



## GLICOPROTEÏNES SÈRIQUES DETERMINADES PER 1 H-RMN COM A MARCADOR D'INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU. ESTUDI EN PACIENTS VIH I HF.

Ana Irene Malo Cerisuelo

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

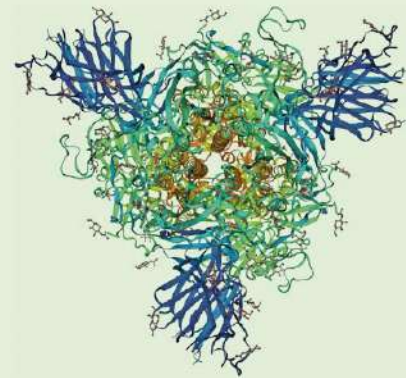
**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GLICOPROTEÏNES SÈRIQUES DETERMINADES PER 1H-RMN COM A MARCADOR D'INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU.  
ESTUDI EN PACIENTS VIH I HF.  
Ana Irene Malo Cerisuelo



**GLICOPROTEÏNES SÈRIQUES DETERMINADES PER  
1H-RMN COM A MARCADOR D'INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU.  
ESTUDI EN PACIENTS VIH I HF**

**Ana Irene Malo Cerisuelo**



**Tesi Doctoral  
2022**



TESI DOCTORAL  
Ana Irene Malo Cerisuelo

GLICOPROTEÏNES SÈRIQUES DETERMINADES PER 1H-RMN COM A  
MARCADOR D'INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU. ESTUDI EN PACIENTS VIH I HF



## TESI DOCTORAL

# GLICOPROTEÏNES SÈRIQUES DETERMINADES PER <sup>1</sup>H-RMN COM A MARCADOR D'INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU. ESTUDI EN PACIENTS VIH I HF.

Tesis doctoral presentada per

Ana Irene Malo Cerisuelo

per optar al Títol de Doctora per la Universitat Rovira i Virgili

Dirigida per:

Dr. Luís Masana Marín

Dra. Anna Rull Aixa

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GLICOPROTEÏNES SÈRIQUES DETERMINADES PER 1 H-RMN COM A MARCADOR D'INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU.  
ESTUDI EN PACIENTS VIH I HF.  
Ana Irene Malo Cerisuelo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GLICOPROTEÏNES SÈRIQUES DETERMINADES PER 1 H-RMN COM A MARCADOR D'INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU.  
ESTUDI EN PACIENTS VIH I HF.  
Ana Irene Malo Cerisuelo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GLICOPROTEÏNES SÈRIQUES DETERMINADES PER 1 H-RMN COM A MARCADOR D'INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU.  
ESTUDI EN PACIENTS VIH I HF.  
Ana Irene Malo Cerisuelo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GLICOPROTEÏNES SÈRIQUES DETERMINADES PER 1 H-RMN COM A MARCADOR D'INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU.  
ESTUDI EN PACIENTS VIH I HF.  
Ana Irene Malo Cerisuelo

## CONTINGUTS DEL TREBALL

<u>LLISTAT D'ABREVIACIONS</u> .....	9
<u>I JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL</u> .....	13
<u>II INTRODUCCIÓ</u> .....	14
1.- Inflamació crònica.....	14
2.- Inflamació crònica en persones que viuen amb el virus de la immunodeficiència humana (PLWH, <i>people living with HIV</i> ) no responedors a teràpia antiretroviral (TAR) i controladors d'elit.....	15
2.1 Mecanismes generals d'inflamació crònica en PLWH.....	15
2.2 Mecanismes d'inflamació crònica de baix grau en PLWH no responedors a teràpia antiretroviral (TAR).....	19
2.3 Mecanismes d'inflamació crònica de baix grau en PLWH controladors d'elit.....	22
2.4 Revisió dels marcadors tradicionals com a marcadors inflamatoris i de pronòstic en PLWH.....	25
2.5 Revisió dels marcadors tradicionals com a marcadors inflamatoris i de pronòstic en PLWH no responedors a teràpia antiretroviral (TAR).....	29
2.6 Revisió dels marcadors tradicionals com a marcadors inflamatoris i de pronòstic en PLWH controladors d'elit.....	31
3.- Inflamació crònica de baix grau en pacients amb hipercolesterolèmia familiar (HF).....	34
3.1 Mecanismes d'inflamació crònica de baix grau en població HF.....	35
3.2 Revisió dels marcadors tradicionals com a marcadors inflamatoris i de pronòstic en població HF.....	37
4.- Glicoproteïnes.....	40



4.1 Conceptes generals. ....	40
4.2. Anàlisi de glicoproteïnes per <sup>1</sup> H-RMN. ....	42
5.- Glicoproteïnes com a marcadors inflamatoris. ....	45
5.1 Glicoproteïnes com a marcadors inflamatoris en població PLWH. ....	46
5.2 Glicoproteïnes quantificades per <sup>1</sup> H-RMN i risc cardiovascular. ....	46
<u>III HIPOTESI DEL TREBALL</u> .....	50
<u>IV OBJECTIUS</u> .....	52
<u>V METODOLOGIA</u> .....	53
1.- Cohort PLWH no recuperadors. ....	53
2.- Cohort controladors d'elit. ....	53
3.- Cohort de pacients amb hipercolesterolèmia familiar. ....	54
4.- Determinació de Glicoproteïnes per <sup>1</sup> H-NMR. Bases metodològiques. ....	55
5.- Mètodes estadístics generals. ....	56
<u>VI RESULTATS: TREBALLS PUBLICATS</u> .....	57
1.- Primer treball: “Glycoprotein Profile Assessed by <sup>1</sup> H-NMR as a Global Inflammation Marker in Patients with HIV Infection. A Prospective Study” .....	58
2.- Segon treball: “Evolution of Serum Acute-Phase Glycoproteins Assessed by <sup>1</sup> H-NMR in HIV Elite Controllers” .....	73
3.- Tercer treball: “Serum glycoproteins A and B assessed by <sup>1</sup> H-NMR in familial hypercholesterolemia” .....	83
<u>VII RESUM DE RESULTATS</u> .....	96
<u>VIII DISCUSIÓ</u> .....	98
<u>IX PERSPECTIVES DE FUTUR</u> .....	109

<u>X CONCLUSIONS</u> .....	<b>110</b>
<u>XI ANNEX</u> .....	<b>111</b>
<u>XII BIBLIOGRAFÍA</u> .....	<b>112</b>

## LLISTAT D'ABREVIACIONS

- <sup>1</sup>H-RMN** (*Proton Nuclear Magnetic Resonance*) Ressonància magnètica nuclear de protons
- AINE** AntiInflamatoris No Esteroides
- ANCOVA** Anàlisi de covariància
- ApoB** Apolipoproteïna B
- ApoE** Apolipoproteïna E
- ARN** Àcid Ribonucleic
- ASCVD** (*Atherosclerotic Cardiovascular Disease*) Malaltia cardiovascular ateroscleròtica
- Asn** Asparagina
- AUC** (*Area Under the Curve*) Àrea sota la corba
- CAC** Calci d'Artèria Coronària
- CE** Controladors d'elit
- CMV** Citomegalovirus
- CP** Controladors Persistents
- CT** Controladors Transitoris
- CV** Càrrega Viral
- DE** Desviació Estàndard
- DLCN** (*Dutch Lipid Clinic Network*) Xarxa holandesa clínica de lípids
- DNA** (*Deoxyribonucleic acid*) Àcid desoxiribonucleic
- ECLIA** (*Electrochemiluminescence Immunoassay*) Immunoassaig d'electroquimioluminescència
- EDTA** (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) Àcid diaminotetraacètic d'etilè
- ELISAs** (*Enzyme Linked Immunosorbent Assays*) Assajos immunoabsorbents lligats a enzims
- GalNAc** N-acetilgalactosamina
- GALT** (*Gut Associated Lymphoid Tissue*) Teixit limfoide associat a l'intestí
- GlcNAc** N-acetilglucosamina
- GlycA** (*Glycoprotein acetylation*)
- GM-CSF** (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) Factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags

