100A9, PRDX2, TXN, PLG, SERPINA1, and TF, have been previously identified by our group in hypertensive patients developing albuminuria, despite being chronically renin-angiotensin system suppressed, thus confirming their activation in situations aggravating cardiorenal prognosis, as RHnr patients and albuminuric patients without RH.<sup>13,14,28,38,39</sup> These findings are in alignment with the frequent development of chronic kidney disease in RH.<sup>1</sup> Our data indicate that in RH, these processes are activated since the initial stages of cardiovascular and renal complications. Hypertensives with mildly decreased creatinine clearance have been described to have an activated coagulation system<sup>40</sup>; hypertensive emergencies have been associated with high levels of inflammatory, endothelial activation or coagulation,<sup>41</sup> and we have previously described and impairment in focal adhesions at early stages of atherosclerosis.<sup>42</sup> VEGF-signaling pathway is also significantly involved probably activated as a compensatory mechanism to facilitate vasodilation. In RHr to spironolactone (RHr), cellular response to oxidative stress was found significantly upregulated, in alignment with



**Figure 3.** Coordinated responses of proteins upregulated in resistant hypertension (RH) patients, nonresponders (RHnr) to spironolactone. Functional enrichment analysis was performed considering altered proteins in comparison with the rest of the genome. Overrepresented Gene ontology (GO) terms in RHnr are shown, together with individual protein variation rate when compared responders (RHr) vs RHnr. Terms are grouped according to their ontological relationships. Nonconnected GO terms do not have a direct link in GO database. AHSG indicates alpha-2-HS-glycoprotein; ALB, albumin; C9, complement component C9; C8G, complement component C8 gamma chain; CFB, complement factor B; FDR, false discovery rate; FTL, ferritin light chain; HP, haptoglobin; HPX, hemopexin; HRG, histidine-rich glycoprotein; KDR, vascular endothelial growth factor receptor 2; MLLT4, afadin; MUC6, mucin 6; NAPSA, napsin-A; ORM1, alpha-1-acid glycoprotein 1; PIP, prolactin-inducible protein; PLG, plasminogen; SERPINA1, alpha-1-antitrypsin; TF, transferrin; and VEGF, vascular endothelial growth factor.

NADP mediation in antioxidation and reactive oxygen species generation<sup>43</sup> and positive regulation of NF-kB (nuclear factor kappa B). Confirming our previous data showing deregulation of citric acid cycle in RH,<sup>12</sup> glucose catabolism was also found altered at the proteome level.

In conclusion, this is the first study to identify protein changes reflected in urine subjacent to RH. Proteomics provided an unbiased approach to identify most significant protein changes, which can be quantified in urine as a reflection of RH pathophysiology at the same time that coordinated behavior of altered proteins can be evaluated. Protein variations identified in a first discovery stage were confirmed by different technical approaches. One limitation of the study could be the open-label administration of spironolactone and lack of placebo or a comparator agent. However, it was not our purpose to compare the spironolactone efficiency with other drugs. We aimed to identify potential protein predictors in urine collected before spironolactone treatment in the same patients' cohort who showed metabolic alterations with such predictive capacity.<sup>12</sup> It cannot be ruled out the possibility that HP and HPR could also predict BP response to antihypertensive drugs other than

spironolactone. This study was not designed as a randomized controlled trial but represents daily clinical practice in RH according to the most recent guidelines.<sup>44</sup> This is a pilot study, and the main limitation could be the relatively low number of patients from a clinical point of view (and unbalance between groups). However, the study fulfills the requirements of an Omics study in terms of group size and technical workflow,<sup>45</sup> and the strength of the data found in this trial enhances the possibility that the required larger multicenter cohorts to further confirm their potential use in RH management could simply confirm them.

### Perspectives

This is the first study to identify protein signatures in urine subjacent to RH and able to predict response to spironolactone. The urinary proteome was explored, and individual proteins were quantified by mass spectrometry—a technique that can be easily implemented in daily routine clinical practice. Among the 3310 proteins identified, HP and HPR were the 2 showing the most dramatic change in basal urine from RHr compared with RHnr, showing capacity to anticipate

spironolactone effect. These findings are of great importance in the control of patients with RH and open a new field of research in RH management.

### Acknowledgments

We thank Lucía Guerrero and M<sup>a</sup> Cruz Casal from Hospital 12 de Octubre.

### Sources of Funding

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III cosupported by FEDER grants (Fondo Europeo de Desarrollo Regional; PI14/01650, PI14/01917, PI14/01841, PI16/01334, IF08/3667-1, FI12/00126, CPII5/00027, CP15/00129, CP16/00116, PT13/0001/0013, PRB3 [IPT17/0019 ISCIIS-GEFI/ERDF], and REDinREN [Red de Investigación Renal; RD12/0021/0001 and RD16/0009]), Fundación SENEPRO, and Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz. These results are lined up with the Spanish initiative on the Human Proteome Project.

### Disclosures

L.M. Ruilope has served as an advisor/speaker for Astra-Zeneca, Bayer, Daichi-Sankyo, Medtronic, Novartis, Pfizer, Relypsa, Sanofi, and Takeda. The other authors report no conflicts.

### References

- Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, Ferdinand K, Giles TD, Falkner B, Carey RM. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment. A scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*. 2008;51:1403–1419. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.189141
- Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APha/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2018;71:e13–e115. doi: 10.1161/HYP.0000000000000065
- Chapman N, Dobson J, Wilson S, Dahlöf B, Sever PS, Wedel H, Poulter NR; Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial Investigators. Effect of spironolactone on blood pressure in subjects with resistant hypertension. *Hypertension*. 2007;49:839–845. doi: 10.1161/01.HYP.0000259805.18468.8c
- Václavík J, Sedlák R, Plachy M, Navrátil K, Plásek J, Jarkovsky J, Václavík T, Husár R, Kociánová E, Táborský M. Addition of spironolactone in patients with resistant arterial hypertension (ASPIRANT): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hypertension*. 2011;57:1069–1075. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.169961
- Václavík J, Sedlák R, Jarkovský J, Kociánová E, Táborský M. Effect of spironolactone in resistant arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial (ASPIRANT-EXT). *Medicine (Baltimore)*. 2014;93:e162. doi: 10.1097/MD.0000000000000162
- Williams B, MacDonald TM, Morant S, Webb DJ, Sever P, McInnes G, Ford I, Cruickshank JK, Caulfield MJ, Salisbury J, Mackenzie I, Padmanabhan S, Brown MJ; British Hypertension Society's PATHWAY Studies Group. Spironolactone versus placebo, bisoprolol, and doxazosin to determine the optimal treatment for drug-resistant hypertension (PATHWAY-2): a randomised, double-blind, crossover trial. *Lancet*. 2015;386:2059–2068. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00257-3
- Krieger EM, Drager LF, Giorgi DMA, et al; ReHOT Investigators. Spironolactone versus clonidine as a fourth-drug therapy for resistant hypertension: the ReHOT Randomized Study (Resistant Hypertension Optimal Treatment). *Hypertension*. 2018;71:681–690. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10662
- Oliveras A, Armario P, Sans L, Clarà A, Vázquez S, Molina L, Pareja J, de la Sierra A, Pascual J. Organ damage changes in patients with resistant hypertension randomized to renal denervation or spironolactone: the DENERVHTA (Denervación en Hipertensión Arterial) study. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2018;20:69–75. doi: 10.1111/jch.13156
- Morganti A, Mancia G. Resistant hypertension: renal denervation or intensified medical treatment? *Eur J Intern Med*. 2018;50:6–11. doi: 10.1016/j.ejim.2017.12.010
- Pimenta E, Gaddam KK, Oparil S, Aban I, Husain S, Dell'Italia LJ, Calhoun DA. Effects of dietary sodium reduction on blood pressure in subjects with resistant hypertension: results from a randomized trial. *Hypertension*. 2009;54:475–481. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.131235
- Williams B, MacDonald TM, Morant SV, Webb DJ, Sever P, McInnes GT, Ford I, Cruickshank JK, Caulfield MJ, Padmanabhan S, Mackenzie IS, Salisbury J, Brown MJ; British Hypertension Society Programme of Prevention and Treatment of Hypertension With Algorithm Based Therapy (PATHWAY) Study Group. Endocrine and haemodynamic changes in resistant hypertension, and blood pressure responses to spironolactone or amiloride: the PATHWAY-2 mechanisms substudies. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6:464–475. doi: 10.1016/S2213-8587(18)30071-8
- Martin-Lorenzo M, Martinez PJ, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Prado JC, Segura J, de la Cuesta F, Barderas MG, Vivanco F, Ruilope LM, Alvarez-Llamas G. Citric acid metabolism in resistant hypertension: underlying mechanisms and metabolic prediction of treatment response. *Hypertension*. 2017;70:1049–1056. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09819
- Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, de la Cuesta F, Maroto AS, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Pulido-Olmo H, Segura J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Urinary alpha-1 antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:8. doi: 10.1186/s12933-016-0331-7
- Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, Martinez PJ, Baldan-Martin M, Lopez JA, Ruiz-Hurtado G, de la Cuesta F, Segura J, Vazquez J, Vivanco F, Barderas MG, Ruilope LM, Alvarez-Llamas G. Immune system deregulation in hypertensive patients chronically RAS suppressed developing albuminuria. *Sci Rep*. 2017;7:8894. doi: 10.1038/s41598-017-09042-2
- Martin-Lorenzo M, Zubiri I, Maroto AS, Gonzalez-Calero L, Posada-Ayala M, de la Cuesta F, Mourino-Alvarez L, Lopez-Almodovar LF, Calvo-Bonacho E, Ruilope LM, Padial LR, Barderas MG, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. KLK1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery. *Metabolomics*. 2015;11:1056–1067. doi: 10.1007/s11306-014-0761-8
- Cardona M, López JA, Serafín A, Rongvaux A, Inserte J, García-Dorado D, Flavell R, Llovera M, Cañas X, Vázquez J, Sanchis D. Executioner caspase-3 and 7 deficiency reduces myocyte number in the developing mouse heart. *PLoS One*. 2015;10:e0131411. doi: 10.1371/journal.pone.0131411
- Navarro P, Vázquez J. A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases. *J Proteome Res*. 2009;8:1792–1796. doi: 10.1021/pr800362h
- Bonzon-Kulichenko E, Garcia-Marques F, Trevisan-Herraz M, Vázquez J. Revisiting peptide identification by high-accuracy mass spectrometry: problems associated with the use of narrow mass precursor windows. *J Proteome Res*. 2015;14:700–710. doi: 10.1021/pr5007284
- Navarro P, Trevisan-Herraz M, Bonzon-Kulichenko E, et al. General statistical framework for quantitative proteomics by stable isotope labeling. *J Proteome Res*. 2014;13:1234–1247. doi: 10.1021/pr4006958
- Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W251–W257. doi: 10.1093/nar/gkv380
- Xia J, Wishart DS. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016;55:14.10.1–14.10.91. doi: 10.1002/cpbi.11
- Al-Shahrour F, Minguez P, Tárraga J, Medina I, Alloza E, Montaner D, Dopazo J. FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W91–W96. doi: 10.1093/nar/gkm260
- Alonso R, Salavert F, Garcia-Garcia F, et al. Babelomics 5.0: functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W117–W121. doi: 10.1093/nar/gkv384
- Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*. 2011;27:431–432. doi: 10.1093/bioinformatics/btq675
- Imrie HJ, Fowkes FJ, Migot-Nabias F, Luty AJ, Deloron P, Hajduk SL, Day KP. Individual variation in levels of haptoglobin-related protein in children from Gabon. *PLoS One*. 2012;7:e49816. doi: 10.1371/journal.pone.0049816
- Nielsen MJ, Petersen SV, Jacobsen C, Oxvig C, Rees D, Møller HJ, Moestrup SK. Haptoglobin-related protein is a high-affinity hemoglobin-binding plasma protein. *Blood*. 2006;108:2846–2849. doi: 10.1182/blood-2006-05-022327

27. Bhensdadia NM, Hunt KJ, Lopes-Virella MF, Michael Tucker J, Mataria MR, Alge JL, Neely BA, Janech MG, Arthur JM; Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT) Study Group. Urine haptoglobin levels predict early renal functional decline in patients with type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2013;83:1136–1143. doi: 10.1038/ki.2013.57
28. Baldan-Martin M, Mourino-Alvarez L, Gonzalez-Calero L, Moreno-Luna R, Sastre-Oliva T, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Lopez JA, Vazquez J, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Ruilope LM, de la Cuesta F, Barderas MG. Plasma molecular signatures in hypertensive patients with renin-angiotensin system suppression: new predictors of renal damage and de novo albuminuria indicators. *Hypertension.* 2016;68:157–166. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07412
29. Atsma F, Veldhuizen I, de Kort W, van Kraaij M, Pasker-de Jong P, Deinum J. Hemoglobin level is positively associated with blood pressure in a large cohort of healthy individuals. *Hypertension.* 2012;60:936–941. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.193565
30. Lee SG, Rim JH, Kim JH. Association of hemoglobin levels with blood pressure and hypertension in a large population-based study: the Korea National Health and Nutrition Examination Surveys 2008–2011. *Clin Chim Acta.* 2015;438:12–18. doi: 10.1016/j.cca.2014.07.041
31. MacKellar M, Vigerust DJ. Role of haptoglobin in health and disease: a focus on diabetes. *Clin Diabetes.* 2016;34:148–157. doi: 10.2337/diaclin.34.3.148
32. Levy AP, Asleh R, Blum S, et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12:293–304. doi: 10.1089/ars.2009.2793
33. Boretto FS, Buehler PW, D'Agnillo F, Kluge K, Glaus T, Butt OI, Jia Y, Goede J, Pereira CP, Maggiorini M, Schoedon G, Alayash AI, Schaer DJ. Sequestration of extracellular hemoglobin within a haptoglobin complex decreases its hypertensive and oxidative effects in dogs and guinea pigs. *J Clin Invest.* 2009;119:2271–2280. doi: 10.1172/JCI39115
34. Lee CW, Lee CW, Cheng TM, Lin CP, Pan JP. Plasma haptoglobin concentrations are elevated in patients with coronary artery disease. *PLoS One.* 2013;8:e76817. doi: 10.1371/journal.pone.0076817
35. Baldan-Martin M, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Ruiz-Hurtado G, Moreno-Luna R, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Segura J, Padial LR, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG. Prediction of development and maintenance of high albuminuria during chronic renin-angiotensin suppression by plasma proteomics. *Int J Cardiol.* 2015;196:170–177. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.05.148
36. Liu JJ, Liu S, Wong MD, Gurung RL, Lim SC. Urinary haptoglobin predicts rapid renal function decline in Asians with type 2 diabetes and early kidney disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101:3794–3802. doi: 10.1210/jc.2016-2094
37. Ruilope LM. Current challenges in the clinical management of hypertension. *Nat Rev Cardiol.* 2011;9:267–275. doi: 10.1038/nrcardio.2011.157
38. Baldan-Martin M, Rodríguez-Sánchez E, González-Calero L, Ruilope LM, Alvarez-Llamas G, Barderas MG, Ruiz-Hurtado G. Translational science in albuminuria: a new view of de novo albuminuria under chronic RAS suppression. *Clin Sci (Lond).* 2018;132:739–758. doi: 10.1042/CS20180097
39. Gonzalez-Calero L, Martínez PJ, Martin-Lorenzo M, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, de la Cuesta F, Calvo E, Segura J, Lopez JA, Vázquez J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Urinary exosomes reveal protein signatures in hypertensive patients with albuminuria. *Oncotarget.* 2017;8:44217–44231. doi: 10.18632/oncotarget.17787
40. Catena C, Zingaro L, Casaccio D, Sechi LA. Abnormalities of coagulation in hypertensive patients with reduced creatinine clearance. *Am J Med.* 2000;109:556–561.
41. Derhaschnig U, Testori C, Riedmueller E, Aschauer S, Wolzt M, Jilma B. Hypertensive emergencies are associated with elevated markers of inflammation, coagulation, platelet activation and fibrinolysis. *J Hum Hypertens.* 2013;27:368–373. doi: 10.1038/jhh.2012.53
42. Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, Maroto AS, Martinez PJ, Zubiri I, de la Cuesta F, Mourino-Alvarez L, Barderas MG, Heredero A, Aldamiz-Echevarría G, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Cytoskeleton deregulation and impairment in amino acids and energy metabolism in early atherosclerosis at aortic tissue with reflection in plasma. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862:725–732. doi: 10.1016/j.bbdis.2015.12.006
43. Ying W. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:179–206. doi: 10.1089/ars.2007.1672
44. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2018;39:3021–3104. doi: 10.1093/eurheartj/ehy339
45. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol.* 2006;24:971–983. doi: 10.1038/nbt1235

## Novelty and Significance

### What Is New?

- Physiopathological alterations subjacent to resistant hypertension (RH) at the protein level and involved biological processes are shown here for the first time.
- HP (haptoglobin) and HPR (haptoglobin-related protein) are able to predict patients' response to spironolactone when measured in urine collected before drug administration.
- Immune system and oxidative stress response arise as key players in RH.