**GRACE** (*Global Registry of Acute Coronary Events*) Registre global d'esdeveniments coronaris aguts

**HbA1c** Hemoglobina A1c

**HDL** (*High Density Lipoprotein*) Lipoproteïnes d'alta densitat

**HF** Hipercolesterolèmia familiar

**HHV-8** (*Human herpes virus 8*) Herpesvirus humà 8

**HLA-DR** (*Human Leukocyte Antigen – DR isotype*) Antigen leucòcit humà - Isotip DR

**HR** (*Hazard ratio*)

**HsCRP** (*High-sensitive C reactive protein*) Proteïna C reactiva d'alta sensibilitat

**HSH** Homes que tenen Sexe amb Homes

**I-FABP** (*Intestinal fatty acid-binding protein*) proteïna dunió d'àcids grassos intestinals

**ICAM-1** (*Intercellular adhesion molecule 1*) Molècula d'adhesió intercel·lular-1

**IISPV** Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili

**IL-** Interleuquina -

**IMC** Index de Masa Corporal

**IMT** (*Intima-media thickness*) Gruix íntima-mitja

**INF** Interferó

**INR** (*Immunological non responders*) No responedors immunològics

**IP-10** (*Interferon gamma-inducible protein 10*) Proteïna induïble per interferó gamma 10

**IR** (*Immunological Responders*) Responedors immunològics

**Kyn / Trp** (*Kynurenine / tryptophan*) Quinurenina / triptòfan

**LDL** (*Low-Density Lipoprotein*) Lipoproteïnes de baixa densitat

**LDLR** (*Low-Density Lipoprotein Receptor*) Receptor de lipoproteïnes de baixa densitat

**LPS** Lipopolisacàrids

**MACS** (*Multicenter AIDS Cohort Study*) Estudi de cohort multicèntric de la SIDA

**MCP1** (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) Proteïna quimioattractant de monòcits 1

**MESA** (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*) Estudi multiètnic de l'aterosclerosi

**MS** (*Mass Spectrometry*) Espectrometria de masses

**Neu5Ac** Àcid N-acetilneuramínic

**oxLDL** (*Oxidized low-density lipoprotein*) Lipoproteïnes de baixa densitat oxidades

**PAI-1** (*Plasminogen activator inhibitor type 1*) Inhibidor de l'activador del plasminogen tipus 1

**PCSK9** Proproteïna convertasa subtilisin / kexin 9

**PD-1** (*Programmed cell death protein 1*) Proteïna de mort cel·lular programada 1

**PECAM-1** (*Platelet endothelial cell adhesion molecule 1*) Molècula d'adhesió de cèl·lules endotelials plaquetàries 1

**PLWH** (*People living with HIV*) Persones que viuen amb el VIH

**PREVENT** (*Prevention of Renal and Vascular End-Stage Disease*) Prevenció de la malaltia renal i vascular terminal)

**PWV** (*Pulse Wave Velocity*) Velocitat de l'ona de pols

**RIAs** (*Radio ImmunoAssays*) Ràdio immunoassaigs

**RMN** Ressonància Magnètica Nuclear

**ROC** corba (*Receiver Operating Characteristic*) Característica operativa del receptor

**sCD14** (*Soluble CD14*) CD14 soluble

**sCD163** (*Soluble CD163*) CD163 soluble

**SDF-1** (*Stromal cell-Derived Factor-1*) Factor-1 derivat de cèl·lules estromals

**SIDA** Síndrome d'immunodeficiència adquirida

**SMART** (*Strategies for Management of Antiretroviral Therapy*) Estratègies de gestió de la teràpia antiretroviral

**SPSS** (*Statistical Package for Social Sciences*) Paquet estadístic per a ciències socials

**STAP1** (*Signal Transducing Adaptor Family Member 1*) Membre de la família de l'adaptador de transducció de senyal 1

**sTNFR1** (*soluble Tumor Necrosis Factor Receptor 1*) Receptor soluble 1 de factor de necrosis tumoral

**TAC** Tomografia Axial Computeritzada

**TAR** Teràpia Antiretroviral

**Tat** Transactivador transcripcional

**TF** (*Tissue factor*) Factor tissular

**TFH** (*T cells follicular helper*) Cèl·lules T cooperadores foliculars

**TIMP-1** (*Tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) Inhibidor tissular de les metaloproteinases-1

**TLR-4** (*Toll-Like Receptor 4*) Receptors tipus Toll 4

**TNF** (*Tumor Necrosis Factor*) Factor de necrosis tumoral

**TP** (*HIV-Typical Progressors*) Progressors típics

**Treg** (*Regulatory T cells*) Cèl·lules T reguladores

**VCAM-1** (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) Molècula d'adhesió de cèl·lules vasculars-1

**VHC** Virus de l'Hepatitis C

**VIH** Virus de la Immunodeficiència Humana

**VLDL** (*Very Low Density Lipoprotein*) Lipoproteïnes de molt baixa densitat

**VPH** Virus del Papil·loma Humà

**VSMC** (*Vascular Smooth Muscle Cells*) Cèl·lules musculars llises vasculars

**WHS** (*Women's Health Study*) Estudi de salut de la dona

## I JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

La inflamació mantinguda al llarg del temps o inflamació crònica, lluny de millorar la malaltia que la desencadena, fomenta i perpetua aquesta. En diverses malalties metabòliques, infeccioses i autoimmunes s'ha descrit una situació d'inflamació crònica que resulta ser el motor per a l'aparició de complicacions clíniques. En els últims anys, molts han estat els esforços per estudiar i entendre millor aquest procés. Diversos estudis identifiquen diferents molècules que formen part del procés inflamatori crònic com per exemple la proteïna C reactiva d'alta sensibilitat (hsCRP) o interleuquina 6 (IL-6) i s'han realitzat centenars d'assajos clínics per establir-les com a marcadors pronòstics de la malaltia. Tot i que aquests marcadors "tradicionals" han proporcionat un gran avanç en la predicció d'esdeveniments clínics, la gran complexitat etiopatogènica de la inflamació crònica fa que en moltes ocasions aquests resultin massa limitats, justificant la cerca de nous marcadors més robusts. Donat que la major part de les proteïnes de fase aguda que augmenten durant els processos inflamatoris son glicoproteïnes, el desenvolupament i ús de noves metodologies que les quantifiquen ha obert noves vies d'investigació en els darrers anys. Diferents estudis ja han demostrat avantatges de l'ús d'  $^1\text{H}$ -RMN respecte als marcadors inflamatoris tradicionals. Aquesta nova tècnica analitza en una sola determinació nombroses glicoproteïnes que participen en els processos inflamatoris, avaluant la inflamació d'una manera més global i no sols a partir d'un únic marcador. Donat que l'estudi de l'estat inflamatori utilitzant aquesta tècnica apunta a ser més precís i amb major capacitat predictiva, en aquest treball s'estudia àmpliament la inflamació crònica mitjançant  $^1\text{H}$ -RMN en tres grups de pacients on l'estat inflamatori té una forta implicació de forma directa en el seu pronòstic. S'avaluen les glicoproteïnes determinades per  $^1\text{H}$ -NMR per primera vegada en una població de PLWH immunodiscordants (no responedors), en una població de PLWH controladors d'elit i en un grup de pacients amb hipercolesterolèmia familiar heterozigota.

## II INTRODUCCIÓ

### 1.- INFLAMACIÓ CRÒNICA.

La resposta inflamatòria aguda és una situació imprescindible de defensa de l'organisme per fer front a les amenaces cap a l'hoste, com ara les infeccions o cèl·lules danyades. En aquest procés extremadament complex, participen i interaccionen diverses cèl·lules immunes a través de receptors de reconeixement de patògens [1], sintetitzant gran varietat de citocines inflamatòries que activen vies de senyalització cel·lular. Aquest procés, que alhora està regulat per diferents molècules, sol culminar amb l'arribada dels granulòcits que fagociten i eliminen microorganismes i restes de teixits [2].

La resposta inflamatòria pot tenir una duració major, essent la base de moltes malalties autoimmunes, metabòliques, infeccions cròniques i càncer. Durant les darreres dècades, nombroses investigacions han estudiat els mediadors que causen respostes inflamatòries cròniques per tractar aquestes malalties [3].



## 2.- INFLAMACIÓ CRÒNICA EN PERSONES QUE VIUEN AMB EL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA (PLWH, *people living with HIV*) NO RESPONEDORS A TERÀPIA ANTIRETROVIRAL (TAR) I CONTROLADORS D'ELIT.

La història natural del virus de la immunodeficiència humana (VIH) és actualment ben coneguda, tant en aquells pacients que realitzen tractament antiretroviral (TAR) de manera adherent, com en aquells sense tractament. En aquests últims, s'identifica una disminució progressiva dels nivells de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> induïda per l'elevada replicació viral, que de manera gradual condicionarà un estat d'immunosupressió i, en últim lloc, la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) [4]. Aquesta evolució cap a l'estat de SIDA s'elimina en els pacients infectats sota tractament amb fàrmacs antiretrovirals (TAR), gràcies a la inhibició de la replicació viral i de la mort cel·lular amb la consegüent millora de la immunitat per un augment del recompte CD4<sup>+</sup> [5]. Per tant, en les últimes dècades s'ha aconseguit una millora dràstica en la supervivència d'aquests individus, amb una disminució significativa de la mortalitat relacionada amb la immunosupressió.

No obstant això, el tractament antiretroviral no suposarà una restauració completa de la salut. La major expectativa de vida actual s'associa amb un canvi en les causes de mort i ha posat de manifest en els darrers anys un augment en la incidència d'esdeveniments anomenats “no SIDA” en els pacients infectats pel VIH sota tractament antiretroviral [6], els quals es relacionen amb l'estat d'inflamació crònica de baix grau [7]. Aquests esdeveniments es tradueixen en forma de malalties cardiovasculars [8], malalties hepàtiques [9], renals [10] i diversos tipus de càncer [11]. El fet que aquestes patologies es presenten habitualment en població d'edat avançada, fa formular la hipòtesi de que la infecció per VIH confereix un estat “d'envelliment accelerat” [12]. La malaltia cardiovascular, per exemple, suposa fins a un 30% de la mortalitat en PLWH, la qual no es pot explicar exclusivament per l'augment dels factors de risc tradicionals en aquesta població [13].

## 2.1 Mecanismes generals d'inflamació crònica en PLWH.

La major prevalença d'esdeveniments no SIDA i un estat "d'envelliment accelerat" han estat clàssicament associats, als països desenvolupats, a una major incidència del factors de risc tradicionals que s'associen a l'estil de vida de les PLWH [14], tals com el tabaquisme o a altres condicions associades com la diabetis mellitus, la resistència a la insulina, la dislipèmia i la hipertrigliceridèmia, conjuntament a l'exposició perllongada a alguns fàrmacs antiretroviral [15].

Més recentment, diferents autors han vinculat la major incidència d'aquests esdeveniments a un estat d'inflamació crònica. La infecció pel VIH provoca indirecta i directament l'activació crònica del sistema immunitari adaptatiu i del innat, provocant un estat inflamatori de baix nivell però sostingut, que persisteix fins i tot després de controlar el virus amb teràpia antiretroviral [4]. Aquest estat inflamatori persistent ve determinat per un major nombre de cèl·lules T activades, a conseqüència de la replicació viral; monòcits inflamatoris (sCD14), marcadors inflamatoris i hipercoagulabilitat.

L'activació de les cèl·lules T s'associa als marcadors de superfície cel·lular que expressen la gran part de les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> en context de la resposta inflamatòria induïda pel VIH. No obstant, la resposta inflamatòria no es dirigirà específicament contra el VIH, sinó que gran part d'aquesta resposta és inespecífica amb una activació crònica de cèl·lules T inespecífiques que produeixen major rotació i mort d'aquetes amb el consegüent esgotament del sistema immunitari. A més, les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> activades són la diana del VIH, afavorint la replicació viral i per tant la progressió de la malaltia [16,17].

L'estat inflamatori preval en els adults infectats, tant els tractats com els no tractats, respecte a persones coincidents amb edat no infectades per VIH [10,18]. Els biomarcadors inflamatoris i de coagulació s'associen a un augment de morbiditat i mortalitat per totes les causes, al comparar el seu efecte pronòstic respecte a la població general [19].

A més, diferents treballs han associat la inflamació a l'esgotament de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> memòria del teixit limfoide del tracte gastrointestinal. El teixit limfoide associat a l'intestí (GALT, *gut associated lymphoid tissue*) conté una part molt important de tot el teixit limfàtic del sistema, amb funció de barrera immunològica als antígens exposats a la

mucosa [4]. La mucosa intestinal conté una elevada concentració de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> que expressen CCR5 susceptible al virus VIH. Durant la infecció aguda, el virus s'estén pel GALT, provocant la pèrdua de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i donant lloc a lesions del teixit epitelial [20], inflamació local, fibrosi i possiblement disbiosis intestinal [4]. El deteriorament de l'epiteli intestinal dona pas a una major translocació de productes bacterians a la circulació sanguínia [21], que arriben al fetge, contribuint a la disfunció hepàtica i a la reducció de l'eliminació d'aquests mateixos productes [22].

El pas de productes bacterians a través de la barrera intestinal, portarà a una situació d'immunoactivació amb producció de citocines pro-inflamatòries, afavorint el procés d'inflamació sistèmica de manera persistent [23]. Aquesta inflamació sistèmica representa un important motor de la patogènia de la malaltia i és parcialment responsable de l'esgotament dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> i les comorbiditats no SIDA relacionades amb el VIH [24]. Tant en la malaltia VIH no tractada i tractada, els marcadors plasmàtics de translocació microbiana com LPS (lipopolisacàrid component de la paret cel·lular de bacteris gramnegatius), sCD14 (coreceptor LPS amb activació de monòcits inflamatoris), I-FABP (proteïna d'unió d'àcids grassos intestinals i marcador d'apoptosi de les cèl·lules epitelials intestinals) i zonulina (disminuïda en resposta al dany de la barrera intestinal) s'han associat a la progressió de la malaltia [4]. La translocació bacteriana produeix un augment dels nivells de LPS que estimularà l'activació de monòcits, que secretaran CD14 soluble i altres molècules i citocines inflamatòries com el factor de necrosi tumoral (TNF) i interleuquina 1 (IL1). Els nivells de CD14 soluble i LPS es mostren elevats en la infecció per VIH respecte als no infectats, correlacionant-se ambdós positivament [23]. En els pacients sota TAR iniciada de forma precoç, es pot reduir el d'any d'aquest procés, però no de forma total [25]. S'ha observat una diferència en la replicació viral i recuperació de CD4<sup>+</sup> entre sang perifèrica i la mucosa intestinal a l'inici de TAR, objectivant que el descens en la replicació viral es produeix més ràpidament en sang perifèrica i més eficaçment quan s'inicia la teràpia de forma primerenca. No obstant, la recuperació de CD4<sup>+</sup> en mucosa és més lenta i independent del moment d'inici del TAR [26], el que porta a una manca de recuperació de CD4<sup>+</sup> en mucosa intestinal respecte als no infectats [27].

L'activació immune crònica també perjudica l'arquitectura dels teixits limfoides i mèdula òssia, de manera que contribueix al deteriorament de la reconstitució immune [21], com es desenvolupa en el següent apartat. D'aquesta manera, paradoxalment, es pot

considerar l'activació immune una força motriu important de la insuficiència immune progressiva [28] (Figura 1).

Finalment, els diferents mecanismes com la inflamació, els productes bacterians circulants al torrent sanguini, els lípids proaterogènics així com la dinàmica alterada del flux sanguini i diversos factors associats a la pròpia infecció pel VIH, promouran danys a l'endoteli i un augment dels factors d'adhesió afavorint l'arteriosclerosi. L'activació de la coagulació es desencadena a partir de la inestabilització i trencament de les plaques, produint l'oclusió trombòtica dels vasos i provocant danys als òrgans [4,29].

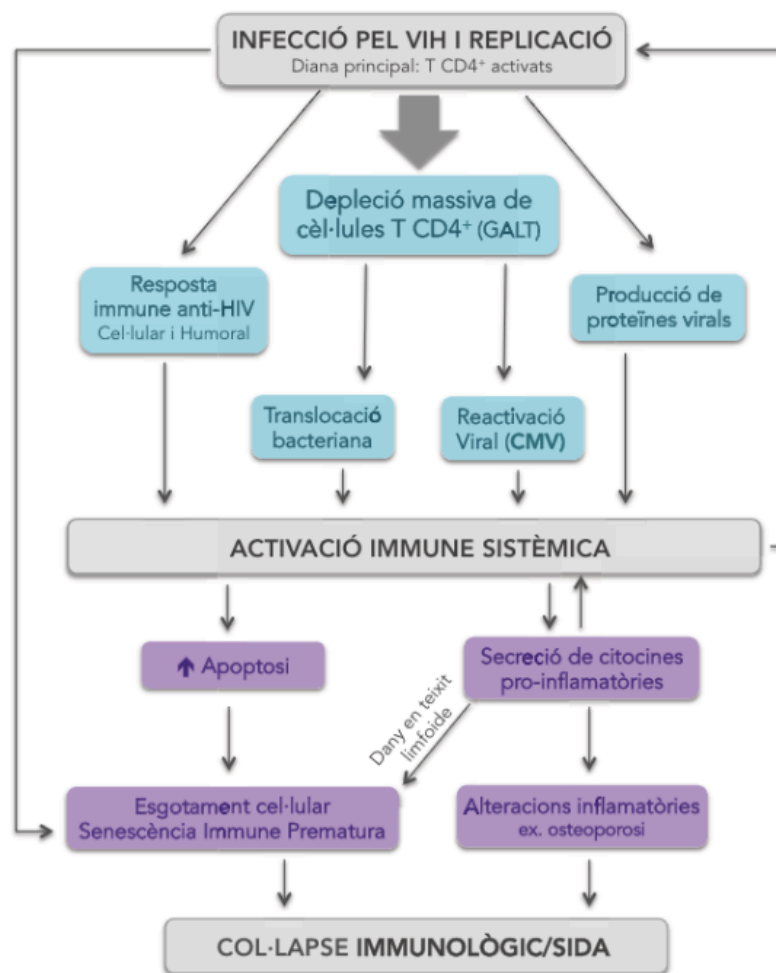


Figura 1. Esquema de les causes i conseqüències de la patogènesis en la infecció pel VIH-1.

Figura de la tesi doctoral d'Elisabet Gómez Mora <http://hdl.handle.net/10803/405712>  
adaptada de Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. J Pathol. 2008 Jan;214(2):231-41 [30].

## 2.2 Mecanismes d'inflamació crònica de baix grau en PLWH no responedors a teràpia antiretroviral (TAR).

Tot i la correcta adherència al TAR, no tots els pacients amb resposta virològica tindran de la mateixa manera una correcta recuperació dels nivells de CD4<sup>+</sup>. Fins a un 30% de pacients amb TAR [31] amb bon compliment i correcta supressió virològica no aconseguiran un bon nombre de CD4<sup>+</sup>, denominats immunodiscordants o no responedors immunològics (INR). La gran majoria d'aquest pacients amb una subòptima recuperació de CD4<sup>+</sup> són pacients que han iniciat tractament tard i amb recompte de CD4<sup>+</sup> baix a l'inici del tractament. Existeixen diverses definicions de la immunodiscordància basades en el nivell de cèl·lules CD4<sup>+</sup> o en descens de la relació CD4/CD8. D'entre d'altres definicions, aquests es cataloguen com aquells pacients en que els recomptes de CD4<sup>+</sup> no augmenten més de 50-100 cèl·lules / mm<sup>3</sup> per any de tractament [32]. No obstant, tot i les múltiples definicions que reben els no responedors immunològics, totes coincideixen en el baix recompte de limfòcits CD4<sup>+</sup> [33,34]. Tot i la correcta supressió viral, aquesta manca de recuperació de la immunitat, comportarà un pitjor pronòstic respecte als pacients amb correcte guany dels nivells de CD4<sup>+</sup> després de l'inici del TAR [5,31]. Es descriu un augment de la mortalitat en aquests individus, així com una major incidència dels esdeveniments SIDA i esdeveniments no SIDA [5], així com de la mortalitat [5,35].

Dintre de l'augment d'esdeveniments no SIDA en aquesta població, es descriu, entre d'altres, un augment de la mortalitat per càncer no associat a SIDA dintre de la cohort

D:A:D [36], principalment en aquells pacients amb més baixos nivells de CD4<sup>+</sup>, sent la mortalitat de 6/1000 persones a l'any en persones amb recomptes < 50 cel/μl i amb una disminució a 0.6 /1000 persones a l'any en els pacients amb recomptes majors de 500 cel/μl.

Donat l'augment de risc que comporta ser no responedor immunològic, en l'última dècada ha estat un grup d'estudi de gran interès, tractant d'identificar les causes que afavoreixen aquesta manca de millora del sistema immunològic en pacients sota tractament. S'han identificat diversos factors responsables d'aquest estat de immunodiscordança; es descriu una pitjor recuperació com més baixos són els nivells de CD4<sup>+</sup> a l'inici del TAR amb menys probabilitat d'assolir nivells dins de la normalitat posteriorment [37], malgrat una correcta supressió de la càrrega viral. A més, alguns resultats assenyalen que la persistència de CD4<sup>+</sup> molt baixos durant els dos primers anys de tractament (<250 CD4 cèl·lules / mm<sup>3</sup>), predisposarà a una persistència en aquest fracàs a més llarg termini [32]. En una cohort amb una mitjana de seguiment de 7.5 anys, van arribar a nivells òptims de CD4<sup>+</sup> (≥500 cèl·lules / mm<sup>3</sup>) el 95% de pacients que van iniciar TAR amb ≥300 cèl·lules / mm<sup>3</sup>. No obstant, el 44% que van iniciar TAR amb un recompte de cèl·lules CD4<sup>+</sup> <100 cèl·lules / mm<sup>3</sup> i el 25% amb recomptes entre 100 -200 cèl·lules / mm<sup>3</sup> no van aconseguir arribar a > 500 cèl·lules / mm<sup>3</sup> durant el seguiment [35]. Un recompte de cèl·lules CD4<sup>+</sup> persistentment baix durant el tractament s'associa amb un major risc d'esdeveniments relacionats amb la SIDA, esdeveniments no SIDA, així com de la mortalitat [5,35]. No obstant això, no es tracta d'una regla estricta, ja que alguns pacients amb recomptes baixos prèviament a la teràpia antiretroviral sí presenten la capacitat de restaurar el sistema immunològic, suggerint l'existència d'altres factors addicionals que participen en el control de la resposta immunodiscordant.

Altres factors associats a la resposta immunodiscordant són l'edat i l'ús de drogues per via parenteral [32]. També el sexe, on els homes presenten major risc de resposta immunològica no favorable al tractament [38]. D'altra banda, el ràpid descens de els CD4<sup>+</sup> previ a l'inici del TAR comportaria un major grau d'activació immune amb un pitjor pronòstic [31].

Els mecanismes fisiopatològics subjacents a la recuperació immunològica deficient durant la teràpia han estat objecte d'estudi en diferents treballs, i encara avui no estan del

tot clars, postulant un origen multifactorial. En el context de la infecció per VIH no tractada, l'activació immune és un predictor fort i independent de la pèrdua de cèl·lules CD4<sup>+</sup> i la progressió de la malaltia [39]. Aquesta mateixa activació immune també sembla estar present en el context d'una teràpia efectiva sent la base etiopatogènica en els individus no responedors [40]. Es reconeix un desequilibri entre la producció i destrucció de CD4<sup>+</sup> que ve mediat per un estat d'inflamació i d'activació immune crònica. De manera molt simplificada, dos principals mecanismes desencadenen una deficient recuperació immunològica: la producció deficient de cèl·lules *de novo* i l'excés de destrucció dels CD4<sup>+</sup> existents.

Com a condicionants de l'alteració de la producció, la inflamació potenciarà una alteració en els progenitors de la medul·la òssia i timus que ve mediat per un augment de la fibrosi tissular i dany estructural a nivell d'aquests òrgans afectant la producció *de novo* de cèl·lules T [41]. La disfunció hematopoètica sol normalitzar-se després de l'inici del TAR, però en els individus no responedors s'observa un esgotament de la medul·la òssia amb una producció reduïda de cèl·lules CD34<sup>+</sup> (cèl·lules precursors de la medul·la òssia) així com apoptosi de les cèl·lules progenitores. Del teixit limfàtic depèn la homeòstasi i supervivència del limfòcit T. Durant la infecció aguda per VIH, hi ha un marcat descens dels limfòcits CD4<sup>+</sup> a causa de diferents mecanismes (piroptosis, apoptosi cel·lular i efecte citopàtic directe del virus). A llarg termini, hi ha una alteració de l'arquitectura ganglionar que comporta la mala interacció entre limfòcits T amb les cèl·lules dendrítiques (que genera la resposta innata-adaptativa i la secreció de citocines com IL-7, necessàries per a la supervivència de la cèl·lula T) [42] i una alta infecció dels limfòcits CD4 fol·liculars (TFH) determinants per a la maduració de les cèl·lules B [43]. A més, el teixit limfàtic és un dels principals reservoris virals anatòmics del virus (òrgans de replicació viral independentment de romandre indetectable en sang perifèrica) [44], el que porta a la replicació activa persistent en el teixit, afavorint l'aparició de fibrosi. L'activació immune crònica i la inflamació present en els pacients infectats per VIH, és considerat el mecanisme precursor de la fibrosi i el dany tissular d'aquests òrgans hematopoètics i que també afectarà el teixit limfoide [45]. A nivell perifèric fora dels òrgans limfoides, els individus immunodiscordants presenten activació immune persistent major (amb expressió de marcadors d'activació com HLA-DR, CD45R0 i CD38 en cèl·lules T CD4 i CD8), que no es normalitzarà completament amb el TAR i fins i tot en situació de supressió viral. Això produirà una destrucció de CD4<sup>+</sup> perifèrics

per mecanismes de mort cel·lular [46] especialment dels limfòcits de memòria  $T_{CM}$  [47], mostrant-se majors nivells d'apoptosi dels limfòcits en individus no responedors respecte als responedors al TAR [48]. També es descriu un estat d'immunosenesescència cel·lular ( $CD28^{\cdot}CD57^{+}$ ) i esgotament cel·lular ( $CD4^{+}PD-1^{+}$ ) comportant una pèrdua de funció efectora i capacitat de proliferació de les cèl·lules de memòria sent més susceptibles a l'apoptosi [49], afavorida per l'estat inflamatori crònic. Tot plegat impedirà tant la recuperació quantitativa com qualitativa en els individus no responedors [48]. Diferents mecanismes perpetuaran aquest estat d'immunoactivació que retro-alimentarà aquest procés: proliferació homeostàtica en resposta a l'esgotament dels  $CD4^{+}$ , cèl·lules T reguladores disfuncionals (Treg, subconjunt de cèl·lules T  $CD4^{+}$  que suprimeixen l'activació de cèl·lules T locals mitjançant mecanismes directes i indirectes), coinfeccions, translocació bacteriana per alteració del teixit limfoide intestinal, estimulació antigènica persistent i / o replicació viral residual [5].