### What Is Relevant?

- This study was conducted in patients with RH, in urine collected before spironolactone treatment.
- The identification of protein markers able to predict response to spironolactone will contribute to optimize RH patients' management and avoid unnecessary side effects in nonresponders.

- An alternative technical approach to ELISA assay is here proposed for HP and HPR analysis in urine, allowing the analysis of larger cohorts in shorter periods of time.

### Summary

RH physiopathology has reflection in urine at the proteome level. Analyzed in urine collected before spironolactone administration, HP and HPR proteins showed increased levels in nonresponders compared with responders, thus demonstrating their predictive capacity. Immune system and oxidative stress response confirm their activation in situations aggravating cardiorenal prognosis, as they are RH and albuminuria development in nonresistant hypertensives.

# Citric Acid Metabolism in Resistant Hypertension

## Underlying Mechanisms and Metabolic Prediction of Treatment Response

Marta Martin-Lorenzo, Paula J. Martinez, Montserrat Baldan-Martin, Gema Ruiz-Hurtado, Jose Carlos Prado, Julian Segura, Fernando de la Cuesta, Maria G. Barderas, Fernando Vivanco, Luis Miguel Ruilope, Gloria Alvarez-Llamas

**Abstract**—Resistant hypertension (RH) affects 9% to 12% of hypertensive adults. Prolonged exposure to suboptimal blood pressure control results in end-organ damage and cardiovascular risk. Spironolactone is the most effective drug for treatment, but not all patients respond and side effects are not negligible. Little is known on the mechanisms responsible for RH. We aimed to identify metabolic alterations in urine. In addition, a potential capacity of metabolites to predict response to spironolactone was investigated. Urine was collected from 29 patients with RH and from a group of 13 subjects with pseudo-RH. For patients, samples were collected before and after spironolactone administration and were classified in responders (n=19) and nonresponders (n=10). Nuclear magnetic resonance was applied to identify altered metabolites and pathways. Metabolites were confirmed by liquid chromatography-mass spectrometry. Citric acid cycle was the pathway most significantly altered ( $P<0.0001$ ). Metabolic concentrations were quantified and ranged from ng/mL malate to  $\mu\text{g/mL}$  citrate. Citrate and oxaloacetate increased in RH versus pseudoresistant. Together with  $\alpha$ -ketoglutarate and malate, they were able to discriminate between responders and nonresponders, being the 4 metabolites increased in nonresponders. Combined as a prediction panel, they showed receiver operating characteristic curve with area under the curve of 0.96. We show that citric acid cycle and deregulation of reactive oxygen species homeostasis control continue its activation after hypertension was developed. A metabolic panel showing alteration before spironolactone treatment and predicting future response of patients is shown. These molecular indicators will contribute optimizing the rate of control of RH patients with spironolactone. (*Hypertension*. 2017;70:00-00. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09819.)

### • Online Data Supplement

**Key Words:** blood pressure ■ citric acid cycle ■ metabolomics ■ reactive oxygen species ■ spironolactone

Resistant hypertension (RH) is defined as blood pressure (BP) above target despite the concurrent use of 3 anti-hypertensive drugs of different classes prescribed at optimal doses.<sup>1</sup> RH is a common clinical problem of multifactorial pathogenesis. The prevalence of RH is estimated to be in the range 9% to 12% in the population of adult patients with hypertension, and it is progressively increasing.<sup>2</sup> Because of prolonged exposure to suboptimal BP control, RH is associated with end-organ damage and increased cardiovascular risk. These data highlight the importance of RH and the need for an appropriate management. Nevertheless, little is known on the mechanisms responsible for RH and subjacent physiopathology.<sup>3</sup> Spironolactone, a mineralocorticoid antagonist, has demonstrated to be useful in the BP control in patients with RH<sup>4,5</sup> being the most effective drug for the treatment of RH.<sup>6</sup> However, not all patients with RH respond to spironolactone, and negative effects should be taken into account (eg,

a higher risk for hyperkalemia and associated complications). The identification of molecular indicators able to predict (anticipate) the response of a patient with RH to spironolactone treatment will contribute to optimize the rate of control of these patients.

As far as we know, no molecular data are available on RH. The metabolome is made up of the low molecular weight end products of the metabolism, representing the ultimate response of the body to a certain condition (eg, disease). Urine is a rich biofluid to investigate molecular alterations associated with renal physiology and kidney diseases. The metabolome was previously investigated in cardiovascular<sup>7-9</sup> and kidney diseases<sup>10-13</sup> by our and other groups. However, few studies have been performed in the context of hypertension.<sup>14-16</sup> In this sense, we previously demonstrated that albuminuria development in hypertensives under chronic suppression of renin-angiotensin system is reflected in a metabolic profile in

Received June 6, 2017; first decision June 17, 2017; revision accepted August 9, 2017.

From the Department of Immunology, IIS-Fundacion Jimenez Diaz, REDinREN, Madrid, Spain (M.M.-L., P.J.M., F.V., G.A.-L.); Department of Vascular Physiopathology, Hospital Nacional de Paraplejicos SESCAM, Toledo, Spain (M.B.-M., M.G.B.); Hypertension Unit, Instituto de Investigación imas12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain (G.R.-H., J.C.P., J.S., L.M.R.); Centre for Cardiovascular Science, Queen's Medical Research Institute, University of Edinburgh, United Kingdom (F.d.l.C.); Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Universidad Complutense, Madrid, Spain (F.V.); and Universidad Europea, Madrid, Spain (L.M.R.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://hyper.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09819/-DC1>.

Correspondence to Gloria Alvarez-Llamas, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Avenida Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. E-mail galvarez@fjd.es  
© 2017 American Heart Association, Inc.

*Hypertension* is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09819

urine.<sup>17</sup> In this study, we investigate metabolic alterations adjacent to RH and the potential capacity of specific metabolites to predict response to spironolactone.

## Methods

### Patient Selection

We enrolled 42 patients arriving at the Hypertension Unit Hospital 12 de Octubre (recruitment period between July 2014 and March 2016). They were classified as RH if they fulfilled the following entry criteria: age  $\geq 18$  years and BP levels with mean values on a 24-hour ambulatory blood pressure monitoring (ABPM)  $>130/80$  mmHg while receiving  $\geq 3$  drugs at adequate doses ( $n=29$ ). Patients with secondary hypertension were excluded. A 24-hour ABPM was performed at baseline to confirm that patients had true RH. Those patients with BP office levels  $>140/90$  mmHg (office) but 24-hour ABPM  $<130/80$  mmHg did not have true RH, and they are pseudo-resistant hypertensive patients who were included as control group (hypertension;  $n=13$ ). Controlled hypertension means hypertension normalized with treatment which is the case in pseudo-resistant hypertensives. A prospective study was also conducted, intended to predict response to spironolactone. Patients with RH were treated with spironolactone 25/50 mg/d, added on top of former antihypertensive treatment. Response to spironolactone was defined to be effective if 24-hour ambulatory systolic BP dropped  $\geq 20$  mmHg (responders [RHr],  $n=19$ ). Metabolic alterations once spironolactone was administered were also evaluated, both in RHr and in nonresponders (RHnr,  $n=10$ ). It is important to note that when patients are classified in RHr and RHnr, we refer to BP control and not to modulation of particular metabolites alterations. In every visit, a general questionnaire of wellbeing and potential side effects was usually made, and in no patient, it forced the interruption of the spironolactone administration nor even the decrease in the dose. Patients presenting alterations during the follow-up were not included in the study. In Table 1, clinical characteristics of patients are shown. The study was conducted according to the recommendations of the Declaration of Helsinki, and it was approved by the local ethic committee, and all subjects gave informed consent.

### BP Measurements

BP was measured at the office with a validated semiautomatic oscillometric device after 5-minute rest in a sitting position. BP values were estimated as the mean of 3 readings. Thereafter, 24-hour ABPM was performed using PaceLabs 90207 (SpaceLabs Inc., Redmond, WA) automated noninvasive oscillometric device, programmed to register BP at 20-minute intervals for the daytime period and at 30-minute intervals for the night-time period. The majority of measurements were performed on working days, and the patients were instructed to maintain their usual activities, return the following morning for device removal, and keep the arm extended and immobile at the time of each cuff inflation. Daytime and night-time periods were defined individually according to the patient self-reported data of going-to-bed and getting-up times.

### Metabolic Alterations in RH: NMR Analysis of Urine Samples

First morning urine was collected, centrifuged, and supernatants were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processing. Metabolite analysis by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance (NMR) was performed as previously described.<sup>8,11,17</sup> Briefly, thawed samples were diluted (1:1) in 200 mmol/L sodium phosphate buffer in  $\text{D}_2\text{O}$  containing 0.01 mmol/L sodium trimethylsilyl propionate for chemical shift referencing. NMR experiments were performed at 277 K on a Bruker 700 MHz AVANCE III instrument equipped with a  $z$  axis gradient 5 mm triple resonance cryoprobe. Then, spectra were processed using TOPSPIN (version 1.3, Bruker Biospin Ltd) and analyzed using AMIX software (version 3.6.8, Bruker Rheinstetten, Germany). For this analysis, each spectrum was partitioned in variable sized spectral regions (buckets) according to a custom pattern developed

specifically for the whole data set. Distribution of every bucket variable over the ensemble of spectra was evaluated by AMIX software for identification of discriminating variables (90% confidence level).

Those discriminating buckets resulting from both comparisons (controlled hypertension versus RH and RHr versus RHnr) were further considered together with their intensity in the NMR spectrum, and corresponding metabolites were assigned using Metabohunter web server.<sup>18</sup> Those metabolites altered in RH were submitted to an enrichment analysis looking for main pathways altered in RH by means of Metaboanalyst 3.0 tool.<sup>19,20</sup> Pathways from the KEGG database showing  $P < 0.05$  and false discovery rate  $< 0.05$  were selected as significantly altered in the pathology.

### Evaluation of Citric Acid Cycle in RH: Targeted Analysis by Mass Spectrometry

Individual metabolites taking part of the pathway found most significantly altered were measured in urine from patients (controlled hypertension and RH) for precise quantification by liquid chromatography coupled to mass spectrometry in selected reaction monitoring mode-LC-MS/MS. A 6460 Triple Quadrupole LC-MS/MS (1200 Series, Agilent Technologies) controlled by Mass Hunter Software (v4.0 Agilent Technologies) was used as previously published.<sup>8,17</sup> Briefly, urine proteins were removed by organic precipitation, and separation took place at 0.4 mL/min in an acetonitrile gradient for 5 minutes in negative mode. Optimal conditions of analysis were established by analyzing commercial metabolite standards (Table S1 in the [online-only Data Supplement](#)). Quantitative determination of metabolites concentration was performed by individual calibration curves using commercial standards. The concentration range for each metabolite was established according to Human Metabolome Database values in urine, according to previous published data<sup>21</sup> and our experimental data in the specific samples included in the study. All curves were fit to linear regression mode, and the individual values of each urine sample (each sample measured in triplicate) were then interpolated using GraphPad software. Normalization was performed by creatinine value of each urine sample, and metabolite concentration was expressed in ( $\mu\text{mol/L}$ )/( $\text{mmol/L}$ ) creatinine.

### Prediction of Response to Spironolactone and Metabolic Effect After Treatment

Subjacent metabolic changes in RH were investigated by comparing controlled hypertension and RH patients as described above. In addition, a pilot prospective study was performed to evaluate a potential capacity of identified metabolites to predict response to treatment with spironolactone. For that, urine samples were collected before administration of spironolactone and classified according to patient response in RHr and RHnr. Metabolites were analyzed by selected reaction monitoring mode-LC-MS/MS, as described.

Urine samples were also collected after treatment to additionally evaluate the impact of spironolactone on identified metabolites, both in RHr and RHnr, referred as RHr-post and RHnr-post, respectively. Metabolites in these urine samples were analyzed by selected reaction monitoring mode-LC-MS/MS as described.

### Statistical Analysis

To identify significant differences in clinical characteristics or medication, patients groups were compared by nonparametric Mann-Whitney test with 95% confidence level. To calculate statistically significant differences in metabolite concentrations between groups (targeted analysis), we first applied the ROUT method (robust regression and outlier removal) to detect outliers based on the false discovery rate, setting the Q value to 5%. A nonparametric Mann-Whitney test with 95% confidence level was then performed by means of GraphPad Prism 6 (version 6.01) software. For those metabolites showing alteration between RHr and RHnr, a combined receiver operating characteristic (ROC) curve was performed to evaluate their predictor potential. The multivariate ROC curve was performed using Random Forest as classification and built-in method.