Atenent que l'estat d'inflamació crònica i la immunoactivació són el principal motor que induirà les alteracions esmentades prèviament i donarà lloc a esdeveniments no SIDA i a l'augment de mortalitat en aquesta població, molts estudis s'han centrat en identificar els marcadors inflamatoris en sang perifèrica que millor es relacionen amb aquets esdeveniments. D'aquesta manera, la identificació precoç dels individus en aquesta situació, podria tenir un impacte en la reducció de risc d'aparició d'esdeveniments.

### 2.3 Mecanismes d'inflamació crònica de baix grau en PLWH controladors d'elit.

Els controladors d'elit (CE) són un petit grup de PLWH que mantenen una càrrega viral circulant indetectable sense tractament antiretroviral, amb nivells inferiors a 50-75 còpies d'ARN / ml [50]. Aquesta població és un grup extremadament rar dins de les PLWH que representa molt menys de l'1% de la població infectada [51]. Els criteris més àmpliament acceptats per descriure els controladors d'elit, són la detecció d'anticossos positius contra el VIH en tècniques serològiques en individus sense ninguna teràpia antiretroviral en els 12 mesos previs i com a mínim tres determinacions plasmàtiques d'ARN de VIH per sota del límit de detecció [52]. Aquesta característica excepcional fa que els CE siguin un bon model patogen pel control funcional del VIH [53]. La comprensió dels mecanismes de



control de la càrrega viral del VIH en aquesta població pot proporcionar informació rellevant de cara a les estratègies vacunals i de noves vies terapèutiques basades en la immunitat per a aquelles persones on la infecció progressa de forma típica [52]. Esclarir els mecanismes que porten a aquests individus a controlar la infecció suposaria un gran avenç per frenar l'epidèmia mundial del VIH, tant per frenar la progressió cap a l'estat de SIDA com per disminuir el risc de transmissió.

Els factors epidemiològics que influeixen en un control de la càrrega viral no han estat clarament identificats. No s'ha identificat relació en la condició de controlador d'elit i la via d'adquisició [54], el gènere, raça, la ubicació geogràfica o el subtipus virals [52]. S'ha descrit una predisposició menor a la primoinfecció simptomàtica en els controladors d'elit respecte als progressadors típics (TP) [55], el que suggeriria que la interacció entre el virus i l'hoste que portarà a un control persistent de la replicació viral ja s'estableix des dels inicis de l'adquisició del virus [56].

Els mecanismes subjacents que contribueixen al control espontani identificats fins al moment inclouen factors hostes i virals [53]. Les dades conegudes fins ara indiquen una alta associació entre el control de virus i la presència en major freqüència a l'hoste de certs al·lels descrits com a protectors HLA; haplotips de protecció CCR5 (CCR5\_H + / H, al·lels HLA-B (B \* 2705, \* 5701, \* 5101, \* 1302,) i la variant HLA-C-35 rs9264942 [57].

A diferència dels PLWH progressors ràpids (que presenten una replicació viral alta donant pas a virus moderns), els CE mantenen genotips ancestrals del virus (similars al virus transmès, sent defectuosos o menys aptes) [58], tot i la presència d'una replicació viral residual [59]. La manca d'evolució viral, reflecteix el control estricte de la replicació viral. D'aquesta manera, els PLWH amb virus ancestrals tenen un augment de "virus protectors" de l'hoste en comparació amb els que porten virus moderns [57]. Altres característiques virals descrites associades als CE han estat la reducció de la capacitat de replicació dels virus quimèrics amb gag-proteasa en comparació als individus infectats no controladors [60] i una capacitat d'entrada reduïda de les glicoproteïnes de l'embolcall del virus [61].

El nombre de cèl·lules T activades és major en els VIH sense control espontani de la replicació viral i menor en individus sans i PLWH tractats respecte als CE [62]. A més, la resposta immunològica seria més adequada en els CE respecte als no controladors, ja que presenten major nombre de de cèl·lules T específiques del VIH [63]. Els CE presenten un elevat nivell de diferenciació de cèl·lules T CD8<sup>+</sup> que expressen elevades quantitats d'HLA-DR [63], presentant aquestes cèl·lules respostes més ràpides i polifuncionals, respostes de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques del VIH conservades de manera característica que mostren resistència relativa intrínseca al VIH [64], i una disminució de molècula de superfície PD-1 que marca les cèl·lules T esgotades [65,66]. D'entre els CE, un percentatge menor al 10% presentarà una pèrdua progressiva de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> associada amb activació marcada de cèl·lules T CD8<sup>+</sup>, fins i tot en absència de replicació viral detectable [62]. Aquest fet s'ha descrit com un exemple que reforça la inflamació com a mediador independent de l'esgotament immunitari i la immunoactivació [52].

Tot i que les característiques anteriors descrites corresponen als CE amb un fort control virològic i immunològic al llarg del temps (anomenats controladors persistents, CP), els controladors d'elit són una població heterogènia on alguns CE perden el control viral al llarg del temps, coneixent-se com a controladors transitoris (CT) [67]. D'aquesta manera, la definició de controlador d'elit persistent quedaria més reduïda i fent referència de forma exclusiva a aquells amb un seguiment major a 10 anys on la càrrega viral del VIH es manté per sota dels nivells de detecció en absència de blips i amb un recompte de limfòcits T CD4 +> 500 cèl·lules / mm<sup>3</sup> [68].

Els estudis centrats en controladors transitoris (CT) han identificat una baixa polifuncionalitat de les cèl·lules T específiques de Gag, una elevada diversitat viral [67], citocines inflamatòries elevades i alteració de l'homeòstasi de les cèl·lules T [69]. Els factors que determinen la pèrdua del control viral segueixen no estan ben establerts en l'actualitat. La majoria dels estudis realitzats han sigut transversals sense poder avaluar la progressió virològica ni la heterogeneïtat dels CE [57,70] i d'altres longitudinals on sols s'identifica la replicació viral de baix grau com a mecanisme de pèrdua del control viral [71]. Pernas et al. en un estudi centrat en la identificació de factors predictors de la pèrdua del control virològic, van identificar nivells més baixos de polifuncionalitat de les

cèl·lules T específiques de Gag del VIH, una major activació de les cèl·lules T i alts nivells de citocines proinflamatòries abans de la pèrdua de control, com a predictors [67].

Les dades més recents, apunten que tot i tenir la condició de controlador d'elit, l'estat inflamatori subclínic a causa de la pròpia infecció pel VIH comporta un risc augmentat d'esdeveniments no SIDA [72] encara que a taxes més baixes que els PLWH que no controlen espontàniament el virus [73]. De la mateixa manera, els CP mostren nivells inferiors d'inflamació sistèmica,[67] en comparació als CT havent-se descrit diferències en el perfil proteòmic associat als nivells d'inflamació [74]. Diferents marcadors inflamatoris relacionats amb l'augment de la morbiditat van ser superiors en els CE respecte a PLWH tractats amb TAR, [62] sense associar-se a disminució del nombre de CD4<sup>+</sup> o a la virèmia residual [75]. La coinfecció del VHC ha estat un dels principals factors associat als esdeveniments no SIDA tant durant el període de control espontani com després de la pèrdua de control [73]. L'augment de la incidència d'esdeveniments no SIDA en els CE, proporciona el fonament darrere de la recomanació d'iniciar TAR en aquesta població, dirigida a revertir aquest estat inflamatori subclínic [73].

#### 2.4 Revisió dels marcadors tradicionals com a marcadors inflamatoris i de pronòstic en PLWH.

Tal com es descriu més extensament en apartats anteriors, els PLWH presenten un estat inflamatori de baix nivell però persistent que perdura després de controlar la càrrega viral amb tractament [76]. Aquest estat inflamatori es caracteritza per presentar un major nombre de cèl·lules T activades, monòcits inflamatoris i citocines inflamatòries que estan present en adults infectats pel VIH no tractats i tractats, respecte a adults no infectats [7], promovent canvis fisiopatològics associats a l'edat (*inflammaging*) [77,78]. Els biomarcadors inflamatoris i de coagulació s'associen amb augments significatius de morbiditat i mortalitat per causes no SIDA [76], en comparació amb els seus efectes pronòstics en la població general [4]. Resulta una consideració important el temps d'inici de la teràpia des de la primoinfecció donat que menors recomptes de CD4<sup>+</sup> en el pacient nadir s'associen amb una major activació immune durant la supressió viral intervinguda pel TAR. Estudis posteriors demostren que els individus que inicien TAR poc després de

la primoinfecció (dins dels primers 6 mesos) aconseguixen un menor punt de fixació d'activació immune que aquells que retarden la teràpia, però aquesta es mantindrà anormalment elevada en comparació als controls d'alt risc no VIH [7].

Els nivells elevats de biomarcadors associats a la inflamació i la coagulació, inclosa la interleucina-6 (IL-6), dímer-D i la proteïna C reactiva d'alta sensibilitat (hsCRP), s'han associat amb un major risc de malaltia cardiovascular, càncer i mortalitat per totes les causes, sent els biomarcadors més àmpliament estudiats [79].

IL-6 és una citocina proinflamatòria alliberada per diferents cèl·lules, particularment monòcits i macròfags. Els PLWH presenten una mitjana d'elevació en la concentració de IL-6 del 50% respecte als adults no infectats ben aparellats [80]. El dímer-D es un marcador resultant dels productes produïts durant la lisi del coàgul [81]. La replicació viral augmenta els nivells de dímer-D [82], amb una reducció d'aquest sota TAR [83] tot i que no assoleix els valors de preinfecció [59]. Els nivells de dímer-D es correlacionen amb sCD14 i sCD163 [84] i també s'associen amb IL-6 i hsCRP. La hsCRP es sintetitzada al fetge i en menor mesura al teixit adipós sota la estimulació de diferents citocines com IL-6, IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$  secretades pels macròfags als teixits danyats [85], alliberant-se a la circulació, afavorint el dany a les cèl·lules endotelials vasculars, entre altres [86]. CD14 soluble (sCD14) i sCD163 són marcadors d'activació del monòcits i macròfags. Tots dos es mostren elevats en la malaltia del VIH tractada i no tractada i són predictius de morbimortalitat [4].