**Table 1. Clinical Characteristics of Patients Included in Both Comparisons, HTN vs RH and RHr vs RHnr**

| Clinical Data                                | HTN and RH |           |         | Spironolactone Treatment |             |        |
|--|------------|-----------|---------|--------------------------|-------------|--------|
|  | HTN (n=13) | RH (n=29) | PValue  | RHr (n=19)               | RHnr (n=10) | PValue |
| <b>Characteristics</b>                       |            |           |         |                          |             |        |
| Age, y                                       | 64±11      | 64±12     | 0.946   | 61±12                    | 68±11       | 0.161  |
| Gender, % male                               | 62         | 55        | 0.715   | 58                       | 50          | 0.709  |
| Current smoking, %                           | 15         | 17        | 0.899   | 21                       | 10          | 0.483  |
| Diabetes mellitus, %                         | 62         | 41        | 0.238   | 37                       | 50          | 0.519  |
| Previous CVD, %                              | 15         | 10        | 0.662   | 11                       | 10          | 1.000  |
| Duration of hypertension, y                  | 20±13      | 16±22     | 0.935   | 14±25                    | 22±13       | 0.597  |
| <b>SBP, mm Hg</b>                            |            |           |         |                          |             |        |
| Office                                       | 146.6±16   | 161.4±16  | 0.002   | 157.1±10                 | 169.8±21    | 0.063  |
| 24 h   | 123.5±5    | 145.1±8   | <0.0001 | 143.7±9                  | 147.7±7     | 0.251  |
| Daytime                                      | 124.6±5    | 148.3±9   | <0.0001 | 146.9±9                  | 151±8       | 0.251  |
| Night-time                                   | 120.8±7    | 135.8±11  | 0.0001  | 134.8±12                 | 137.8±10    | 0.370  |
| Central                                      | 113.5±5    | 136.5±14  | <0.0001 | 135.7±11                 | 138±20      | 0.755  |
| <b>DBP, mm Hg</b>                            |            |           |         |                          |             |        |
| Office                                       | 84.62±9    | 90.45±11  | 0.137   | 93.11±10                 | 85.4±11     | 0.056  |
| 24 h   | 74.38±6    | 85.86±10  | 0.001   | 88.68±8                  | 80.5±10     | 0.035  |
| Daytime                                      | 75.77±6    | 88.31±10  | 0.001   | 91.21±9                  | 82.8±10     | 0.046  |
| Night-time                                   | 70.54±8    | 78.83±11  | 0.043   | 81.42±10                 | 73.9±12     | 0.090  |
| Central                                      | 76.85±7    | 89.14±10  | 0.001   | 91.83±10                 | 84.3±8      | 0.061  |
| ACR, mg/g                                    | 33.60±41   | 13.80±38  | 0.924   | 13.27±28                 | 27.06±322   | 0.176  |
| Creatinine clearance rate, mg/mL             | 78.85±19   | 87.02±23  | 0.334   | 89.54±26                 | 82.23±14    | 0.506  |
| eGFR by MDRD, mL/min per 1.73 m <sup>2</sup> | 115.4±21   | 118.9±21  | 0.614   | 111.5±17                 | 130.6±23    | 0.037  |
| BMI, kg/m <sup>2</sup>                       | 33.83±7    | 30.86±5   | 0.128   | 31.12±5                  | 30.37±4     | 0.598  |
| Total cholesterol, mg/dL                     | 169.9±35   | 186.3±31  | 0.182   | 183.2±30                 | 192.2±34    | 0.598  |
| HDL cholesterol, mg/dL                       | 50.38±13   | 55.71±17  | 0.540   | 53.06±15                 | 60.74±20    | 0.396  |
| LDL cholesterol, mg/dL                       | 92.15±29   | 102.8±27  | 0.259   | 102.2±24                 | 103.9±32    | 0.630  |
| Triglycerides, mg/dL                         | 135.7±53   | 131.2±64  | 0.634   | 127.4±68                 | 138.3±57    | 0.551  |
| <b>Antihypertensive drugs, in total</b>      |            |           |         |                          |             |        |
| ACEi, %                                      | 15         | 28        | 0.407   | 32                       | 20          | 0.534  |
| ARB, %                                       | 92         | 76        | 0.223   | 74                       | 80          | 0.734  |
| Diuretic, %                                  | 100        | 90        | 0.247   | 84                       | 100         | 0.208  |
| Calcium channel blocker, %                   | 92         | 86        | 0.594   | 89                       | 80          | 0.514  |
| β-Blocker agent, %                           | 62         | 59        | 0.873   | 53                       | 70          | 0.390  |
| α-Blocker agent, %                           | 38         | 21        | 0.238   | 21                       | 20          | 0.974  |
| Spironolactone, %                            | 0          | 100       | <0.0001 | 100                      | 100         | 1      |
| <b>Concomitant therapies</b>                 |            |           |         |                          |             |        |
| Anticoagulant, %                             | 0          | 7         | 0.357   | 11                       | 0           | 0.321  |
| Statins, %                                   | 77         | 55        | 0.190   | 42                       | 80          | 0.059  |
| Insulin, %                                   | 15         | 3         | 0.180   | 5                        | 0           | 0.514  |
| Oral antidiabetic, %                         | 54         | 28        | 0.108   | 21                       | 40          | 0.300  |

Values are expressed as percentage (%) or mean±SD (except for ACR expressed as median±interquartile range). ACEi indicates angiotensin-converting enzyme inhibitor; ACR, albumin/creatinine; ARB, angiotensin receptor blocker; BMI, body mass index; CVD, cardiovascular disease; DBP, diastolic blood pressure; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HDL, high-density lipoprotein; HTN, pseudo-resistant hypertensive patients who were included as control group; LDL, low-density lipoprotein; MDRD, Modification of Diet in Renal Disease; RH, resistant hypertension; RHr, resistant hypertension patients responders to spironolactone treatment; RHnr, resistant hypertension patients nonresponders to spironolactone treatment; and SBP, systolic blood pressure.

## Results

### Coordinated Metabolic Response in RH: Citric Acid Cycle Changes

The statistical analysis performed on the NMR data resulted in a total of 7 chemical shifts consisting in 1.48, 1.99, 2.08, 2.42, 4.52, 4.72, and 7.37 ppm. Three KEGG metabolic pathways resulted significantly altered (see *P* value and false discovery rate limits in Table S2): citric acid cycle (CAC), pyruvate metabolism, and gluconeogenesis. All of them are energy-related processes, and they are interconnected. CAC (KEGG: hsa00020) highlights with a false discovery rate=0.0024 and a *P*<0.0001.

The main metabolites of CAC are acetyl coenzyme A, oxaloacetate, citrate, isocitrate,  $\alpha$ -ketoglutarate, succinyl coenzyme A, succinate, and malate. Because according to Human Metabolome Database there is not data for coenzymes presence in urine, we focused on the rest for further analysis together with pyruvate as precursor of acetyl coenzyme A. Metabolites were quantitatively analyzed, and the equations of the linear fit for each metabolite, the concentration range, and the square of the correlation coefficient values ( $R^2$ ) can be found in Figure S1. As summary, all the curves present a goodness to fit higher than 0.98 and in most cases higher to 0.99 in terms of  $R^2$ . The ranges went from ng/mL in the case of malate, the less concentrated in urine, to  $\mu$ g/mL for citrate, the most concentrated one. The final value of the concentration was corrected by the value of the creatinine in each sample resulting in concentration values in ( $\mu$ mol/L)/(mmol/L) creatinine as it is presented in Table 2.

The concentration levels of the different metabolites quantified in urine were used to evaluate the differences between the clinical groups. Those metabolites corresponding to RH are presented in Figure 1 integrated in the pathway. Citrate and oxaloacetate are increased in patients presenting RH versus those with controlled hypertension, being able to discriminate the 2 groups (citrate, *P*=0.0390; oxaloacetate, *P*=0.0146). These 2 metabolites, together with  $\alpha$ -ketoglutarate and malate, show differences between patients with RH, depending on their future response to spironolactone. They are able to discriminate between RHr and RHnr, being the 4 metabolites increased in RHnr (citrate, *P*=0.0471;  $\alpha$ -ketoglutarate,

*P*=0.0186; malate, *P*=0.0382; and oxaloacetate, *P*=0.0120). The 4 metabolic responses were evaluated as prediction panel, individually and combined. Figure 2A shows how the predictive accuracy increased with the number of metabolites included in the model. The prediction overview shows the predicted class probabilities (*x* axis) of each sample (*y* axis). The probability scores range from 0 to 1. Less than 0.5 will belong to 1 group (RHr) and >0.5 belong to the other group (RHnr). When the 4 metabolites were combined, the predicted class graph shows good separation between RHr and RHnr (Figure 2B). The ROC curve provides complete and easily visualized sensitivity/specificity. In an ROC curve, the true positive rate (sensitivity) is plotted in function of the false-positive rate (1-specificity). The closer the ROC curve is to the upper left corner, the higher the overall accuracy of the test. The area under the ROC curve is a measure of how well the maker panel can distinguish between the 2 groups (RHr/RHnr). In this model, the ROC curve results in area under the curve=0.96 (Figure 2C).

### Metabolite Alterations Under Spironolactone Treatment

When metabolites concentrations were evaluated in the urine of patients before and after spironolactone treatment, citrate, malate, and oxaloacetate were significantly altered as it is shown in Figure 3. Citrate concentration was maintained with the treatment in RHr patients, but their levels are decreased in RHnr patients (*P*=0.0015). In the case of malate, all patients lower their levels after the spironolactone treatment, being this change higher in RHnr (RHr patients *P*=0.0336; RHnr patients *P*<0.0001). For oxaloacetate, we found an effect on RHr patients, with levels increasing after the administration of spironolactone (*P*=0.0116).

## Discussion

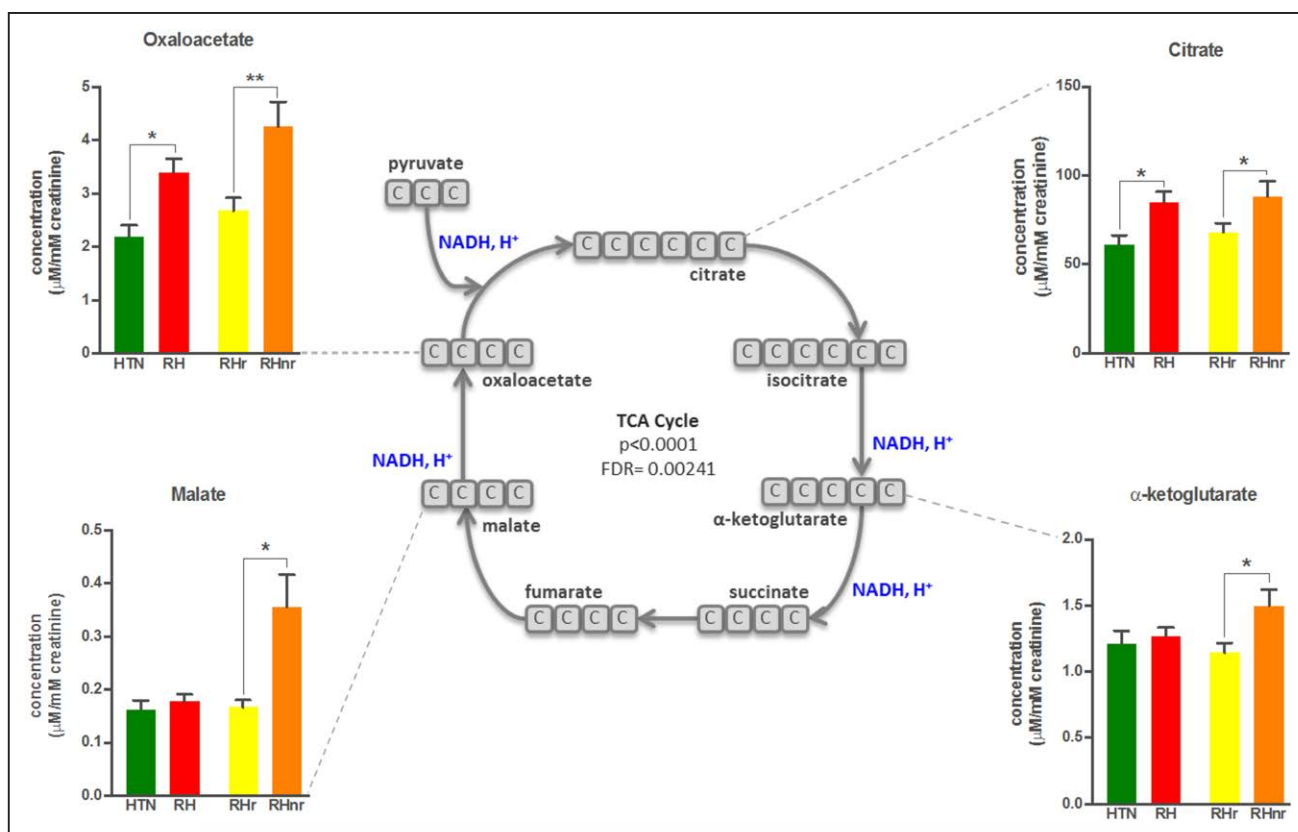
Inadequate control of BP facilitates cardiovascular and renal damage.<sup>22</sup> In patients with RH, BP continues uncontrolled despite therapeutic intervention following recommended guidelines. Prevention of RH depends on adequate treatment which should be applied early in time and aggressively. However, a considerable number of hypertensive patients

**Table 2. Metabolite Concentration Values Expressed as Average $\pm$ SEM**

| Metabolite              | HMDB      | Metabolite Concentration ( $\mu$ mol/L)/[mmol/L] Creatinine) |                      |                      |                      |                       |                        |
|-------------------------|-----------|--|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|
|                         |           | HTN  | RH                   | RHr                  | RHr-Post             | RHnr                  | RHnr-Post              |
| Citrate                 | HMDB00094 | 61.22 $\pm$ 5.312  | 85.06 $\pm$ 5.819*   | 68.06 $\pm$ 5.187    | 66.52 $\pm$ 4.577    | 88.31 $\pm$ 8.529†    | 55.17 $\pm$ 8.008      |
| Fumarate                | HMDB00134 | 5.432 $\pm$ 0.4739   | 4.833 $\pm$ 0.3714   | 4.889 $\pm$ 0.4584   | 5.511 $\pm$ 0.6232   | 4.697 $\pm$ 0.6335    | 6.122 $\pm$ 1.087      |
| Malate                  | HMDB00744 | 0.1618 $\pm$ 0.01807   | 0.178 $\pm$ 0.01312  | 0.1673 $\pm$ 0.01292 | 0.1253 $\pm$ 0.01063 | 0.3557 $\pm$ 0.06104† | 0.08848 $\pm$ 0.008408 |
| Oxaloacetate            | HMDB00223 | 2.195 $\pm$ 0.2144   | 3.398 $\pm$ 0.2594*  | 2.686 $\pm$ 0.2381   | 4.416 $\pm$ 0.4489   | 4.264 $\pm$ 0.4634‡   | 5.012 $\pm$ 0.8307     |
| Pyruvate                | HMDB00243 | 0.2526 $\pm$ 0.01658   | 0.2321 $\pm$ 0.01132 | 0.2258 $\pm$ 0.01249 | 0.2036 $\pm$ 0.01499 | 0.2445 $\pm$ 0.02304  | 0.1911 $\pm$ 0.01891   |
| Succinate               | HMDB00254 | 1.506 $\pm$ 0.1328   | 1.595 $\pm$ 0.1328   | 1.527 $\pm$ 0.1568   | 1.563 $\pm$ 0.1403   | 1.461 $\pm$ 0.1682    | 1.848 $\pm$ 0.2738     |
| $\alpha$ -Ketoglutarate | HMDB62781 | 1.21 $\pm$ 0.1011  | 1.268 $\pm$ 0.06499  | 1.1146 $\pm$ 0.07    | 1.225 $\pm$ 0.08958  | 1.498 $\pm$ 0.1233†   | 1.265 $\pm$ 0.2127     |

HMDB indicates human metabolome database; HTN, controlled hypertension; RH, resistant hypertension; RHr, patients with RH responders to spironolactone (urine collected before treatment); RHr-post, patients with RH responders to spironolactone (urine collected after treatment); RHnr, patients with RH nonresponders to spironolactone (urine collected before treatment); RHnr-post, patients with RH nonresponders to spironolactone (urine collected after treatment).

RH vs HTN: \**P*<0.05; RHr vs RHnr: †*P*<0.05, ‡*P*<0.01.

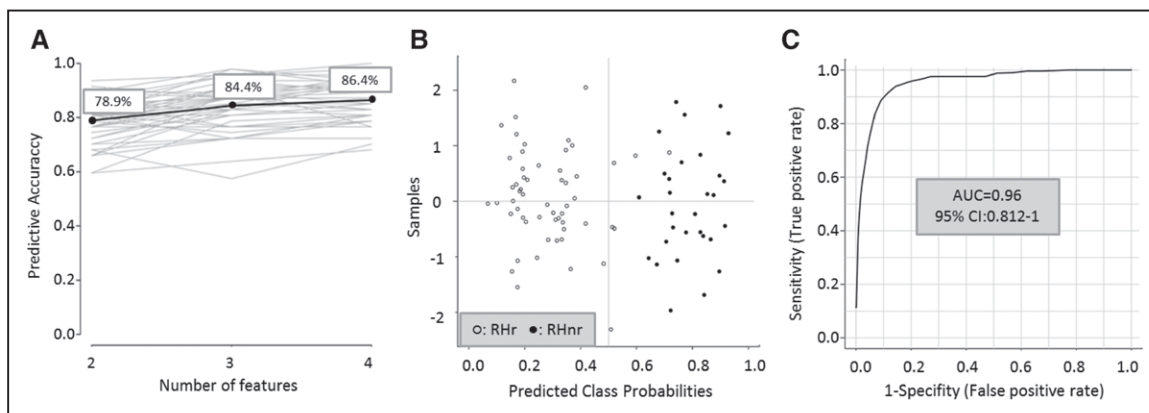


**Figure 1.** Citric acid cycle and metabolites responding to resistant hypertension. Metabolite levels in urine were quantified by selected reaction monitoring mode-LC-MS/MS. Urine samples were collected before spironolactone administration. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  HTN indicates controlled hypertension; RH, resistant hypertension; RHr, resistant hypertension patients responders to spironolactone treatment; RHnr, resistant hypertension patients nonresponders to spironolactone treatment; and TCA, tricarboxylic acid.

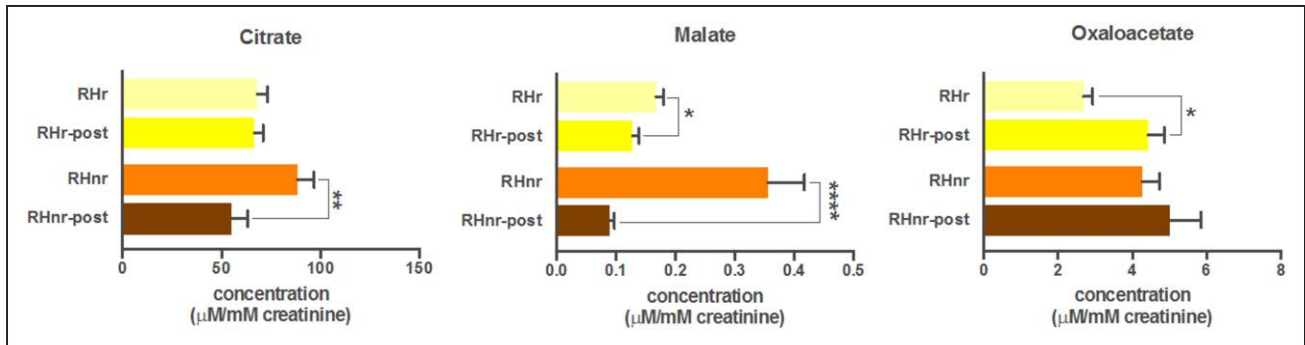
develop RH. RH is controlled in a high percentage of cases with aldosterone blockers. Spironolactone administration is the first choice and may be effective in difficult-to-treat patients,<sup>6</sup> causing a decrease in BP in 22/10 mmHg in the ASCOT study<sup>23</sup> or 9.8/1.0 mmHg in the ASPIRANT study.<sup>24</sup> Unfortunately, response to treatment is not guaranteed, and adverse effects may not be negligible, in particular gynecomastia or breast discomfort and biochemical abnormalities (mainly hyperkalemia). Currently, molecular clues about RH

development are inexistent, and physiopathological mechanisms subjacent to RH are unknown.

In this study, we first investigated most significant metabolic alterations in RH by comparing urine samples from patients with RH (confirmed by ABPM) and controlled hypertensives as control group. In a second stage, we investigated a potential prediction capacity of identified metabolites by anticipating patients' response to spironolactone. For that, we analyzed urine samples from RHr and RHnr collected before



**Figure 2.** Combined metabolic responses for citrate,  $\alpha$ -ketoglutarate, malate, and oxaloacetate were evaluated as prediction model for response to spironolactone. The predictive accuracy graph (A) shows how it increases with the number of metabolites included. The predicted class graph is shown in (B) and the resulting reactive oxygen species curve is shown in (C). AUC indicates area under the curve; CI, confidence interval; RHr, resistant hypertension patients responders to spironolactone treatment; and RHnr, resistant hypertension patients nonresponders to spironolactone treatment.



**Figure 3.** Effect of spironolactone treatment on citrate, malate, and oxaloacetate. Urine samples were collected before spironolactone administration. For urine samples collected after spironolactone treatment, RHR-post and RHnr-post correspond to responders and nonresponders, respectively. RHr indicates resistant hypertension patients responders to spironolactone treatment; and RHnr, resistant hypertension patients nonresponders to spironolactone treatment.

spironolactone was administered. Effect of the treatment on metabolic pattern was also evaluated in urine collected at 2 months after administration.

An enrichment analysis of metabolites detected in urine samples from patients with RH pointed to dysregulation of the CAC. The CAC is responsible for generating energy through the oxidation of acetyl coenzyme A, taking part mainly in the mitochondria. However, the efforts dedicated to assess the participation of the energy metabolism and energy metabolism dysfunction on hypertension have been limited. In this sense, increased mitochondrial function was found in spontaneously hypertensive rats compared with normotensives with pyruvate dehydrogenase complex activity consistently higher, indicating a higher rate of pyruvate flux into the CAC, and increase of BP was also observed when pyruvate dehydrogenase activity was increased.<sup>25</sup> However, higher fumarase activity, an enzyme that catalyzes deconversion of fumarate to malate, was suggested to protect from hypertension, fumarate excess exacerbated salt-induced hypertension, and a hypertensive effect was observed linked to a succinate excess, a metabolite upstream from fumarate in the CAC.<sup>25,26</sup> Recently, serum pyruvate analyzed by NMR was correlated with BP,<sup>27</sup> and it has also been described that CAC activity is increased<sup>28</sup> and that an accumulation of CAC intermediates could result in a pseudohypoxic state.<sup>26</sup> Evidence also suggests that kidney ischemia may be responsible for sympathetic nervous system activation in renal hypertension.<sup>29</sup> In this study focused in patients with RH, we show that the CAC continues its activation after hypertension was developed.

Mitochondria are a major site of reactive oxygen species (ROS) production but also a possible relevant target of ROS action. Oxidative stress is provoked by impairment in ROS production and metabolism, which may result in ultimate cellular dysfunction and damage. It can be cause, consequence, or a potentiating factor for hypertension. Increased ROS have been reported in the kidney in hypertension models,<sup>26,30</sup> and ROS generated in the renal and vascular systems are implicated in pathological signaling leading to hypertension.<sup>31,32</sup> Among ROS,  $H_2O_2$  is one of the major signaling molecules involved in pathophysiological processes.  $H_2O_2$  has prohypertensive effects because increased vasoconstriction, decreased diuresis and natriuresis, and control of renal medullary  $H_2O_2$  levels have been proposed as target in future treatments of hypertension.<sup>33</sup> It has been shown that CAC is modulated

to control intracellular concentration of ROS, being able to control oxidizing moieties formation but also to participate in their decomposition.<sup>34</sup> In particular, ketoglutarate is a potent ROS scavenger, and the modulation of redox environment is partly achieved by increased production of ketoglutarate and decreased use via the CAC.<sup>35</sup>

In our study, intracellular metabolism was not investigated. However, metabolites identified in urine are in any case the end products of altered metabolism in RH, which can be considered as messengers from the physiopathological status of the organisms and, ultimately, molecular signatures that may help in anticipating patient prognosis. In this sense, ketoglutarate is one of the metabolites showing significant increase in patients not responding to spironolactone versus RHr, in agreement with CAC deregulation in ROS homeostasis control. The same variation trend was observed for oxaloacetate, pointing to the same mechanism of cellular ROS modulation.<sup>36</sup> Surprisingly, spironolactone administration caused higher levels for this metabolite only in responders despite of the positive effect for this drug in BP control. It can be hypothesized that this metabolite has a beneficial effect, showing increased levels both in RH versus controlled hypertension, in RHnr versus RHr, and after spironolactone administration in those individuals who respond, as part of a compensatory mechanism being or not completely successful. Citrate is a metabolic substrate in the kidneys, and urinary citrate levels were found increased in systemic alkalosis, which is common in patients with RH and in line with data shown here.<sup>37</sup> Also, citrate accumulation in urine from patients with RH was higher in those who will not respond to spironolactone in the future and diminished significantly once spironolactone was administered. The same trend was observed for malate, both for RHr and RHnr. The observed reduction of citrate and malate could be a consequence of hyperkalemia or other related effects of spironolactone. Recently, it was shown how preischemic administration of an inhibitor of the malate–aspartate shuttle provides cardioprotection against ischemia/reperfusion injury although with unknown mechanism, in agreement with mitochondrial function deregulation in vascular injury.<sup>38</sup> The observed metabolites accumulation in urine can be associated with a hypoxic state. Hypoxia is related with mitochondrial dysfunction and because of that with several diseases, including cardiovascular complications.<sup>39</sup> Furthermore, when the hypoxia is chronic, it may cause a marked activation of the sympathetic

nervous system in healthy humans and increase the systemic arterial pressure.<sup>40</sup> The increased sympathetic nervous system activity is one of the few known underlying conditions of RH, supporting a crucial role in the resistance to antihypertensive treatments.<sup>3</sup> However, it is known that hypoxia can produce oxidative stress by a decrease in electron transport and an increase in ROS.<sup>39,41</sup> This impairment in the electron transport chain can be also related to changes in BP.<sup>26</sup>

In general, the RHnr have a more marked decrease or a blunted increase in CAC metabolites after receiving spironolactone (while they do not respond with a decrease in BP), suggesting that these metabolites may be used as markers but are not directly participating to the BP response to spironolactone. However, in view of reported metabolic changes, it can be hypothesized that RHnr may exhibit more severe metabolic dysfunction than RHr as the metabolites either vary between controlled hypertension and RH and also in RHnr versus RHr (oxaloacetate, citrate), or they show no significant variation between controlled hypertension and RH but they do in RHnr versus RHr (malate, ketoglutarate).

The study fulfilled the requirements of an Omics study in terms of group size and technical workflow.<sup>42</sup> However, the main limitation is the low number of patients from a clinical point of view. Thus, the clinical usefulness of the metabolites here reported should be replicated in larger multicenter cohorts to further confirm whether the same pathways and treatment results could be replicated.

## Perspectives

This is the first study to identify metabolic changes reflected in urine subjacent to RH. The urinary metabolome was explored, and individual metabolites were quantified by mass spectrometry, a technique that can be easily implemented in daily routine clinical practice. CAC was the most significant alteration with specific metabolites showing capacity to anticipate spironolactone response. This means that the measurement of this specific metabolic signature in urine, collected before drug administration, differentiates those individuals who will not respond to spironolactone in terms of BP control. This finding is of great importance in the control of patients with RH and opens a new field of research in which the CAC is shown to be involved.

## Acknowledgments

We thank Dolores Molero and Juan Manuel García Segura from CAI-RMN, UCM, Lucía Guerrero, and M<sup>a</sup> Cruz Casal from Hospital 12 de Octubre.

## Sources of Funding

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III cosupported by FEDER grants (PI13/01873, PIE13/00045, PI13/01746, PI14/01841, PI14/01650, PI15/00298, PI016/02057, PI16/01334, IF08/3667-1, CP09/00229, CPII15/00027, CP15/00129, CP14/00133, PT13/0001/0013, REDinREN [RD12/0021/0001 and RD16/0009]), Fundación SENEPRO/SEN, and Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

## Disclosures

R.M. Ruilope has served as advisor/speaker for Astra-Zeneca, Bayer, Daiichi-Sankyo, Medtronic, Novartis, Pfizer, Relypsa, Sanofi, and Takeda. The other authors report no conflicts.

## References

- Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, Ferdinand K, Giles TD, Falkner B, Carey RM. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment. A scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*. 2008;51:1403–1419. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.189141.
- Sarafidis PA, Georgianos P, Bakris GL. Resistant hypertension—its identification and epidemiology. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9:51–58. doi: 10.1038/nrneph.2012.260.
- Tsioufis C, Kordalis A, Flessas D, Anastasopoulos I, Tsiachris D, Papademetriou V, Stefanadis C. Pathophysiology of resistant hypertension: the role of sympathetic nervous system. *Int J Hypertens*. 2011;2011:642416. doi: 10.4061/2011/642416.
- Schmieder RE, Volpe M, Waeber B, Ruilope LM. A guide for easy-and difficult-to-treat hypertension. *Int J Cardiol*. 2014;172:17–22. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.12.125.
- de Souza F, Muxfeldt E, Fiszman R, Salles G. Efficacy of spironolactone therapy in patients with true resistant hypertension. *Hypertension*. 2010;55:147–152. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.140988.
- Williams B, MacDonald TM, Morant S, Webb DJ, Sever P, McInnes G, Ford I, Cruickshank JK, Caulfield MJ, Salsbury J, Mackenzie I, Padmanabhan S, Brown MJ; British Hypertension Society's PATHWAY Studies Group. Spironolactone versus placebo, bisoprolol, and doxazosin to determine the optimal treatment for drug-resistant hypertension (PATHWAY-2): a randomised, double-blind, crossover trial. *Lancet*. 2015;386:2059–2068. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00257-3.
- Rhee EP, Gerszten RE. Metabolomics and cardiovascular biomarker discovery. *Clin Chem*. 2012;58:139–147. doi: 10.1373/clinchem.2011.169573.
- Martin-Lorenzo M, Zubiri I, Maroto AS, Gonzalez-Calero L, Posada-Ayala M, de la Cuesta F, Mourino-Alvarez L, Lopez-Almodovar LF, Calvo-Bonacho E, Ruilope LM, Padial LR, Barderas MG, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. KLK1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery. *Metabolomics*. 2015;11:1056–1067. doi: 10.1007/s11306-014-0761-8.
- Yousri NA, Mook-Kanamori DO, Selim MM, et al. A systems view of type 2 diabetes-associated metabolic perturbations in saliva, blood and urine at different timescales of glycaemic control. *Diabetologia*. 2015;58:1855–1867. doi: 10.1007/s00125-015-3636-2.
- Weiss RH, Kim K. Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2011;8:22–33. doi: 10.1038/nrneph.2011.152.
- Posada-Ayala M, Zubiri I, Martin-Lorenzo M, Sanz-Maroto A, Molero D, Gonzalez-Calero L, Fernandez-Fernandez B, de la Cuesta F, Laborde CM, Barderas MG, Ortiz A, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2014;85:103–111. doi: 10.1038/ki.2013.328.
- Duranton F, Lundin U, Gayraud N, Mischak H, Aparicio M, Mourad G, Daurès JP, Weinberger KM, Argilés A. Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9:37–45. doi: 10.2215/CJN.06000613.
- Ye L, Mao W. Metabonomic biomarkers for risk factors of chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol*. 2016;48:547–552. doi: 10.1007/s11255-016-1239-6.
- Nikolic SB, Sharman JE, Adams MJ, Edwards LM. Metabolomics in hypertension. *J Hypertens*. 2014;32:1159–1169. doi: 10.1097/HJH.000000000000168.
- van der Kloet FM, Tempels FW, Ismail N, et al. Discovery of early-stage biomarkers for diabetic kidney disease using ms-based metabolomics (FinnDiane study). *Metabolomics*. 2012;8:109–119. doi: 10.1007/s11306-011-0291-6.
- Pena MJ, Lambers Heerspink HJ, Hellemons ME, Friedrich T, Dallmann G, Lajer M, Bakker SJ, Gansevoort RT, Rossing P, de Zeeuw D, Rascioni SS. Urine and plasma metabolites predict the development of diabetic nephropathy in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2014;31:1138–1147. doi: 10.1111/dme.12447.
- Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, Martínez PJ, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Segura J, de la Cuesta F, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Hypertensive patients exhibit an altered metabolite signature in urine is able to predict albuminuria progression. *Transl Res*. 2016;178:25–37.e7. doi: 10.1016/j.trsl.2016.07.003.
- Tulpan D, Léger S, Belliveau L, Culf A, Cuperlović-Culf M. MetaboHunter: an automatic approach for identification of metabolites