Les elevacions d'aquests biomarcadors disminueixen amb la TAR, però molts pacients mantindran nivells persistentment elevats en comparació amb la població general, suggerint que la replicació viral no és l'únic que contribueix a la inflamació crònica en PLWH [10]. D'aquesta manera els últims estudis han postulant inclús que les elevacions d'aquests biomarcadors poden tenir una base genètica parcial, tot i que no s'han estudiat clarament en aquesta població [79].

Un dels primers estudis de tipus prospectiu on es va analitzar els nivells IL-6 i dímer-D (*Strategies for Management of Antiretroviral Therapy, SMART*), va relacionar aquets marcadors amb la morbiditat i la mortalitat en pacients tractats [82] evidenciant-se també en altres treballs posteriors [87] d'entre els que es considera IL-6 superior a hsCRP i dímer-D en la predicció d'esdeveniments no SIDA i mortalitat [88]. També s'han descrit

posteriorment en diferents estudis elevacions de biomarcadors d'inflamació com fibrinogen i hsCRP associats a major mortalitat als 5 anys [19]. La determinació de receptor soluble 1 de factor de necrosis tumoral (sTNFR1), el rati quinurenina / triptòfan, la hsCRP i el dímer-D van predir fortament la mortalitat inclús després de l'ajust en funció del recompte de CD4<sup>+</sup> així com també ho van fer la proteïna d'unió d'àcids grassos intestinals i nivells de zonulina-1 (marcadors plasmàtics d'integritat de la barrera epitelial de l'intestí) i nivells de sCD14 (marcadors de d'activació dels monòcits) [89–91].

Un treball publicat a l'any 2018, relaciona nivells de IL-6 i dímer-D amb condicions potencialment mortals no SIDA tals com dependència / limitació funcional importants i requeriment de hospitalització / teràpies mèdiques freqüents. Aquests van ser més prevalent que els esdeveniments SIDA, la malaltia cardiovascular i els càncers no SIDA [77].

Els PLWH en la fase crònica de la malaltia presenten una disfunció endotelial i aterosclerosi subclínica més grans que els individus sans [92], associant-se a alts nivells de biomarcadors com ICAM-1, VCAM-1, E-selectina i P-selectina [93]. La infecció de cèl·lules endotelials condueix a una disfunció endotelial per l'alliberament de citocines per part de monòcits activats o directament per les proteïnes VIH gp120 i el transactivador transcripcional (Tat) mitjançant l'alteració de les vies de senyalització cel·lular [94]. Gp120 activarà les cèl·lules del múscul llis arterial per alliberar el factor de teixit procoagulant (TF, *tissue factor*), afavorint la coagulació. El VIH afavoreix alhora l'alliberament de TNF- $\alpha$  que augmenta l'expressió de PAI-1 (inhibidor de l'activador del plasminogen tipus 1) a les cèl·lules endotelials, augmentant el risc de trombosi [95].

PLWH presenten major expressió de CD36 i TLR4 (*toll-like receptor 4*) en monòcits amb majors nivells de lipoproteïnes de baixa densitat oxidades (oxLDL) [96], que son captades de forma no regulada per les cèl·lules d'escuma afavorint l'aterogènesi [97]. Tot plegat afavorirà l'alliberament de biomarcadors com ara IL-6, VCAM-1, selectines, fibrinògens, dímer-D, hsCRP i TF, accelerant l'arteriosclerosi [98].

Pels esdeveniments cardiovasculars, s'ha descrit associació entre aquests i diferents marcadors d'inflamació i coagulació. A l'any 2009, Triant et al, descriuen un risc relatiu notablement major d'infarts aguts de miocardi en pacients VIH, els quals s'associaven de manera independent a concentracions d'hsCRP elevades. D'aquesta manera, en comparació amb pacients amb hsCRP en valors normals i sense infecció per VIH, el risc d'infart es va incrementar més de 4 vegades entre els pacients amb VIH i hsCRP elevada

[99]. Treballs com el realitzat en pacients que havien participat en l'estudi SMART, van relacionar IL-6, hsCRP i dímer-D amb un augment d'esdeveniments cardiovasculars independentment d'altres factors de risc durant el seguiment a 29 mesos [81]. D'altres, conclouen que IL-6 i dímer-D elevats en els pacients VIH reflecteixen una inflamació i coagulació associats a un major risc d'esdeveniments cardiovascular mortal i un major risc de mort després d'un esdeveniment cardiovascular no mortal [100]. Un altre estudi anterior va associar els esdeveniments cardiovasculars a factors de risc tradicionals (tabaquisme, dislipèmia, hiperglucèmia i la història familiar) i a diferents marcadors inflamatoris (dímer-D, sVCAM-1, TIMP-1 i factor de teixit soluble) però no es va trobar associació amb hsCRP [101]. Una revisió dels estudis realitzats sobre hsCRP i esdeveniments cardiovasculars, va trobar documents amb associació significativa i d'altres que mostraven absència d'associació destacant la heterogeneïtat entre els estudis. No obstant, aquest estudi conclou que les evidències globals donen suport a la hsCRP com un marcador de predicció de risc cardiovascular en PLWH.

El càncer, s'ha convertit en la principal causa de mort en PLWH amb un augment de la incidència d'alguns càncers en comparació amb la població general [102]. En els pacients que desenvolupen càncers relacionats amb la SIDA o aquells pacients diagnosticats en fases finals de la infecció pel VIH i en estat de immunosupressió avançada, les infeccions víriques es reconeixen com a principal inductor neoplàsic, tals com el sarcoma de Kaposi associat amb HHV-8, el càncer uterí cervical associat amb el virus del papil·loma humà (VPH) oncogènic i limfoma no-Hodgkin associada amb Epstein-Barr. Mentre la incidència d'aquets càncers disminueix, actualment els casos de càncers no relacionats amb la SIDA augmenta gràcies a la major expectativa de vida, al igual que en la població general [102].

Diversos motius s'han postulat sobre els mecanismes mitjançant els quals la infecció pel VIH augmenta el risc de càncer. Una major prevalença en pacients VIH dels factors tradicionals de risc de càncer (tabaquisme, consum d'alcohol...) sembla jugar un paper important [103]. En l'era de teràpia antiretroviral d'elevada potència, la incidència de càncer no relacionat amb la SIDA és més alta entre els infectats pel VIH que els pacients no infectats pel VIH, ajustant-se per edat, raça i sexe [104].

Mes recentment, s'han associat les vies activades d'inflamació i coagulació amb l'augment del risc de càncer durant la infecció pel VIH. En un estudi, aquesta associació es va descriure més forta per a la IL-6 (HR 1.38, P <0.001) i va persistir després d'excloure

el càncer precoç. També es va trobar relació entre nivells de augmentats d'hsCRP i dímer-D amb incidència de càncer, tanmateix, només la IL-6 (HR 1.29, P = 0.003) es va associar amb el risc de càncer quan tots els biomarcadors es van considerar simultàniament [105].

La infecció pel VIH s'associa també a un major risc de trombosi. Els LPS i productes bacterians que travessen la barrera intestinal afavoreixen l'estat inflamatori i l'activació de monòcits amb major expressió de factors procoagulants com tromboplastina [76]. In vitro, els LPS i la flagel·lina es van correlacionar amb els nivells de càrrega viral en plasma, índex d'activació immune, nivells de CD14 soluble i nivells de dímer-D [84]. També hsCRP i altres biomarcadors s'han vist implicats en el desenvolupament de trastorns neurocognitius associats al VIH [106].

Molts altres marcadors inflamatoris han estat estudiats, com ara citocines IL-10, IL-15, IP-10 i interferó- $\alpha$ . També es descriuen augments plasmàtics de MMP1, ADA, CD8A, CST5, 4E-BP1, SLAMF1 i CCL23, i nivells inferiors de NT3, TRAIL i sCD5 en PLWH tractats respecte als controls sans [78].

### 2.5 Revisió dels marcadors tradicionals com a marcadors inflamatoris i de pronòstic en PLWH no responedors a teràpia antiretroviral (TAR).

Com ja s'ha mencionat extensament en apartats anteriors, la inflamació crònica i immunoactivació són un important desencadenant de la immundiscordança, que alhora augmenta la incidència de mortalitat i dels esdeveniments no SIDA en els individus immunodiscordants d'entre els PLWH [107]. Els individus no responedors immunològics (INR) presenten una patogènia encara no ben caracteritzada, descrivint-se fins al moment en una combinació d'inflamació perifèrica, danys de la mucosa intestinal amb dany immunitari local i d'altres factors que potencien aquest procés (replicació de virus de baix nivell en els teixits, reactivació intermitent de copatògens, trànsit de productes bacterians al torrent sanguini per la pèrdua de integritat de la barrera intestinal i immunoregulació disfuncional) [5]. Caracteritzar aquests mecanismes és essencial i establir biomarcadors inflamatoris específics del fenotip INR pot ser clau per la seva identificació primerenca de cara a establir estratègies terapèutiques. En el darrer apartat s'ha exposat l'associació dels marcadors inflamatoris en PLWH amb mortalitat i esdeveniments no SIDA. El

nombre de estudis enfocats a la identificació d'individus immunodiscordants mitjançant biomarcadors és més limitat. En aquest apartat, es realitza una revisió dels marcadors inflamatoris més àmpliament estudiats per a la identificació de individus no responedors, tot i que són pocs els treballs que estableixen de forma clara quins biomarcadors són predictius d'immunodiscordança.

El percentatge de co-expressió superficial dels antígens d'activació HLA-DR i CD38 en cèl·lules T CD8<sup>+</sup> (activació CD8) s'ha identificat com a predictor de la progressió de la malaltia durant la infecció per VIH no tractada [108]. Rousseau et al. en l'any 2021 han identificat en els INR major percentatge d'activació de CD8 respecte als responedors al TAR, tot i que la proporció d'aquestes cèl·lules que expressaven HLA-DR no es va incrementar en els INRs respecte als responedors [109]. A més, es va veure un augment de cèl·lules T CD4 que expressen  $\alpha 4\beta 7$  + (integrina que intervé el dany de les cèl·lules T a la mucosa intestinal) i un augment de la proporció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> que expressen HLA-DR en el grup INRs. Per tant, en aquest estudi, l'expressió HLA-DR (definit com a marcador d'activació immune), sols va augmentar en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> però no en les cèl·lules T CD8 + del grup INR, suggerint que el fenotip INRs es caracteritza per l'activació del CD8 i per l'alteració immune de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>.

En quant als marcadors plasmàtics, VCAM va ser l'únic que es va mostrar més elevat al plasma en els INRs respecte als responedors a TAR, sense trobar associacions entre el fenotip dels INRs i les concentracions d'hsCRP, IL-6, dímer-D o d'altres biomarcadors (Kyn / Trp, TNF, IFN $\gamma$ , IL-8, sCD14, I-FABP, MCP-1, ICAM o CD8% HLA-DR +)[109].

Marcial García et al. determinen els polimorfismes en gens IFN $\gamma$  i IL-19 amb la probabilitat de no aconseguir una recuperació immune òptima en pacients amb VIH que comencen TAR amb cèl·lules T CD4 <200 cèl·lules /  $\mu$ L. [110].