- from 1H-NMR spectra of complex mixtures. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:400. doi: 10.1186/1471-2105-12-400.
19. Xia J, Sineelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W251–W257. doi: 10.1093/nar/gkv380.
  20. Xia J, Wishart DS. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016;55:14.10.1–14.10.91. doi: 10.1002/cpbi.11.
  21. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, et al. The human urine metabolome. *PLoS One*. 2013;8:e73076. doi: 10.1371/journal.pone.0073076.
  22. Ruilope LM. Current challenges in the clinical management of hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2011;9:267–275. doi: 10.1038/nrcardio.2011.157.
  23. Chapman N, Dobson J, Wilson S, Dahlöf B, Sever PS, Wedel H, Poulter NR; Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial Investigators. Effect of spironolactone on blood pressure in subjects with resistant hypertension. *Hypertension*. 2007;49:839–845. doi: 10.1161/01.HYP.0000259805.18468.8c.
  24. Václavík J, Sedlák R, Plachy M, Navrátil K, Plásek J, Jarkovsky J, Václavík T, Husár R, Kociánová E, Táborsky M. Addition of spironolactone in patients with resistant arterial hypertension (ASPIRANT): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hypertension*. 2011;57:1069–1075. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.169961.
  25. Lee H, Abe Y, Lee I, Shrivastav S, Crusan AP, Hüttemann M, Hopfer U, Felder RA, Asico LD, Armando I, Jose PA, Kopp JB. Increased mitochondrial activity in renal proximal tubule cells from young spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int*. 2014;85:561–569. doi: 10.1038/ki.2013.397.
  26. Liang M. Hypertension as a mitochondrial and metabolic disease. *Kidney Int*. 2011;80:15–16. doi: 10.1038/ki.2011.84.
  27. Ameta K, Gupta A, Kumar S, Sethi R, Kumar D, Mahdi AA. Essential hypertension: a filtered serum based metabolomics study. *Sci Rep*. 2017;7:2153. doi: 10.1038/s41598-017-02289-9.
  28. Zheleznova NN, Yang C, Ryan RP, Halligan BD, Liang M, Greene AS, Cowley AW Jr. Mitochondrial proteomic analysis reveals deficiencies in oxygen utilization in medullary thick ascending limb of Henle in the Dahl salt-sensitive rat. *Physiol Genomics*. 2012;44:829–842. doi: 10.1152/physiolgenomics.00060.2012.
  29. Campese VM, Ku E, Park J. Sympathetic renal innervation and resistant hypertension. *Int J Hypertens*. 2011;2011:814354. doi: 10.4061/2011/814354.
  30. Araujo M, Wilcox CS. Oxidative stress in hypertension: role of the kidney. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20:74–101. doi: 10.1089/ars.2013.5259.
  31. Datla SR, Griendling KK. Reactive oxygen species, NADPH oxidases, and hypertension. *Hypertension*. 2010;56:325–330. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.142422.
  32. Ruiz-Hurtado G, Condezo-Hoyos L, Pulido-Olmo H, Aranguiz I, Del Carmen González M, Arribas S, Cerezo C, Segura J, Praga M, Fernández-Alfonso MS, Ruilope LM. Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *J Hypertens*. 2014;32:2082–2091; discussion 2091. doi: 10.1097/HJH.0000000000000292.
  33. Sousa T, Oliveira S, Afonso J, Morato M, Patinha D, Fraga S, Carvalho F, Albino-Teixeira A. Role of H(2)O(2) in hypertension, renin-angiotensin system activation and renal medullary dysfunction caused by angiotensin II. *Br J Pharmacol*. 2012;166:2386–2401. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01957.x.
  34. Tretter L, Adam-Vizi V. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci*. 2000;20:8972–8979.
  35. Mailloux RJ, Bériault R, Lemire J, Singh R, Chénier DR, Hamel RD, Appanna VD. The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS One*. 2007;2:e690. doi: 10.1371/journal.pone.0000690.
  36. Sawa K, Uematsu T, Korenaga Y, Hirasawa R, Kikuchi M, Murata K, Zhang J, Gai X, Sakamoto K, Koyama T, Satoh T. Krebs cycle intermediates protective against oxidative stress by modulating the level of reactive oxygen species in neuronal ht22 cells. *Antioxidants (Basel)*. 2017;6:Pii: E21. doi: 10.3390/antiox6010021.
  37. Judd EK, Calhoun DA, Warnock DG. Pathophysiology and treatment of resistant hypertension: the role of aldosterone and amiloride-sensitive sodium channels. *Semin Nephrol*. 2014;34:532–539. doi: 10.1016/j.semnephrol.2014.08.007.
  38. Jespersen NR, Yokota T, Støttrup NB, Bergdahl A, Paelestik KB, Povlsen JA, Dela F, Bøtker HE. Pre-ischaemic mitochondrial substrate constraint by inhibition of malate-aspartate shuttle preserves mitochondrial function after ischaemia-reperfusion. *J Physiol*. 2017;595:3765–3780. doi: 10.1113/JP273408.
  39. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797:1171–1177. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.011.
  40. Calbet JA. Chronic hypoxia increases blood pressure and noradrenaline spillover in healthy humans. *J Physiol*. 2003;551(pt 1):379–386. doi: 10.1113/jphysiol.2003.045112.
  41. Netzer N, Gatterer H, Faulhaber M, Burtscher M, Pramsohler S, Pesta D. Hypoxia, Oxidative stress and fat. *Biomolecules*. 2015;5:1143–1150. doi: 10.3390/biom5021143.
  42. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol*. 2006;24:971–983. doi: 10.1038/nbt1235.

## Novelty and Significance

### What Is New?

- The metabolism underlying resistant hypertension (RH) was here investigated for the first time showing reflection in urine.
- The citric acid cycle was the pathway most significantly altered.
- A prospective study in urine collected before spironolactone administration was conducted once patients were classified in RH responders or nonresponders in terms of blood pressure control.
- Citrate, oxaloacetate, malate, and  $\alpha$ -ketoglutarate were able to discriminate between RH responders and nonresponders before drug administration.

### What Is Relevant?

- This study was conducted in patients with RH compared with controlled hypertensives.

- Responders and nonresponders to spironolactone were investigated, and metabolic changes were identified able to anticipate patients' response.

### Summary

Citric acid cycle and deregulation of reactive oxygen species homeostasis control continue their activation after hypertension is developed. A metabolic panel showing alteration before spironolactone treatment and predicting future response of patients is shown. These molecular indicators will contribute to optimize the rate of control of RH patients with spironolactone.

# Anexo IV

---

**CV DE LA DOCTORANDA  
DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS DOCTORAL**



## BECAS OBTENIDAS

---

- **Ayuda Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS)**  
Instituto de Salud Carlos III
- **Ayuda a la movilidad SEPROT**  
Sociedad Española de Proteómica
- **2 Becas de movilidad para Jóvenes Investigadores**  
*European Atherosclerosis Society*

## ESTANCIAS REALIZADAS

---

- Estancia nacional de 1 mes (27-03-2017 / 27-03-2017) en el Centro de Apoyo a la Investigación en Resonancia Magnética Nuclear y Espín Electrónico de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la tutela de la Dr. Juan Manuel García Segura.
- Estancia nacional de 2 meses (04-04-2016 / 06-06-2016) en el Laboratorio de Fisiopatología Vascular del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, bajo la tutela de la Dra. Barderas.

## PREMIOS

---

- **Premio a la mejor Pretesis Clínica 2019**  
Fundación Jiménez Díaz
- **Premio a la mejor ponencia *Science at Glance***  
*86th Congress of the European Atherosclerosis Society*

## PUBLICACIONES

---

### ARTICULOS CIENTÍFICOS PERTENECIENTES A ESTA TESIS DOCTORAL

**Martínez PJ**, Agudiez M, Molero D, Martín-Lorenzo M, Baldan-Martin M, Santiago-Hernandez A, García-Segura JM, Madruga F, Cabrera M, Calvo E, Ruiz-Hurtado G, Barderas MG, Vivanco F, Ruilope LM, Alvarez-Llamas G. **Urinary metabolic signatures reflect cardiovascular risk in the young, middle-aged, and elderly populations.** *J Mol Med (Berl)*. 2020 Nov;98(11):1603-1613.

**Martínez PJ**, Baldán-Martín M, López JA, Martín-Lorenzo M, Santiago-Hernández A, Agudiez M, Cabrera M, Calvo E, Vázquez J, Ruiz-Hurtado G, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG, Alvarez-Llamas G. **Identification of six cardiovascular risk biomarkers in the young population: A promising tool for early prevention.** *Atherosclerosis*. 2019 Mar;282:67-74.

Martin-Lorenzo M\*, **Martinez PJ\***, Baldan-Martin M, Lopez JA, Minguez P, Santiago-Hernandez A, Vazquez J, Segura J, Ruiz-Hurtado G, Vivanco F, Barderas MG, Ruilope LM, Alvarez-Llamas G. **Urine Haptoglobin and Haptoglobin-Related Protein Predict Response to Spironolactone in Patients With Resistant Hypertension.** *Hypertension*. 2019 Apr;73(4):794-802.

Martin-Lorenzo M, **Martinez PJ**, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Prado JC, Segura J, de la Cuesta F, Barderas MG, Vivanco F, Ruilope LM, Alvarez-Llamas G. **Citric Acid Metabolism in Resistant Hypertension: Underlying Mechanisms and Metabolic Prediction of Treatment Response.** *Hypertension*. 2017 Nov;70(5):1049-1056.

## OTROS ARTICULOS CIENTÍFICOS

Santiago-Hernandez A, Martin-Lorenzo M, **Martínez PJ**, Gómez-Serrano M, Lopez JA, Cannata P, Esteban V, Heredero A, Aldamiz-Echevarria G, Vázquez J, Ruiz-Hurtado G, Barderas MG, Segura J, Ruilope LM, Alvarez-Llamas G. **Early renal and vascular damage within the normoalbuminuria condition.** *J Hypertens*. 2021 Nov 1;39(11):2220-2231.

Corbacho-Alonso N, Baldán-Martín M, López JA, Rodríguez-Sánchez E, **Martínez PJ**, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Cabrera M, Calvo E, Padial LR, Vázquez J, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Ruiz-Hurtado G, Ruilope LM, Barderas MG. **Cardiovascular Risk Stratification Based on Oxidative Stress for Early Detection of Pathology.** *Antioxid Redox Signal*. 2021 Sep;35 (8):602-617.

Santiago-Hernandez A, **Martinez PJ**, Agudiez M, Heredero A, Gonzalez-Calero L, Yuste-Montalvo A, Esteban V, Aldamiz-Echevarria G, Martin-Lorenzo M, Alvarez-Llamas G. **Metabolic Alterations Identified in Urine, Plasma and Aortic Smooth Muscle Cells Reflect Cardiovascular Risk in Patients with Programmed Coronary Artery Bypass Grafting.** *Antioxidants (Basel)*. 2021 Aug 27;10(9):1369.

Santiago-Hernandez A, **Martinez PJ**, Martin-Lorenzo M, Ruiz-Hurtado G, Barderas M, Segura J, Ruilope LM, Alvarez-Llamas G. **Differential metabolic profile associated with the condition of normoalbuminuria in the hypertensive population.** *Nefrologia (Engl Ed)*. 2020 Jul-Aug;40(4):440-445.

Agudiez M, **Martinez PJ**, Martin-Lorenzo M, Heredero A, Santiago-Hernandez A, Molero D, Garcia-Segura JM, Aldamiz-Echevarria G, Alvarez-Llamas G. **Analysis of urinary exosomal metabolites identifies cardiovascular risk signatures with added value to urine analysis.** *BMC Biol*. 2020 Dec 14;18(1):192.

Corbacho-Alonso N, Baldán-Martín M, López JA, Rodríguez-Sánchez E, **Martínez PJ**, Mourino-Alvarez L, Martin-Rojas T, Sastre-Oliva T, Madruga F, Vázquez J, Padial LR, Alvarez-Llamas G, Vivanco F, Ruiz-Hurtado G, Ruilope LM, Barderas MG. **Novel molecular plasma signatures on cardiovascular disease can stratify patients throughout life.** *J Proteomics*. 2020 Jun 30;222:103816.

Baldan-Martin M, Lopez JA, Corbacho-Alonso N, **Martinez PJ**, Rodriguez-Sanchez E, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Martin-Rojas T, Rincón R, Calvo E, Vazquez J, Vivanco F, Padial LR, Alvarez-Llamas G, Ruiz-Hurtado G, Ruilope LM, Barderas MG. **Potential role of new molecular plasma signatures on cardiovascular risk stratification in asymptomatic individuals.** *Sci Rep*. 2018 Mar 19;8(1):4802.

Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, **Martinez PJ**, Baldan-Martin M, Lopez JA, Ruiz-Hurtado G, de la Cuesta F, Segura J, Vazquez J, Vivanco F, Barderas MG, Ruilope LM, Alvarez-Llamas G. **Immune system deregulation in hypertensive patients chronically RAS suppressed developing albuminuria.** *Sci Rep.* 2017 Aug 21;7(1):8894.

Gonzalez-Calero L, **Martínez PJ**, Martin-Lorenzo M, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, de la Cuesta F, Calvo E, Segura J, Lopez JA, Vázquez J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. **Urinary exosomes reveal protein signatures in hypertensive patients with albuminuria.** *Oncotarget.* 2017 Jul 4;8(27):44217-44231.

Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, **Martínez PJ**, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Segura J, de la Cuesta F, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. **Hypertensive patients exhibit an altered metabolism. A specific metabolite signature in urine is able to predict albuminuria progression.** *Transl Res.* 2016 Dec;178:25-37.e7.

Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, Maroto AS, **Martinez PJ**, Zubiri I, de la Cuesta F, Mourino-Alvarez L, Barderas MG, Heredero A, Aldamiz-Echevarría G, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. **Cytoskeleton deregulation and impairment in amino acids and energy metabolism in early atherosclerosis at aortic tissue with reflection in plasma.** *Biochim Biophys Acta.* 2016 Apr;1862(4):725-732.

### CONGRESOS INTERNACIONALES (pertenecientes a esta Tesis Doctoral)

**Título del trabajo:** Molecular profile of Cardiovascular Risk in young population: a promising tool for early prevention

**Tipo de comunicación:** póster oral

**Nombre del congreso:** 87th Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS)

**Fecha y Ciudad de celebración:** 26/05/2019- 29/05/2019, Maastrich

**Título del trabajo:** Identification of molecular fingerprint in urine linked to cardiovascular risk and age

**Tipo de comunicación:** póster oral

**Nombre del congreso:** 86th Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS)

**Fecha y Ciudad de celebración:** 05/05/2018- 08/05/2018, Lisboa

**Título del trabajo:** CARDIOVASCULAR RISK IN YOUNG POPULATION: IDENTIFICATION OF PROTEIN SIGNATURES IN URINE

**Tipo de comunicación:** póster

**Nombre del congreso:** 85th Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS)

**Fecha y Ciudad de celebración:** 23/04/2017- 08/05/2017, Prague

### CONGRESOS NACIONALES (pertenecientes a esta Tesis Doctoral)

**Título del trabajo:** Identificación de una huella molecular en orina asociada a riesgo cardiovascular y modulada por la edad

**Tipo de comunicación:** oral

**Nombre del congreso:** 24ª Reunión Nacional de la SEH-LELHA (Sociedad Española de Hipertensión Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial)

**Fecha y Ciudad de celebración:** 07/03/2019- 08/03/2019, Madrid

**Título del trabajo:** Identificación de un patrón molecular en orina con capacidad predictora de respuesta a espironolactona en Hipertensión Resistente

**Tipo de comunicación:** póster

**Nombre del congreso:** 24ª Reunión Nacional de la SEH-LELHA (Sociedad Española de Hipertensión Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial)

**Fecha y Ciudad de celebración:** 07/03/2019- 08/03/2019, Madrid

**Título del trabajo:** Urine Haptoglobin And Haptoglobin-Related Protein Predict Response To Spironolactone In Resistant Hypertension Patients

**Tipo de comunicación:** oral

**Nombre del congreso:** Congreso Nacional VI Jornadas de Jóvenes Investigadores en Proteómica

**Fecha y Ciudad de celebración:** 04/03/2019-05/03/2019, Madrid

**Título del trabajo:** Identificación de una huella molecular en orina asociada a riesgo cardiovascular y edad

**Tipo de comunicación:** oral

**Nombre del congreso:** 23ª Reunión Nacional de la SEH-LELHA (Sociedad Española de Hipertensión Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial)

**Fecha y Ciudad de celebración:** 15/03/2018-16/03/2018, Zaragoza

**Título del trabajo:** Identificación de un panel marcador de 10 metabolitos asociados a riesgo cardiovascular: una nueva herramienta para una intervención terapéutica precoz

**Tipo de comunicación:** oral

**Nombre del congreso:** 23ª Reunión Nacional de la SEH-LELHA

**Fecha y Ciudad de celebración:** 15/03/2018-16/03/2018, Zaragoza

**Título del trabajo:** Estudio del metabolismo del ciclo del ácido cítrico en hipertensión resistente

**Tipo de comunicación:** póster

**Nombre del congreso:** 23ª Reunión Nacional de la SEH-LELHA

**Fecha y Ciudad de celebración:** 15/03/2018-16/03/2018, Zaragoza

**Título del trabajo:** Identification of protein signatures in urine linked to Cardiovascular Risk in Young Population.

**Nombre del congreso:** Congreso de la Sociedad Española de Proteómica

**Ciudad de celebración:** Cádiz, Andalucía, España

**Fecha de celebración:** 15/11/2016

**Fecha de finalización:** 18/11/2016

## PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS

---

**Nombre del proyecto:** Plataforma de Proteómica, Genotipado y Líneas Celulares PRB3. IPT17/001

**Entidad de realización:** IIS-Fundación Jiménez Díaz

**Entidad/es financiadora/s:** Instituto de Salud Carlos III

**Fecha de inicio-fin:** 01/01/2018 - 31/12/2020

**Cuantía total:** 12.000 €

**Nombre del proyecto:** Identificación de un perfil molecular predictor de albuminuria en pacientes hipertensos con supresión crónica del sistema renina-angiotensina

**Entidad de realización:** IIS-Fundación Jiménez Díaz

**Entidad/es financiadora/s:** Instituto de Salud Carlos III

**Tipo de entidad:** Organismo Público de Investigación

**Fecha de inicio-fin:** 01/01/2017 - 31/12/2019

**Cuantía total:** 98.615 €

**Nombre del proyecto:** ELA desde una aproximación ómico- molecular: identificación de dianas de diagnóstico temprano, pronóstico y monitorización terapéutica

**Entidad de realización:** IIS-Fundación Jiménez Díaz

**Entidad/es financiadora/s:** FUNDELA

**Fecha de inicio-fin:** 19/10/2018 - 19/10/2019

**Cuantía total:** 30.000 €

**Nombre del proyecto:** Plataforma de recursos biomoleculares y bioinformáticos PRB2. PT13/0001/0013

**Entidad de realización:** IIS-Fundación Jiménez Díaz

**Entidad/es financiadora/s:** Instituto de Salud Carlos III.

**Fecha de inicio-fin:** 01/09/2017 - 31/12/2018

**Nombre del proyecto:** Identificación de un perfil molecular predictor de desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos con supresión crónica del sistema renina-angiotensina

**Entidad de realización:** IIS-Fundación Jiménez Díaz

**Entidad/es financiadora/s:** Sociedad Española de Nefrología Tipo de entidad: Asociaciones y Agrupaciones

**Fecha de inicio-fin:** 01/01/2017 - 31/12/2018

**Cuantía total:** 24.000 €

**Nombre del proyecto:** Estudio de anafilaxia más allá del componente inmune: implicación del sistema vascular en el microambiente de la reacción

**Entidad de realización:** IIS-Fundación Jiménez Díaz

**Entidad/es financiadora/s:** Ayudas MERCK Serono de Investigación 2016

**Fecha de inicio-fin:** 01/07/2016 - 30/06/2018

**Cuantía total:** 25.000 €

**Nombre del proyecto:** Plataforma de recursos biomoleculares y bioinformáticos PRB2. PT13/0001/0013

**Entidad de realización:** IIS-Fundación Jiménez Díaz

**Entidad/es financiadora/s:** Instituto de Salud Carlos III Tipo de entidad: Organismo Público de Investigación

**Fecha de inicio-fin:** 01/01/2014 - 31/08/2017

**Cuantía total:** 37.400 €

**Nombre del proyecto:** HPP Iniciativa Cardiovascular: variaciones del perfil molecular y ómico con la edad y la estratificación del riesgo cardiovascular PI14/01650

**Entidad de realización:** IIS-Fundación Jiménez Díaz

**Entidad/es financiadora/s:** Instituto de Salud Carlos III Tipo de entidad: Organismo Público de Investigación

**Fecha de inicio-fin:** 01/01/2015 - 01/2017

**Cuantía total:** 229.000 €

**Nombre del proyecto:** Perfil proteómico y metabolómico asociado a riesgo cardiovascular en orina de pacientes con y sin enfermedad renal crónica. Sentando las bases de una predicción temprana. 3371/002

**Entidad de realización:** IIS-Fundación Jiménez Díaz

**Entidad/es financiadora/s:** IDC Salud

**Fecha de inicio-fin:** 01/01/2014 - 31/12/2016

**Cuantía total:** 20.000



# Bibliografía

---



1. Falk E (2006) Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 47:C7-12. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.068>
2. Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92:1355–1374. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.5.1355>
3. Libby P, Buring JE, Badimon L, et al (2019) Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 5:56. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>
4. Sabin Ruiz J, Alonso Pacho A (2012) Aterosclerosis y Arterioesclerosis: Control global del riesgo cardiometabólico. Editorial Diaz de Santos, S.A.
5. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801–809. <https://doi.org/10.1038/362801a0>
6. Abe J, Berk BC (2014) Novel mechanisms of endothelial mechanotransduction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:2378–2386. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303428>
7. Warboys CM, de Luca A, Amini N, et al (2014) Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:985–995. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303415>
8. Gimbrone MA, García-Cardena G (2013) Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 22:9–15. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2012.06.006>
9. Glass CK, Witztum JL (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104:503–516. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00238-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00238-0)
10. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915–924. <https://doi.org/10.1056/NEJM198904063201407>
11. Heinecke JW (1998) Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 141:1–15. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(98\)00173-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(98)00173-7)
12. Cuthbert GA, Shaik F, Harrison MA, et al (2020) Scavenger Receptors as Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Cells* 9:E2453. <https://doi.org/10.3390/cells9112453>
13. Harrison, Jameson LJ (2018) Harrison Principios de medicina interna. Volumen 1 Volumen 1. McGraw-Hill, Mexico D.F.
14. Lewis GF, Rader DJ (2005) New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 96:1221–1232. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000170946.56981.5c>
15. Spring B, Moller AC, Colangelo LA, et al (2014) Healthy lifestyle change and subclinical atherosclerosis in young adults: Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Circulation* 130:10–17. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005445>
16. Davies MJ, Thomas A (1984) Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med* 310:1137–1140. <https://doi.org/10.1056/NEJM198405033101801>

17. Hurst JW, Fuster V, Walsh RA, Harrington RA (2011) *Hurst's the heart*, 13th ed. McGraw-Hill Medical, New York
18. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al (2005) Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2054–2061. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18>
19. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, et al (2003) Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 349:2316–2325. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035655>
20. Kolte D, Libby P, Jang I-K (2021) New Insights Into Plaque Erosion as a Mechanism of Acute Coronary Syndromes. *JAMA* 325:1043–1044. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.0069>
21. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al (2016) 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* 37:2315–2381. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw106>
22. Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G, et al (2014) 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 63:2935–2959. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.11.005>
23. Piepoli MF, Abreu A, Albus C, et al (2020) Update on cardiovascular prevention in clinical practice: A position paper of the European Association of Preventive Cardiology of the European Society of Cardiology. *Eur J Prev Cardiol* 27:181–205. <https://doi.org/10.1177/2047487319893035>
24. D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, et al (2008) General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation* 117:743–753. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.699579>
25. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, et al (2003) Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 24:987–1003. [https://doi.org/10.1016/s0195-668x\(03\)00114-3](https://doi.org/10.1016/s0195-668x(03)00114-3)
26. Hippisley-Cox J, Coupland C, Vinogradova Y, et al (2008) Predicting cardiovascular risk in England and Wales: prospective derivation and validation of QRISK2. *BMJ* 336:1475–1482. <https://doi.org/10.1136/bmj.39609.449676.25>
27. Woodward M, Brindle P, Tunstall-Pedoe H, SIGN group on risk estimation (2007) Adding social deprivation and family history to cardiovascular risk assessment: the ASSIGN score from the Scottish Heart Health Extended Cohort (SHHEC). *Heart* 93:172–176. <https://doi.org/10.1136/hrt.2006.108167>
28. Assmann G, Cullen P, Schulte H (2002) Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation* 105:310–315. <https://doi.org/10.1161/hc0302.102575>
29. Ridker PM, Buring JE, Rifai N, Cook NR (2007) Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. *JAMA* 297:611–619. <https://doi.org/10.1001/jama.297.6.611>
30. Giampaoli S (2007) CUORE: a sustainable cardiovascular disease prevention strategy. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14:161–162. <https://doi.org/10.1097/HJR.0b013e328157f3e5>

31. Karmali KN, Lloyd-Jones DM (2016) Using a multiplier of 10-year cardiovascular mortality underestimates cardiovascular risk in younger individuals and women. *Evid Based Med* 21:150. <https://doi.org/10.1136/ebmed-2016-110423>
32. Jørstad HT, Colkesen EB, Boekholdt SM, et al (2016) Estimated 10-year cardiovascular mortality seriously underestimates overall cardiovascular risk. *Heart* 102:63–68. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307668>
33. Anand SS, Islam S, Rosengren A, et al (2008) Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *Eur Heart J* 29:932–940. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn018>
34. Lind L, Sundström J, Ärnlöv J, Lampa E (2018) Impact of Aging on the Strength of Cardiovascular Risk Factors: A Longitudinal Study Over 40 Years. *J Am Heart Assoc* 7:. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007061>
35. Sacramento-Pacheco J, Duarte-Clíments G, Gómez-Salgado J, et al (2019) Cardiovascular risk assessment tools: A scoping review. *Aust Crit Care* 32:540–559. <https://doi.org/10.1016/j.aucc.2018.09.008>
36. Cooney MT, Dudina AL, Graham IM (2009) Value and limitations of existing scores for the assessment of cardiovascular risk: a review for clinicians. *J Am Coll Cardiol* 54:1209–1227. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.07.020>
37. Sánchez-Cabo F, Rossello X, Fuster V, et al (2020) Machine Learning Improves Cardiovascular Risk Definition for Young, Asymptomatic Individuals. *J Am Coll Cardiol* 76:1674–1685. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.08.017>
38. Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, et al (2015) Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort: The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation* 131:2104–2113. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014310>
39. Johnson LC, Parker K, Aguirre BF, et al (2019) The plasma metabolome as a predictor of biological aging in humans. *Geroscience* 41:895–906. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00123-w>
40. Störk S, Feelders RA, van den Beld AW, et al (2006) Prediction of mortality risk in the elderly. *Am J Med* 119:519–525. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.10.062>
41. Christiaens T (2008) Cardiovascular risk tables. *BMJ* 336:1445–1446. <https://doi.org/10.1136/bmj.a480>
42. Hippisley-Cox J, Coupland C, Brindle P (2017) Development and validation of QRISK3 risk prediction algorithms to estimate future risk of cardiovascular disease: prospective cohort study. *BMJ* 357:j2099. <https://doi.org/10.1136/bmj.j2099>
43. SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration (2021) SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J* 42:2439–2454. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab309>
44. SCORE2-OP working group and ESC Cardiovascular risk collaboration (2021) SCORE2-OP risk prediction algorithms: estimating incident cardiovascular event risk in older persons in four geographical risk regions. *Eur Heart J* 42:2455–2467. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab312>

45. Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, et al (2021) 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal* 42:3227–3337. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab484>
46. Parsanathan R, Jain SK (2020) Novel Invasive and Noninvasive Cardiac-Specific Biomarkers in Obesity and Cardiovascular Diseases. *Metab Syndr Relat Disord* 18:10–30. <https://doi.org/10.1089/met.2019.0073>
47. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al (2012) C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med* 367:1310–1320. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1107477>
48. Puleo PR, Guadagno PA, Roberts R, et al (1990) Early diagnosis of acute myocardial infarction based on assay for subforms of creatine kinase-MB. *Circulation* 82:759–764. <https://doi.org/10.1161/01.cir.82.3.759>
49. Bagai A, Alexander KP, Berger JS, et al (2017) Use of troponin assay 99th percentile as the decision level for myocardial infarction diagnosis. *Am Heart J* 190:135–139. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2017.04.016>
50. Adams JE, Bodor GS, Dávila-Román VG, et al (1993) Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 88:101–106. <https://doi.org/10.1161/01.cir.88.1.101>
51. Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, et al (2009) Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* 361:858–867. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900428>
52. de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH (2003) B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 362:316–322. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13976-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13976-1)
53. Biomarkers Definitions Working Group. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69:89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
54. Doran S, Arif M, Lam S, et al (2021) Multi-omics approaches for revealing the complexity of cardiovascular disease. *Brief Bioinform* 22:bbab061. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab061>
55. Lewis GD, Asnani A, Gerszten RE (2008) Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery. *J Am Coll Cardiol* 52:117–123. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.03.043>
56. Omenn GS, Lane L, Overall CM, et al (2021) Progress Identifying and Analyzing the Human Proteome: 2021 Metrics from the HUPO Human Proteome Project. *J Proteome Res* 20:5227–5240. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00590>
57. Manual de Proteómica
58. Zethelius B, Berglund L, Sundström J, et al (2008) Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 358:2107–2116. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0707064>
59. Rizza S, Copetti M, Rossi C, et al (2014) Metabolomics signature improves the prediction of cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis* 232:260–264. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.029>