Diferents treballs han avaluat interleucina-7 (IL-7) per a la predicció de la immunodiscordança. IL-7 i el seu receptor (IL-7R) format per una cadena  $\gamma$  comuna (CD132) i una cadena  $\alpha$  específica de la IL-7R (CD127), son fonamentals per a l'homeòstasi dels CD4<sup>+</sup> ja que estimulen la seva proliferació i la seva producció *de novo*.



Altres estudis han avaluat aquests marcadors per a la recuperació de CD4<sup>+</sup> [111], sense poder considerar-los predictors de la reconstitució immune incompleta [34].

IL-7 presenta una dificultat d'accés al teixit limfoide per la fibrosi i atròfia que aquest presenta, estant en relació amb l'expressió d'IFN de tipus I i la disminució de l'expressió d'IL-7R induïda per IL-1 i IL-6, portant a la mort cel·lular i a la reducció de la timopoiesi [112]. IL-6 es va veure augmentada en individus no responedors previ a l'inici del TAR, juntament amb un augment de Treg i expressió de Ki67 i CD95 en cèl·lules T CD4[113]. Per tant, IL-1 i IL-6 indueixen mecanismes que porten a la falta de recuperació de cèl·lules T.

## 2.6 Revisió dels marcadors tradicionals com a marcadors inflamatoris i de pronòstic en PLWH controladors d'elit.

Tot i mantenir una supressió espontània de la replicació viral, els EC presenten nivells més elevats de marcadors inflamatoris respecte als PLWH tractats i respecte a individus no infectats. Li et al. descriuen l'augment de sCD14, IFN - $\gamma$ , IP-10, IL-4, sCD40L i GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) en els CE respecte als VIH tractats i controls sans [75]. Altres treballs van mostrar nivells elevats de LPS i monòcits CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> proinflamatoris en CE [62]. Jacob et al, van identificar quatre citocines elevades en CE (CCL14, CCL21, CCL27 i XCL1) respecte a individus no controladors i individus PLWH sota TAR. També es va veure augmentat SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*) respecte als no controladors [114]. Aquestes citocines als CE podrien activar les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i induir resistència al virus a les cèl·lules diana. sCD14, sCD163 i CXCL10 s'han vist augmentats en CE respecte a individus no infectats (P = 0,001, P = 0,0002 i P = 0,04, respectivament) sense evidenciar-se en aquest estudi augments de hsCRP distintius entre els dos grups [115]. També es va identificar en aquest treball major prevalença significativa de placa coronària en els CE respecte a controls sans (78% vs. 42%, P < 0,05), i respecte als PLWH tractats, tot i que sense assolir significació estadística (78 % vs. 60%, P = 0,28). Un altre estudi amb major nombre de pacients, sí va identificar un augment de hsCRP en CE respecte als controls sans després d'ajustar per altres factors de risc, sense observar-se diferències amb els PLWH tractats. També es va identificar un

gruix d'íntima mitja carotídia (IMT) major en CE respecte als individus no infectats, tampoc assolint diferències significatives respecte als PLWH sota TAR [116].

D'altra banda, la identificació de biomarcadors per predir la pèrdua de control virològic permetria la identificació primerenca dels controladors transitoris (CT), intensificant les estratègies terapèutiques en aquests individus. Tot i que hi ha una carència d'estudis amplis per establir marcadors d'identificació de manera robusta, alguns estudis amb grups de pacients reduïts proporcionen dades emergents que permeten distingir entre CP i CT [68]. Com s'ha descrit prèviament, diversos factors a banda dels biomarcadors inflamatoris poder discernir entre els CP i els CT, com ara respostes més ràpides i específiques de les cèl·lules T, l'absència de blips virals, nivells de DNA proviral cel·lular més baixos i menor diversitat viral [72].

Nordel et al. identifiquen els nivells plasmàtics de IP-10 més baixos en CP i PLWH tractats respecte als CT i els progressadors típics sense tractament. No es van identificar diferències amb altres biomarcadors com hsCRP, IL-6, MCP1, TNF $\alpha$ , sCD14, sCD163 o IL10 [69]. Al 2016, un estudi que avaluava els esdeveniments no SIDA en els controladors d'elit respecte als pacients sense control espontani del virus, van identificar un augment d'esdeveniments cardiovasculars en el període posterior a la pèrdua del control viral en els CE. No es van observar diferències significatives entre hsCRP,  $\beta$ 2-microglobulina i dímer-D entre els controladors i els no controladors [73]. Posteriorment, Casado et al. al 2020, publiquen un estudi de les característiques clíniques, virològiques i immunològiques de controladors d'elit sense progressió de la malaltia durant més de 25 anys (rebut el nom de controladors d'elit excepcionals). Van identificar en aquesta subpoblació de controladors d'elit al·lèls protectors de l'hoste, una resposta immunitària específica (cèl·lules T CD8 + Gag) amb elevada polifuncionalitat i nivells baixos de DNA del VIH, així com virus poc competents per a la replicació amb poca evolució viral i diversitat genètica en el gen *env* respecte a la resta de EC. A nivell de biomarcadors, aquests van presentar nivells més baixos d'hsCRP,  $\beta$ 2-microglobulina i dímer-D que els PLWH sota TAR, comparables amb els individus sans. IL-6 i sCD163 van ser similars entre els controladors excepcionals i els PLWH tractats [53].

En l'estudi longitudinal de Pernas et al. per identificar els mecanismes que condueixen a la pèrdua de control virològic, identifiquen RANTES (*Regulated on activation, normal T*

*cell expressed and secreted*), proteïna secretada pels limfòcits T, com a biomarcador que millor va discriminar entre els dos grups sent un potencial marcador de control transitori.

Al 2019, una signatura proteòmica específica va analitzar les proteïnes implicades en les vies proinflamatòries. El factor de coagulació XI, l'alfa-1-antimotripsina, la Ficolina-2, la proteïna 14-3-3 i la proteïna d'unió a la galectina-3 es van considerar biomarcadors potencials predictius en els subjectes que perdrien el control sobre la càrrega viral [74]. També s'identifica un perfil metabòlic alterat, descrit per Tarancón-Díez et al. consistent en una funció mitocondrial alterada, augment de l'estrès oxidatiu, metabolisme glicolític aeròbic i augment de l'activació immune, abans de la pèrdua del control en els CT. Els nivells de metabòlits es van associar amb la polifuncionalitat de les cèl·lules T CD8<sup>+</sup>. Entre els diferents metabòlits estudiats, només la valina va discriminar els dos fenotips a les corbes ROC [117]. Es descriu també diferències en el lipidoma, mitjançant Liposcale, entre els dos fenotips moments previs a la pèrdua del control viral.

### 3.- INFLAMACIÓ CRÒNICA DE BAIX GRAU EN PACIENTS AMB HIPERCOLESTEROLÈMIA FAMILIAR (HF).

La hipercolesterolèmia familiar (HF) és una malaltia genètica, considerada la més freqüent amb una prevalença aproximada de 1:250 [118]. Es caracteritza per una herència autosòmica dominant que afecta els gens que codifiquen proteïnes relacionades amb el metabolisme del receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LDLR), la proproteïna convertasa subtilisin / kexin tipus 9 (PCSK9, una proteïna que indueix la degradació de LDLR), o l'apolipoproteïna B (ApoB) que codifica l'única apolipoproteïna inclosa en LDL [119]. Més recentment, s'han descrit altres gens addicionals com certes mutacions rares de l'*ApoE* que codifica per a l'apolipoproteïna E o l' STAP1, membre de la família adaptador 1 de transducció de senyal [120]. Conseqüència d'aquestes mutacions, les principals característiques de l'HF inclouen una elevació severa del colesterol LDL (LDL-c) donant lloc a la progressió de la malaltia cardiovascular arterioscleròtica (ASCVD, *atherosclerotic cardiovascular disease*) de forma prematura [121] i, amb menys freqüència, aparició de xantomes tendinosos i de arc corneal [120]. L'aterosclerosi és la causa etiopatogènica de malalties cardiovasculars, manifestant-se clínicament com infart cardíac, ictus o malalties vasculars perifèriques [119].

De forma molt resumida, el procés d'arteriosclerosi s'inicia quan les LDL penetren en l'endoteli arterial, quedant adherides a la matriu extracel·lular del subendoteli, modificant-se per processos com la oxidació i alliberant els seu colesterol. També les partícules residuals de les VLDL poden infiltrar la zona subendotelial alliberant lípids i induint lesió vascular. Com a conseqüència d'aquesta infiltració lipídica, les cèl·lules endotelials secreten diferents molècules afavorint el reclutament de monòcits que es diferenciaran en macròfags proinflamatoris i altres cèl·lules [122]. Els macròfags iniciaran l'acumulació de lipoproteïnes modificades formant cèl·lules escumoses que proliferen a l'intima amb augment de l'activitat proinflamatoria i induint la migració de cèl·lules musculars llises vasculares (VSMC) que inicien la capa fibromuscular de la placa [98]. El creixement adequat de una càpsula fibromuscular permet certa estabilització de la lesió. Per altra banda la necrosi / apoptosi dels macròfags per acumulació excessiva de colesterol i la secreció d'enzims proteolítics com les metal·loproteïnases incrementaran el nucli necròtic debilitant la capa fibrosa. Això afavorirà el trencament de la placa i la formació de trombus que donaran lloc als esdeveniments isquèmics [119].

La incidència d'ASCVD en els individus amb fenotip HF és marcadament elevada respecte als individus normolipèmics; en prevenció primària es registra una incidència de 14.9/1000 en HF vs. 7.1/1000 anys-persona en normolipèmics amb una incidència de d'ASCVD en prevenció secundària als HF de 89.7/1000 anys-persona. Aquest risc excessiu és notablement més alt en individus joves, tot i el tractament generalitzat amb estatines. L'excés de risc de malaltia coronària, en pacients menors de 35 anys, va arribar a 16 vegades en prevenció primària i 6 vegades en prevenció secundària [123]. La incidència de malaltia cardiovascular va ser menor en persones HF registrada en l'estudi SAFEHEART on es recull una cohort espanyola amb 2404 HF diagnosticats genèticament. Descriuen una incidència d'ASCVD en prevenció primària i secundària de 5,6 i 43 per 1000 anys-persona, respectivament [124]. La menor incidència observada en aquesta cohort ve justificada pel diagnòstic genètic dels participants, que permet un abordatge terapèutic més temprà i intensificat.

La prevalença de HF és superior entre els pacients afectes d'ASCVD detectant-se en el 8% dels pacients amb malaltia coronària establerta i augmentant fins un 20% en els casos on es presentava de forma precoç, segons es recull en l'estudi EUROASPIRE IV [125], pel que es tracta d'una patologia infradiagnosticada. No obstant, la teràpia amb estatines ha modificat la història natural dels individus HF sent la mortalitat d'aquests significativament superior que en l'era pre-estatinas [126]. El tractament amb estatines mantingut al menys 5 anys i iniciat en edats primerenques disminueix la incidència d'ASCVD a la meitat [127]. L'excés de risc d'ASCVD és especialment notori en persones joves, on en absència d'altres factors de risc cardiovasculars, el risc es veu significativament augmentat en comparació a la població normolipèmica [123].

### 3.1 Mecanismes d'inflamació crònica de baix grau en població HF.

Clàssicament, la recerca de la patologia dels HF ha estat centrada en el perfil lipídic dels mateixos, ja que la hipercolesterolèmia és el principal factor causant d'aterogènesi. No obstant, l'aterogènesi presenta un important component inflamatori caracteritzat per la penetració de diverses cèl·lules (monòcits i cèl·lules T) en la lesió endotelial que alhora

secreten diferents citocines que modulen el creixement de la lesió i la seva estabilitat. Per tant, la hipercolesterolèmia i la inflamació són dos processos fortament implicats en desenvolupament de l'arteriosclerosi [128], assenyalant l'aterosclerosi com una malaltia inflamatòria crònica on la inflamació indueix els canvis fisiopatològics durant la iniciació i el desenvolupament de l'aterosclerosi [129].

Des de fases inicials del desenvolupament de l'arteriosclerosi, l'activació de les cèl·lules endotelials (com s'ha descrit prèviament) produeix l'expressió de diferents molècules que atrauran els monòcits i els limfòcits, la proteïna quimioatracent monocitària-1 (MCP-1), la molècula d'adhesió intercel·lular-1 (ICAM-1), la molècula d'adhesió vascular-1 (VCAM-1), IL -8, la selectina E, la selectina P, i d'altres [130]. En aquest procés a més de les diferents cèl·lules que hi participen, també ho fan diferents citocines (IL), molècules d'adhesió i factor de necrosi tumoral (TNF- $\alpha$ ) [131]. També en l'arteriosclerosi en fases avançades les citocines inflamatòries juguen un paper important al travessar la paret del vas junt amb els macròfags, secretant metal·loproteïnases de matriu que degraden la matriu extracel·lular de la placa, afavorint el seu trencament[132].

Diversos estudis realitzats en HF han corroborat el paper que juga la inflamació en l'evolució de les malalties vasculars en els pacients amb HF. En subjectes amb HF, juntament amb la inflamació, l'activació endotelial i l'estrès oxidatiu també s'han caracteritzat com a mecanismes subjacent de l'aterogènesi en el desenvolupament de malalties cardiovasculars prematures [133,134]. Per tant, és necessari ampliar l'estudi d'aquesta patologia des d'un punt de vista més global més enllà de l'estudi del metabolisme lipídic.

### 3.2 Revisió dels marcadors tradicionals com a marcadors inflamatoris i de pronòstic en població HF.

Diferents citocines proinflamatòries i molècules d'adhesió implicades en el desenvolupament de l'arteriosclerosi s'han estudiat com a predictors d'esdeveniments cardiovasculars.

L'hsCRP es considera actualment un marcador predictiu d'esdeveniments cardiovasculars. En població general, els nivells de CRP es relacionen de forma independent amb el risc de mortalitat per causa cardiovascular [135]. Per tant, es considera un marcador d'inflamació, i de desenvolupament i progressió de l'aterosclerosi. HsCRP no està present en la paret dels vasos sans, podent-se detectar en aquests ja des de les primeres fases de l'aterogènesi [136]. També IL-6 regula la resposta inflamatòria en fase aguda i crònica [137]. Els nivells de IL-6 es mostren més elevats en pacients amb malaltia coronària respecte als individus sans, augmentant els seus nivells a major afectació coronària [138].

Les molècules d'adhesió són proteïnes que mitjancen l'adhesió de la matriu entre cèl·lules. D'entre altres múltiples funcions, també participen en la inflamació dels teixits, les respostes immunes i la trombosi, presentant un paper destacat en la formació de l'arteriosclerosi [139]. Les famílies de molècules d'adhesió associades a l'aterosclerosi són les selectines (E-selectina, P-selectina i L-selectina), les integrines i la superfamília de la immunoglobulina (ICAM-1, VCAM-1 i PECAM-1). Els nivells de P-selectina s'han correlacionat positivament amb el grau de lesions de plaques d'aterosclerosi sent un indicador en pacients amb accident cerebral isquèmic [140]. VCAM-1 i ICAM-1 augmenten la inestabilitat de la placa [141] i s'han relacionat amb l'angiogènesi que es caracteritza per vasos fràgils, immadurs i permeables [142].

Els marcadors inflamatoris citats prèviament, també s'han identificat com a predictius en pacients amb HF.

En quant als marcadors en els pacients amb HF, ja al 2009 Real et al. estudien una cohort de 30 individus HF *versus* 30 individus normolipèmics identificant un augment de biomarcadors d'inflamació en els HF, com ara hsCRP, interleucina-1 (IL-1) i IL-6 [143],

que també s'ha evidenciat en individus homozigots [144]. En un altre treball l'any 2017, també es va identificar un augment de hsCRP així com ICAM-1 i E-selectina en individus HF respecte a normolipèmics [145].

A més, els nivells de hsCRP en pacients amb HF asimptomàtica s'han correlacionat amb els nivells de calci de l'arteria coronària en comparació amb un grup control [146], i correlacionats amb el gruix íntim-mitjà carotídia (IMT) [147] i la velocitat de l'ona de pols [148]. Altres estudis previs no van trobar una relació entre els nivells de hsCRP, ICAM-1 i E-selectina i dades de l'arteriosclerosi subclínica en pacients asimptomàtics de HF [149]. A més, hi ha resultats poc concloents sobre l'impacte independent dels biomarcadors de inflamació en les alteracions vasculars de la HF després d'ajustar-se per altres factors de risc cardiovascular [150]. Un estudi va mostrar una major disminució dels nivells d'hsCRP amb la teràpia amb estatina de major potència (Atorvastatina 80 mg *versus* Simvastatina 40 mg), trobant-se correlació entre la disminució dels nivells d'hsCRP i la disminució en la IMT [151], mentre que altres autors van descriure una disminució subtil i no significativa d'hsCRP en individus HF sota tractament amb Simvastatina (20-40mg/dia) [152]. En pacients amb HF, els estudis relacionats amb hsCRP són molt més escassos que en individus hiperlipidèmics no HF.

Donat el paper que desenvolupa la inflamació aguda en totes les etapes de la malaltia arterioscleròtica, les proteïnes de fase aguda, com l'hsCRP i el fibrinogen, i les citocines proinflamatòries, com la IL-6, han estat estudiades amb gran interès clínic com a marcadors sistèmics d'inflamació. Diferents treballs confirmen el vincle de forma independent entre les malalties cardiovasculars i mortalitat i aquests biomarcadors [133,153,154], semblant ser el més destacat l'hsCRP [155,156]. Ridker et al. en un estudi prospectiu en dones sanes amb menopausa, descrivia hsCRP, IL-6 i ICAM-1, entre d'altres, com a predictors del risc d'esdeveniments cardiovasculars futurs. Dels diferents marcadors estudiats, hsCRP va ser el predictor més significatiu del risc d'esdeveniments cardiovasculars [157]. Des de llavors, diversos altres estudis han confirmat que hsCRP és un marcador predictiu per a esdeveniments de malaltia cardiovascular tant en homes com en dones [158]. També diversos treballs mostren l'associació de nivells elevats d'hsCRP i major risc d'ictus, infart de miocardi i malaltia greu de les artèries perifèriques així com mortalitat [159,160]. L'any 2008, Ridker et al. estudien 17802 individus normolipèmics



(LDL < 130 mg/dl) de la cohort JUPITER amb nivells elevats d'hsCRP que inicien tractament amb Rosuvastatina 20mg/dia *versus* placebo. Rosuvastatina va disminuir en un 37% els nivells d'hsCRP i significativament la incidència d'esdeveniments cardiovasculars importants [161]. L'hsCRP s'ha establert com un biomarcador clínic del risc cardiovascular i la seva reducció s'ha associat amb la reducció del risc, tot i que s'està discutint el seu paper patogèn. L'estudi de Cantos va demostrar per primera vegada que la disminució de la resposta inflamatòria inicial en pacients amb un esdeveniment cardiovascular previ o una hsCRP elevada, per l'ús de Canakinumab, un anticòs monoclonal dirigit a IL-1-beta, condueix a una reducció significativa de les taxes d'esdeveniments cardiovasculars recurrents [162].

HsCRP presenta estabilitat tant en mostres fresques com congelades amb un ampli rang dinàmic i amb una ampla disponibilitat actual d'immunoassaigs d'alta sensibilitat relativament econòmics, estandarditzats i precisos [155]. No obstant, té la limitació de presentar una ampla variabilitat intraindividual recomanant-se al menys 2 mesures seriades a l'hora de prendre decisions clíniques [156,163]. Shah et al. en una revisió sistemàtica conclouen que l'hsCRP no presenta major rendiment que l'equació de risc de Framingham amb una molt petita aportació en l'estratificació del risc als models predictius ja establerts [164], considerant la seva predicció atribuïble a la seva associació amb els factors de risc tradicionals, amb una limitada utilitat clínica addicional a aquests en els models de risc multivariables [165], pel que la seva rellevància clínica segueix sent poc clara [166].

Tot i haver-se emprat en grans estudis prospectius la implementació de hsCRP en el *screening* rutinari per millorar l'estimació del risc cardiovascular com un component que integra múltiples factors metabòlics i inflamatoris de baix grau, revisions crítiques consideren que la hsCRP no té una discriminació de risc com per recomanar la seva determinació rutinària per al cribratge de la població [167]. Donades aquestes limitacions actualment s'investiguen nous biomarcadors inflamatoris més estables i amb major poder predictiu.

## 4.- GLICOPROTEÏNES.

### 4.1 Conceptes generals.

Les proteïnes son sintetitzades al citoplasma cel·lular per un procés anomenat traducció consistent en la conversió del codi genètic contingut al RNAm a proteïnes. Cada tipus de proteïna presentarà una seqüència específica d'aminoàcids i una conformació tridimensional i portaran a terme múltiples funcions intracel·lulars i intercel·lulars. Una vegada sintetitzades, la estructura de les proteïnes pot ser modificada químicament per modular la seva funció, anomenant aquest procés modificació post-traduccionals [168]. Dintre de les múltiples modificacions post-traduccionals que poden patir les proteïnes, la glicosilació és la més comú i consisteix en l'addició d'una o varies cadenes de carbohidrats a la proteïna, procés que es porta a terme en l'aparell de Golgi, augmentant la seva diversitat funcional [169]. La glicosilació es produeix principalment als hepatòcits estimulada per citocines proinflamatòries per exemple IL-6, produint entre altres la  $\alpha 1$  glicoproteïna àcida, l'haptoglobina i  $\alpha 1$  antitripsina [170]. Algunes formes activades de monosacàrids són N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), àcid N-acetilneuramínic (Neu5Ac), manosa, fucosa, galactosa, o àcid siàlic entre altres [168], conformant les dos glicosilacions terminals més freqüents; la N-glicosilació i O-glicosilació amb diferents residus de sucre en cada tipus (Figura 2). Per tant, la glicosilació de proteïnes és el procés post-traduccionals mediat per enzims responsable de la fixació de diverses estructures de glicans a l'oxigen d'un residu de serina o treonina (enllaç O) o nitrogen d'un residu d'asparagina (enllaç N) [170]. Mentre les proteïnes amb O-glicosilació són en la seva majoria intracel·lulars desenvolupant funcions a aquest nivell, la N-glicosilació predomina en les proteïnes circulants [171], pel que s'han establert com un potencial biomarcador en diverses malalties [172].