60. Lam MPY, Ping P, Murphy E (2016) Proteomics Research in Cardiovascular Medicine and Biomarker Discovery. *J Am Coll Cardiol* 68:2819–2830. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.10.031>
61. Yagi H, Nishigori M, Murakami Y, et al (2020) Discovery of novel biomarkers for atherosclerotic aortic aneurysm through proteomics-based assessment of disease progression. *Sci Rep* 10:6429. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63229-8>
62. McGarrah RW, Crown SB, Zhang G-F, et al (2018) Cardiovascular Metabolomics. *Circ Res* 122:1238–1258. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311002>
63. Herrington DM, Mao C, Parker SJ, et al (2018) Proteomic Architecture of Human Coronary and Aortic Atherosclerosis. *Circulation* 137:2741–2756. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034365>
64. Hernandez-Baixauli J, Quesada-Vázquez S, Mariné-Casadó R, et al (2020) Detection of Early Disease Risk Factors Associated with Metabolic Syndrome: A New Era with the NMR Metabolomics Assessment. *Nutrients* 12:E806. <https://doi.org/10.3390/nu12030806>
65. He T, Zhang Z, Staessen JA, et al (2021) Proteomic Biomarkers in the Cardiorenal Syndrome: Toward Deciphering Molecular Pathophysiology. *Am J Hypertens* 34:669–679. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpaa201>
66. Olkowicz M, Czyzyska-Cichon I, Szupryczynska N, et al (2021) Multi-omic signatures of atherogenic dyslipidaemia: pre-clinical target identification and validation in humans. *J Transl Med* 19:6. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02663-8>
67. Zou L, Wang X, Guo Z, et al (2019) Differential urinary proteomics analysis of myocardial infarction using iTRAQ quantification. *Mol Med Rep* 19:3972–3988. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10088>
68. Brown CE, McCarthy NS, Hughes AD, et al (2015) Urinary proteomic biomarkers to predict cardiovascular events. *Proteomics Clin Appl* 9:610–617. <https://doi.org/10.1002/prca.201400195>
69. Neisius U, Koeck T, Mischak H, et al (2016) Urine proteomics in the diagnosis of stable angina. *BMC Cardiovasc Disord* 16:70. <https://doi.org/10.1186/s12872-016-0246-y>
70. Li R-J, Jie Z-Y, Feng Q, et al (2021) Network of Interactions Between Gut Microbiome, Host Biomarkers, and Urine Metabolome in Carotid Atherosclerosis. *Front Cell Infect Microbiol* 11:708088. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.708088>
71. Yang L, Li Z, Song Y, et al (2019) Study on urine metabolic profiling and pathogenesis of hyperlipidemia. *Clin Chim Acta* 495:365–373. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.05.001>
72. Zhong W, Deng Q, Deng X, et al (2021) Plasma Metabolomics of Acute Coronary Syndrome Patients Based on Untargeted Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Front Cardiovasc Med* 8:616081. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.616081>
73. Molacek J, Treska V, Zeithaml J, et al (2019) Blood biomarker panel recommended for personalized prediction, prognosis, and prevention of complications associated with abdominal aortic aneurysm. *EPMA J* 10:125–135. <https://doi.org/10.1007/s13167-019-00173-2>
74. Yao H, Hou C, Liu W, et al (2020) Associations of multiple serum biomarkers and the risk of cardiovascular disease in China. *BMC Cardiovasc Disord* 20:426. <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01696-7>

75. Martin-Lorenzo M, Zubiri I, Maroto AS, et al (2015) KLK1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery. *Metabolomics* 11:1056–1067. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0761-8>
76. Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, Maroto AS, et al (2016) Cytoskeleton deregulation and impairment in amino acids and energy metabolism in early atherosclerosis at aortic tissue with reflection in plasma. *Biochim Biophys Acta* 1862:725–732. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.12.006>
77. Martin-Lorenzo M, Balluff B, Maroto AS, et al (2015) Molecular anatomy of ascending aorta in atherosclerosis by MS Imaging: Specific lipid and protein patterns reflect pathology. *J Proteomics* 126:245–251. <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2015.06.005>
78. Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, Martinez PJ, et al (2017) Immune system deregulation in hypertensive patients chronically RAS suppressed developing albuminuria. *Sci Rep* 7:8894. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09042-2>
79. Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, de la Cuesta F, et al (2016) Urinary alpha-1 antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression. *Cardiovasc Diabetol* 15:8. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0331-7>
80. Baldan-Martin M, Mourino-Alvarez L, Gonzalez-Calero L, et al (2016) Plasma Molecular Signatures in Hypertensive Patients With Renin-Angiotensin System Suppression: New Predictors of Renal Damage and De Novo Albuminuria Indicators. *Hypertension* 68:157–166. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07412>
81. Santiago-Hernandez A, Martin-Lorenzo M, Martínez PJ, et al (2021) Early renal and vascular damage within the normoalbuminuria condition. *J Hypertens* 39:2220–2231. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002936>
82. Santiago-Hernandez A, Martin-Lorenzo M, Martin-Blazquez A, et al (2021) TCA Cycle and Fatty Acids Oxidation Reflect Early Cardiorenal Damage in Normoalbuminuric Subjects with Controlled Hypertension. *Antioxidants (Basel)* 10:1100. <https://doi.org/10.3390/antiox10071100>
83. Zabetian A, Coca SG (2021) Plasma and urine biomarkers in chronic kidney disease: closer to clinical application. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 30:531–537. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000735>
84. Petrella G, Ciufolini G, Vago R, Cicero DO (2021) Urinary Metabolic Markers of Bladder Cancer: A Reflection of the Tumor or the Response of the Body? *Metabolites* 11:756. <https://doi.org/10.3390/metabo11110756>
85. Williams CEC, Toner A, Wright RD, Oni L (2021) A systematic review of urine biomarkers in children with IgA vasculitis nephritis. *Pediatr Nephrol* 36:3033–3044. <https://doi.org/10.1007/s00467-021-05107-7>
86. Flitcroft JG, Verheyen J, Vemulkar T, et al (2021) Early detection of kidney cancer using urinary proteins: a truly non-invasive strategy. *BJU Int*. <https://doi.org/10.1111/bju.15601>
87. Ronco C, McCullough P, Anker SD, et al (2010) Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative. *Eur Heart J* 31:703–711. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp507>
88. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) (2002) Third

Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106:3143–3421

89. Martínez-Bartolomé S, Navarro P, Martín-Maroto F, et al (2008) Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method. *Mol Cell Proteomics* 7:1135–1145. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700239-MCP200>
90. Navarro P, Vázquez J (2009) A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases. *J Proteome Res* 8:1792–1796. <https://doi.org/10.1021/pr800362h>
91. Bonzon-Kulichenko E, Garcia-Marques F, Trevisan-Herraz M, Vázquez J (2015) Revisiting peptide identification by high-accuracy mass spectrometry: problems associated with the use of narrow mass precursor windows. *J Proteome Res* 14:700–710. <https://doi.org/10.1021/pr5007284>
92. García-Marqués F, Trevisan-Herraz M, Martínez-Martínez S, et al (2016) A Novel Systems-Biology Algorithm for the Analysis of Coordinated Protein Responses Using Quantitative Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 15:1740–1760. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.055905>
93. Navarro P, Trevisan-Herraz M, Bonzon-Kulichenko E, et al (2014) General statistical framework for quantitative proteomics by stable isotope labeling. *J Proteome Res* 13:1234–1247. <https://doi.org/10.1021/pr4006958>
94. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 4:222. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.61>
95. Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, Martínez PJ, et al (2016) Hypertensive patients exhibit an altered metabolism. A specific metabolite signature in urine is able to predict albuminuria progression. *Translational Research* 178:25–37.e7. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.07.003>
96. Posada-Ayala M, Zubiri I, Martin-Lorenzo M, et al (2014) Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease. *Kidney International* 85:103–111. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.328>
97. Shimojima M, Yuasa S, Motoda C, et al (2017) Emerin plays a crucial role in nuclear invagination and in the nuclear calcium transient. *Sci Rep* 7:44312. <https://doi.org/10.1038/srep44312>
98. Corbacho-Alonso N, Baldán-Martín M, López JA, et al (2021) Cardiovascular Risk Stratification Based on Oxidative Stress for Early Detection of Pathology. *Antioxid Redox Signal* 35:602–617. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8254>
99. Kunsch C, Medford RM (1999) Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85:753–766. <https://doi.org/10.1161/01.res.85.8.753>
100. Devasagayam TPA, Tilak JC, Bloor KK, et al (2004) Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52:794–804
101. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18:655–673. <https://doi.org/10.1097/00004872-200018060-00002>

102. Förstermann U, Xia N, Li H (2017) Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res* 120:713–735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309326>
103. Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, et al (2016) Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol* 213:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.109>
104. Wang J, Tan G-J, Han L-N, et al (2017) Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction. *J Geriatr Cardiol* 14:135–150. <https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2017.02.008>
105. Jin YL, Zhu T, Xu L, et al (2013) Uric acid levels, even in the normal range, are associated with increased cardiovascular risk: the Guangzhou Biobank Cohort Study. *Int J Cardiol* 168:2238–2241. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.214>
106. Rysä J, Leskinen H, Ilves M, Ruskoaho H (2005) Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hypertensive heart failure. *Hypertension* 45:927–933. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000161873.27088.4c>
107. Xu X, Li Z, Gao W (2011) Growth differentiation factor 15 in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *Biomarkers* 16:466–475. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2011.580006>
108. Wallentin L, Hijazi Z, Andersson U, et al (2014) Growth differentiation factor 15, a marker of oxidative stress and inflammation, for risk assessment in patients with atrial fibrillation: insights from the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) trial. *Circulation* 130:1847–1858. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011204>
109. Adela R, Banerjee SK (2015) GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. *J Diabetes Res* 2015:490842. <https://doi.org/10.1155/2015/490842>
110. De Haan JJ, Haitjema S, den Ruijter HM, et al (2017) Growth Differentiation Factor 15 Is Associated With Major Amputation and Mortality in Patients With Peripheral Artery Disease. *J Am Heart Assoc* 6:e006225. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006225>
111. Wollert KC, Kempf T, Wallentin L (2017) Growth Differentiation Factor 15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease. *Clin Chem* 63:140–151. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.255174>
112. Hagström E, Held C, Stewart RAH, et al (2017) Growth Differentiation Factor 15 Predicts All-Cause Morbidity and Mortality in Stable Coronary Heart Disease. *Clin Chem* 63:325–333. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.260570>
113. Perez-Gomez MV, Pizarro-Sanchez S, Gracia-Iguacel C, et al (2021) Urinary Growth Differentiation Factor-15 (GDF15) levels as a biomarker of adverse outcomes and biopsy findings in chronic kidney disease. *J Nephrol* 34:1819–1832. <https://doi.org/10.1007/s40620-021-01020-2>
114. Lim J-H, Jeon Y, Ahn J-S, et al (2021) GDF-15 Predicts In-Hospital Mortality of Critically Ill Patients with Acute Kidney Injury Requiring Continuous Renal Replacement Therapy: A Multicenter Prospective Study. *J Clin Med* 10:3660. <https://doi.org/10.3390/jcm10163660>
115. Niccoli G, Cosentino N (2012) Eosinophils: a new player in coronary atherosclerotic disease. *Hypertens Res* 35:269–271. <https://doi.org/10.1038/hr.2011.221>

116. Prentice RL, Szatrowski TP, Fujikura T, et al (1982) Leukocyte counts and coronary heart disease in a Japanese cohort. *Am J Epidemiol* 116:496–509. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113434>
117. Niccoli G, Ferrante G, Cosentino N, et al (2010) Eosinophil cationic protein: A new biomarker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 211:606–611. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.02.038>
118. Lind L, Siegbahn A, Lindahl B, et al (2015) Discovery of New Risk Markers for Ischemic Stroke Using a Novel Targeted Proteomics Chip. *Stroke* 46:3340–3347. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.010829>
119. Ishii H, Kamikawa S, Hirohata S, et al (2015) Eosinophil Cationic Protein Shows Survival Effect on H9c2 Cardiac Myoblast Cells with Enhanced Phosphorylation of ERK and Akt/GSK-3 $\beta$  under Oxidative Stress. *Acta Med Okayama* 69:145–153. <https://doi.org/10.18926/AMO/53521>
120. Zhu K, Wang Y, Shu P, et al (2017) Increased serum levels of fetuin B in patients with coronary artery disease. *Endocrine* 58:97–105. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1387-1>
121. Jung SH, Won K-J, Lee KP, et al (2015) The serum protein fetuin-B is involved in the development of acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 129:27–38. <https://doi.org/10.1042/CS20140462>
122. Briot A, Civelek M, Seki A, et al (2015) Endothelial NOTCH1 is suppressed by circulating lipids and antagonizes inflammation during atherosclerosis. *J Exp Med* 212:2147–2163. <https://doi.org/10.1084/jem.20150603>
123. Sweetwyne MT, Gruenwald A, Niranjana T, et al (2015) Notch1 and Notch2 in Podocytes Play Differential Roles During Diabetic Nephropathy Development. *Diabetes* 64:4099–4111. <https://doi.org/10.2337/db15-0260>
124. Murea M, Park J-K, Sharma S, et al (2010) Expression of Notch pathway proteins correlates with albuminuria, glomerulosclerosis, and renal function. *Kidney Int* 78:514–522. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.172>
125. Asanuma K, Oliva Trejo JA, Tanaka E (2017) The role of Notch signaling in kidney podocytes. *Clin Exp Nephrol* 21:1–6. <https://doi.org/10.1007/s10157-016-1247-y>
126. Kato H, Susztak K (2012) Repair problems in podocytes: Wnt, Notch, and glomerulosclerosis. *Semin Nephrol* 32:350–356. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.06.006>
127. Matthijs Blankesteijn W, Hermans KCM (2015) Wnt signaling in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 763:122–130. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.023>
128. Albanese I, Khan K, Barratt B, et al (2018) Atherosclerotic Calcification: Wnt Is the Hint. *J Am Heart Assoc* 7:e007356. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007356>
129. Gay A, Towler DA (2017) Wnt signaling in cardiovascular disease: opportunities and challenges. *Curr Opin Lipidol* 28:387–396. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000445>
130. Brixius-Anderko S, Scott EE (2021) Structural and functional insights into aldosterone synthase interaction with its redox partner protein adrenodoxin. *J Biol Chem* 296:100794. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100794>
131. Connell JMC, Davies E (2005) The new biology of aldosterone. *J Endocrinol* 186:1–20. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06017>

132. McGraw AP, Bagley J, Chen W-S, et al (2013) Aldosterone increases early atherosclerosis and promotes plaque inflammation through a placental growth factor-dependent mechanism. *J Am Heart Assoc* 2:e000018. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.000018>
133. Calhoun DA, Sharma K (2010) The role of aldosteronism in causing obesity-related cardiovascular risk. *Cardiol Clin* 28:517–527. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2010.04.001>
134. Milliez P, Girerd X, Plouin P-F, et al (2005) Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 45:1243–1248. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.01.015>
135. Marques ARA, Ramos C, Machado-Oliveira G, Vieira OV (2021) Lysosome (Dys)function in Atherosclerosis-A Big Weight on the Shoulders of a Small Organelle. *Front Cell Dev Biol* 9:658995. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.658995>
136. Banfi C, Brioschi M, Barcella S, et al (2009) Proteomic analysis of human low-density lipoprotein reveals the presence of prenylcysteine lyase, a hydrogen peroxide-generating enzyme. *Proteomics* 9:1344–1352. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800566>
137. Herrera-Marcos LV, Lou-Bonafonte JM, Martinez-Gracia MV, et al (2018) Prenylcysteine oxidase 1, a pro-oxidant enzyme of low density lipoproteins. *Front Biosci (Landmark Ed)* 23:1020–1037. <https://doi.org/10.2741/4631>
138. Banfi C, Baetta R, Barbieri SS, et al (2021) Prenylcysteine oxidase 1, an emerging player in atherosclerosis. *Commun Biol* 4:1109. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02630-z>
139. Carballo-Casla A, García-Esquinas E, Buño-Soto A, et al (2021) Metabolic syndrome and Growth Differentiation Factor 15 in older adults. *Geroscience*. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00370-w>
140. Gao X, Jia Y, Xu H, et al (2021) Association between serum pepsinogen and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 31:169–177. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.07.045>
141. Okuda M, Lin Y, Mabe K, et al (2020) Serum Pepsinogen Values in Japanese Junior High School Students With Reference to Helicobacter Pylori Infection. *J Epidemiol* 30:30–36. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20180119>
142. Budzyński J, Koziński M, Kłopocka M, et al (2014) Clinical significance of Helicobacter pylori infection in patients with acute coronary syndromes: an overview of current evidence. *Clin Res Cardiol* 103:855–886. <https://doi.org/10.1007/s00392-014-0720-4>
143. Furuto Y, Kawamura M, Yamashita J, et al (2021) Relationship Between Helicobacter pylori Infection and Arteriosclerosis. *Int J Gen Med* 14:1533–1540. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S303071>
144. Toth PP (2016) Triglyceride-rich lipoproteins as a causal factor for cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag* 12:171–183. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S104369>
145. Saito I, Yamagishi K, Kokubo Y, et al (2017) Association of high-density lipoprotein cholesterol concentration with different types of stroke and coronary heart disease: The Japan Public Health Center-based prospective (JPHC) study. *Atherosclerosis* 265:147–154. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.032>
146. Verbeek R, Hoogeveen RM, Langsted A, et al (2018) Cardiovascular disease risk associated with elevated lipoprotein(a) attenuates at low low-density lipoprotein cholesterol levels

- in a primary prevention setting. *Eur Heart J* 39:2589–2596. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy334>
147. Watanabe J, Hamasaki M, Kotani K (2021) The Effect of *Helicobacter pylori* Eradication on Lipid Levels: A Meta-Analysis. *J Clin Med* 10:904. <https://doi.org/10.3390/jcm10050904>
148. Shimamoto T, Yamamichi N, Gondo K, et al (2020) The association of *Helicobacter pylori* infection with serum lipid profiles: An evaluation based on a combination of meta-analysis and a propensity score-based observational approach. *PLoS One* 15:e0234433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234433>
149. Gupta A, Wang Y, Spertus JA, et al (2014) Trends in acute myocardial infarction in young patients and differences by sex and race, 2001 to 2010. *J Am Coll Cardiol* 64:337–345. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.04.054>
150. Kannel WB (2002) The Framingham Study: historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women. *J Gend Specif Med* 5:27–37
151. Czubyrt MP, Espira L, Lamoureux L, Abrenica B (2006) The role of sex in cardiac function and disease. *Can J Physiol Pharmacol* 84:93–109. <https://doi.org/10.1139/y05-151>
152. Roeters van Lennep JE, Westerveld HT, Erkelens DW, van der Wall EE (2002) Risk factors for coronary heart disease: implications of gender. *Cardiovasc Res* 53:538–549. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00388-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00388-1)
153. Kander MC, Cui Y, Liu Z (2017) Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *J Cell Mol Med* 21:1024–1032. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13038>
154. Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, et al (2002) Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:438–442. <https://doi.org/10.1161/hq0302.104515>
155. Matarrese P, Colasanti T, Ascione B, et al (2011) Gender disparity in susceptibility to oxidative stress and apoptosis induced by autoantibodies specific to RLIP76 in vascular cells. *Antioxid Redox Signal* 15:2825–2836. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3942>
156. Bhatia K, Elmarakby AA, El-Remessy AB, et al (2012) Oxidative stress contributes to sex differences in angiotensin II-mediated hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302:R274–282. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00546.2011>
157. van Lennep HWOR, Westerveld HT, Zwinderman AH, et al (2002) Differential effect of female gender on coronary artery disease and peripheral artery disease. *Neth Heart J* 10:500–505
158. Brown SA, Hutchinson R, Morrisett J, et al (1993) Plasma lipid, lipoprotein cholesterol, and apoprotein distributions in selected US communities. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb* 13:1139–1158. <https://doi.org/10.1161/01.atv.13.8.1139>
159. Grady D, Herrington D, Bittner V, et al (2002) Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 288:49–57. <https://doi.org/10.1001/jama.288.1.49>
160. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321–333. <https://doi.org/10.1001/jama.288.3.321>

161. Yang D, Li J, Yuan Z, Liu X (2013) Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 8:e62329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062329>
162. De Silva TM, Broughton BRS, Drummond GR, et al (2009) Gender influences cerebral vascular responses to angiotensin II through Nox2-derived reactive oxygen species. *Stroke* 40:1091–1097. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531707>
163. Rodford JL, Torrens C, Siow RCM, et al (2008) Endothelial dysfunction and reduced antioxidant protection in an animal model of the developmental origins of cardiovascular disease. *J Physiol* 586:4709–4720. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.156976>
164. Kameritsch P, Singer M, Nuernbergk C, et al (2021) The mitochondrial thioredoxin reductase system (TrxR2) in vascular endothelium controls peroxynitrite levels and tissue integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:e1921828118. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921828118>
165. Bozaci I, Tatar E (2021) The role of azurocidin in patients with familial Mediterranean fever and AA amyloidosis and its association with cardiovascular risk factors. *Int Urol Nephrol* 53:531–538. <https://doi.org/10.1007/s11255-020-02652-2>
166. Baveye S, Ellass E, Fernig DG, et al (2000) Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E-selectin and ICAM-1, induced by the CD14-lipopolysaccharide complex. *Infect Immun* 68:6519–6525. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6519-6525.2000>
167. Vasilyev VB, Sokolov AV, Kostevich VA, et al (2021) Binding of lactoferrin to the surface of low-density lipoproteins modified by myeloperoxidase prevents intracellular cholesterol accumulation by human blood monocytes. *Biochem Cell Biol* 99:109–116. <https://doi.org/10.1139/bcb-2020-0141>
168. Lee R, Cassimee I, Huang H, et al (2020) Integrated Plasma and Tissue Proteomics Reveals Attractin Release by Intraluminal Thrombus of Abdominal Aortic Aneurysms and Improves Aneurysm Growth Prediction in Humans. *Ann Surg*. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000004439>
169. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD (2005) Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 365:1577–1589. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66459-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66459-8)
170. Kovacic JC, Lee P, Baber U, et al (2012) Inverse relationship between body mass index and coronary artery calcification in patients with clinically significant coronary lesions. *Atherosclerosis* 221:176–182. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.020>
171. Freitas WM, Carvalho LSF, Moura FA, Sposito AC (2012) Atherosclerotic disease in octogenarians: A challenge for science and clinical practice. *Atherosclerosis* 225:281–289. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.06.070>
172. Kim Y-J, Ryu H-M, Choi J-Y, et al (2017) Hypoxanthine causes endothelial dysfunction through oxidative stress-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482:821–827. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.119>
173. Muiesan ML, Clinical and Experimental Sciences Department, University of Brescia, Brescia, Italy, Agabiti-Rosei C, et al (2016) Uric Acid and Cardiovascular Disease: An Update. *European Cardiology Review* 11:54. <https://doi.org/10.15420/ocr.2016:4:2>
174. Gall WE, Beebe K, Lawton KA, et al (2010)  $\alpha$ -Hydroxybutyrate Is an Early Biomarker of Insulin Resistance and Glucose Intolerance in a Nondiabetic Population. *PLoS ONE* 5:e10883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010883>

175. Deidda M, Piras C, Cadeddu Dessalvi C, et al (2017) Blood metabolomic fingerprint is distinct in healthy coronary and in stenosing or microvascular ischemic heart disease. *J Transl Med* 15:112. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1215-7>
176. Laborde CM, Mourino-Alvarez L, Posada-Ayala M, et al (2014) Plasma metabolomics reveals a potential panel of biomarkers for early diagnosis in acute coronary syndrome. *Metabolomics* 10:414–424. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0595-9>
177. Zhou X, He L, Zuo S, et al (2018) Serine prevented high-fat diet-induced oxidative stress by activating AMPK and epigenetically modulating the expression of glutathione synthesis-related genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1864:488–498. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.11.009>
178. Zhou X, He L, Wu C, et al (2017) Serine alleviates oxidative stress via supporting glutathione synthesis and methionine cycle in mice. *Mol Nutr Food Res* 61:1700262. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700262>
179. Huemer M, Carvalho DR, Brum JM, et al (2016) Clinical phenotype, biochemical profile, and treatment in 19 patients with arginase 1 deficiency. *J Inherit Metab Dis* 39:331–340. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9928-y>
180. Tousoulis D, Antoniades C, Tentolouris C, et al (2002) L-Arginine in cardiovascular disease: dream or reality? *Vasc Med* 7:203–211. <https://doi.org/10.1191/1358863x02vm434ra>
181. Sen S, Roy S, Bandyopadhyay G, et al (2016)  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Is Synthesized and Released by the Endothelium: Potential Implications. *Circ Res* 119:621–634. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308645>
182. Yang Y, Luo H, Cheng L-X, Liu K (2013) Inhibitory role for GABA in atherosclerosis. *Medical Hypotheses* 81:803–804. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.08.029>
183. Kanitsoraphan C, Rattanawong P, Charoensri S, Senthong V (2018) Trimethylamine N-Oxide and Risk of Cardiovascular Disease and Mortality. *Curr Nutr Rep* 7:207–213. <https://doi.org/10.1007/s13668-018-0252-z>
184. Qi J, You T, Li J, et al (2018) Circulating trimethylamine N-oxide and the risk of cardiovascular diseases: a systematic review and meta-analysis of 11 prospective cohort studies. *J Cell Mol Med* 22:185–194. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13307>
185. Cieslarova Z, Magaldi M, Barros LA, et al (2019) Capillary electrophoresis with dual diode array detection and tandem mass spectrometry to access cardiovascular biomarkers candidates in human urine: Trimethylamine-N-Oxide and l-carnitine. *J Chromatogr A* 1583:136–142. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.005>
186. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al (2013) Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 19:576–585. <https://doi.org/10.1038/nm.3145>
187. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, et al (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386:292–296. <https://doi.org/10.1038/386292a0>
188. Liu T-X, Niu H-T, Zhang S-Y (2015) Intestinal Microbiota Metabolism and Atherosclerosis. *Chin Med J (Engl)* 128:2805–2811. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.167362>

189. Ott SJ, El Mokhtari NE, Musfeldt M, et al (2006) Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation* 113:929–937. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.579979>
190. Zhu W, Gregory JC, Org E, et al (2016) Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell* 165:111–124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.011>
191. Brown JM, Hazen SL (2015) The gut microbial endocrine organ: bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases. *Annu Rev Med* 66:343–359. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-060513-093205>
192. Suzuki T, Heaney LM, Jones DJL, Ng LL (2017) Trimethylamine N-oxide and Risk Stratification after Acute Myocardial Infarction. *Clinical Chemistry* 63:420–428. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.264853>
193. Reddy P, Leong J, Jialal I (2018) Amino acid levels in nascent metabolic syndrome: A contributor to the pro-inflammatory burden. *Journal of Diabetes and its Complications* 32:465–469. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2018.02.005>
194. Patel A, Thompson A, Abdelmalek L, et al (2019) The relationship between tyramine levels and inflammation in metabolic syndrome. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 40: <https://doi.org/10.1515/hmbci-2019-0047>
195. Bulló M, Papandreou C, García-Gavilán J, et al (2021) Tricarboxylic acid cycle related-metabolites and risk of atrial fibrillation and heart failure. *Metabolism* 125:154915. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154915>
196. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, et al (2013) Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 368:1575–1584. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109400>
197. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al (2011) Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472:57–63. <https://doi.org/10.1038/nature09922>
198. Guasch-Ferré M, Hu FB, Ruiz-Canela M, et al (2017) Plasma Metabolites From Choline Pathway and Risk of Cardiovascular Disease in the PREDIMED (Prevention With Mediterranean Diet) Study. *J Am Heart Assoc* 6:e006524. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006524>
199. Wang Z, Tang WHW, Buffa JA, et al (2014) Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J* 35:904–910. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu002>
200. Lv S, Fan R, Du Y, et al (2009) Betaine supplementation attenuates atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice. *Eur J Nutr* 48:205–212. <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0003-4>
201. Olthof MR, Brink EJ, Katan MB, Verhoef P (2005) Choline supplemented as phosphatidylcholine decreases fasting and postmethionine-loading plasma homocysteine concentrations in healthy men. *Am J Clin Nutr* 82:111–117. <https://doi.org/10.1093/ajcn.82.1.111>
202. Olthof MR, van Vliet T, Boelsma E, Verhoef P (2003) Low dose betaine supplementation leads to immediate and long term lowering of plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr* 133:4135–4138. <https://doi.org/10.1093/jn/133.12.4135>
203. Schwab U, Törrönen A, Toppinen L, et al (2002) Betaine supplementation decreases plasma homocysteine concentrations but does not affect body weight, body composition, or

- resting energy expenditure in human subjects. *Am J Clin Nutr* 76:961–967. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.5.961>
204. Steenge GR, Verhoef P, Katan MB (2003) Betaine supplementation lowers plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr* 133:1291–1295. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1291>
205. Bidulescu A, Chambless LE, Siega-Riz AM, et al (2007) Usual choline and betaine dietary intake and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *BMC Cardiovasc Disord* 7:20. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-7-20>
206. Bertoia ML, Pai JK, Cooke JP, et al (2014) Plasma homocysteine, dietary B vitamins, betaine, and choline and risk of peripheral artery disease. *Atherosclerosis* 235:94–101. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.010>
207. Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, et al (2015) Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell* 163:1585–1595. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.055>
208. Vieira-Alves I, Coimbra-Campos LMC, Sancho M, et al (2020) Role of the  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor in the Pathophysiology of Atherosclerosis. *Front Physiol* 11:621769. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.621769>
209. Ganguly P, Alam SF (2015) Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J* 14:6. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-14-6>
210. Domanski MJ, Tian X, Wu CO, et al (2020) Time Course of LDL Cholesterol Exposure and Cardiovascular Disease Event Risk. *J Am Coll Cardiol* 76:1507–1516. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.07.059>
211. Calhoun DA, Jones D, Textor S, et al (2008) Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment. A scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* 51:1403–1419. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.189141>
212. Sarafidis PA, Georgianos P, Bakris GL (2013) Resistant hypertension--its identification and epidemiology. *Nat Rev Nephrol* 9:51–58. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.260>