La majoria de les glicoproteïnes sèriques tenen sucres lligats a N, i menys freqüentment lligats a O, a la seva estructura [173]. Els defectes en la síntesi de glicans poden ser la causa de moltes malalties i les seves concentracions (que poden augmentar o disminuir) es modifiquen en diverses malalties de base inflamatòria, pel que es consideren potencials marcadors diagnòstics [174]. A banda de modificar les seves concentracions, durant els processos aguts les glicoproteïnes també es modifica l'estructura del glicà augmentant les branques i residus de monosacàrids que el formen, com ara els residus de N-

acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), àcid N-acetilneuramínic o àcid sialic (Neu5Ac), entre d'altres [175–177].

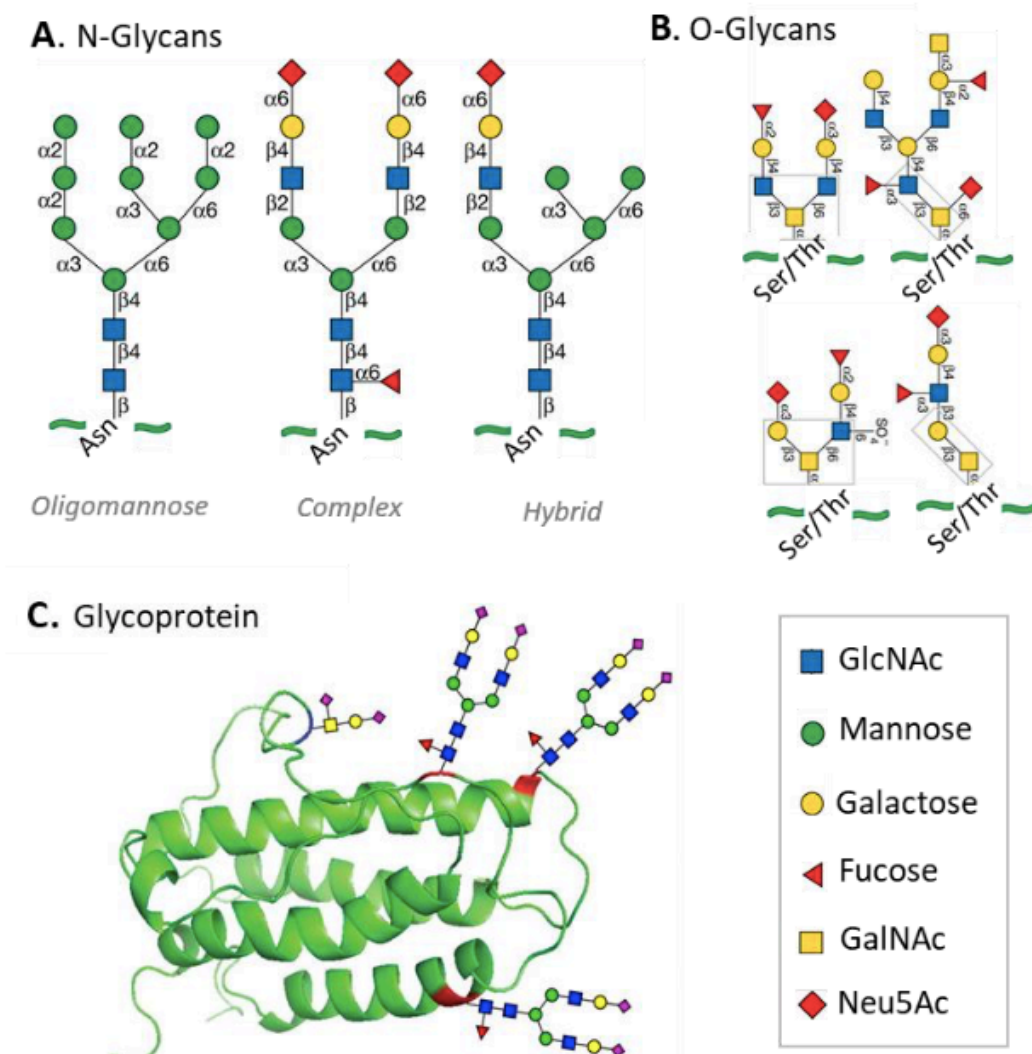


Figura 2. Figura procedent de la tesi doctoral de la Dra. Rocío Fuertes Martín, <sup>1</sup>H-NMR glycoprotein analysis: An advanced approach for inflammatory diseases diagnosis.

Glicosilació terminal: A) N-glicosilació; B) O-glicosilació; C) Glicoproteïna.

*En els oligosacàrids lligats a N, GlcNAc està lligat al nitrogen amida de l'asparagina (Asn) d'una seqüència peptídica Asn-X-Ser (sent X qualsevol aminoàcid excepte la prolina) i sempre contenen manosa. Aquesta glicosilació sol tenir diverses ramificacions que acaben cadascuna amb un residu d'àcid siàlic o Neu5AC carregat negativament.*

*D'altra banda, els oligosacàrids enllaçats amb O estan units amb el grup hidroxil de la serina (Ser) o la treonina (Thr) mitjançant GalNAc o (en els col·lagens) al grup hidroxil de la hidroxilisina mitjançant la galactosa i, en general, són curts, sovint només contenen d'un a quatre residus de sucres.*

#### 4.2 Anàlisi de glicoproteïnes per <sup>1</sup>H-RMN

L'anàlisi de glicoproteomes és molt més complex que l'anàlisi de proteomes donada la gran diversitat de residus de sucre lineals i ramificats que augmenten la complexitat de les estructures de les glicoproteïnes [178]. Diferents tècniques quantifiquen les glicoproteïnes en fluids biològics (*enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA), luminex-based assays, radio-immunoassays (RIAs) i nephelometric assays*), no obstant, la majoria d'aquestes mesuren una glicoproteïna específica [179]. Actualment, s'han desenvolupat tècniques que mostren major rendiment, com l'espectrometria de masses (MS) i l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN) (Figura 3). La RMN tot i ser menys específica que l'MS (aquesta proporciona caracteritzacions detallades basant-se en la diferència de massa) proporciona dades quantitatives dels metabòlits reproduïbles d'alt rendiment, proporcionant un perfil metabòlic complet en poc temps d'una mostra de plasma o sèrum resultant menys complicada i més rentable [180]. RMN presenta una baixa variabilitat entre laboratoris, atribuïnt l'existència de les possibles variabilitats a la present entre diferents individus i a la presa de les mesures en dies diferents [181]. RMN també ha estat utilitzada també en els darrers anys per quantificar lipoproteïnes, permetent un estudi més ampli del perfil lipídomic, que s'ha incorporat en la pràctica clínica com una eina més en la presa de decisions terapèutiques [182–184]. En un mateix anàlisi de plasma o sèrum es poden quantificar glicoproteïnes i lipoproteïnes el que es tradueix amb un major estalvi i en una major rendibilitat [168].

Com s'ha descrit prèviament, els N-glicans contenen diferents residus monosacàrids units a la cadena proteica per l'asparagina (Asn). Els grups acetil -COCH<sub>3</sub> dels residus N-acetilglucosamina i N-acetilgalactosamina i àcid N-acetilneuramínic produeixen el senyal amb un pic centrat a aproximadament 2,03 ppm de l'espectre <sup>1</sup>H-RMN [185]. Arrel del treball de Bell et al., la quantificació de glicoproteïnes és possible tecnològicament mitjançant els senyals associats als protons de la cadena lateral dels grups N-acetil-carbohidrats [186].

En els darrers anys, així com també ho han fet altres empreses especialitzades en l'anàlisi de metabòlits, Biosfer Teslab S, L (Liposcale®) ofereix a partir del mateix espectre tant l'anàlisi de lipoproteïnes com de glicoproteïnes [168]. Aquests desenvolupen l'anàlisi de glicoproteïnes mitjançant l'anàlisi d'espectres <sup>1</sup>H-RMN obtenint diversos paràmetres a més de GlycA (paràmetre més estès i estudiat, que representa la concentració de grups acetil de N-acetilglucosamina i N-acetilgalactosamina) com ara GlycB (concentració de grups acetil d'àcid N-acetilneuramínic) i les seves funcions derivades H / W GlycA i H / W GlycB. La relació H / W proporciona informació sobre la funció; la seva alçada (H), que està relacionada amb la concentració, i de la seva amplada (W), que està relacionada amb la flexibilitat i l'agregació de les molècules que generen el senyal [185], relacionant-se pics més alts i estrets amb patologies inflamatòries.

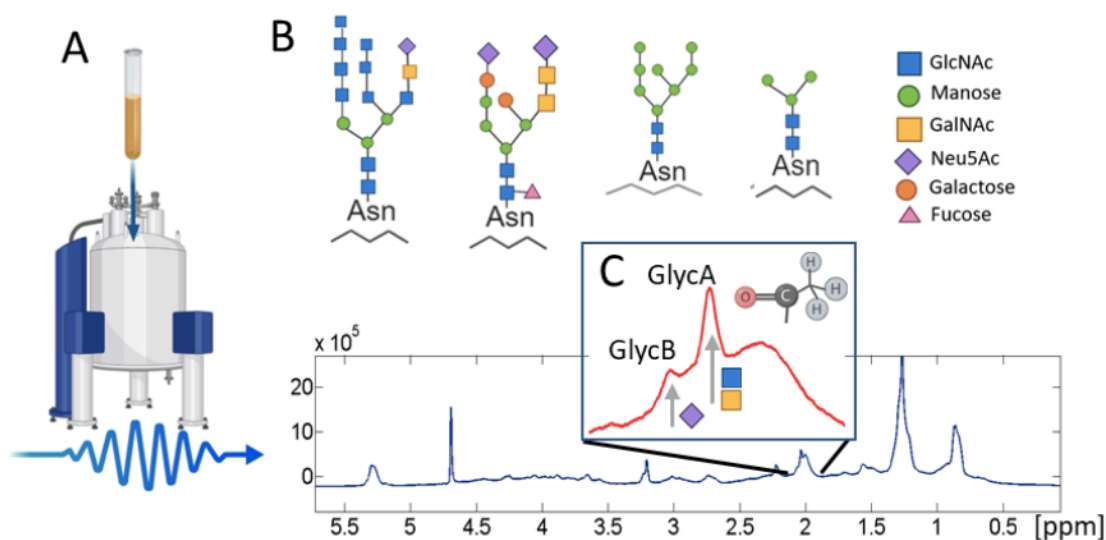


Figura 3. Figura procedent de la tesi doctoral de la Dra. Rocío Fuertes Martín, 1H-NMR glycoprotein analysis: An advanced approach for inflammatory diseases diagnosis.

*Metodologia d'anàlisi de glicoproteïnes per 1H-RMN. A) Tub de mostra i espectròmetre; B) N-glicans amb residus units a la cadena proteica per l'asparagina (Asn); C) Espectre 1H-RMN produït per la mostra. S'indica el grup químic que produeix aquest senyal.*

El senyal de GlycA (*Glycoprotein acetylation*) ha estat descrit per diversos autors, identificant el subconjunt glicoproteïnes de fase aguda que el componen, les quals deuen presentar concentracions elevades per ser detectades per RMN com ara  $\alpha$ 1- glicoproteïna àcida (principal contribuent del senyal), haptoglobina,  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 1-antiquimotripsina i transferrina [170]. D'aquesta manera, el senyal GlycA té una composició heterogènia de diverses glicoproteïnes, però no s'identifica per  $^1\text{H-RMN}$  la concentració individual de cada una d'aquestes [168].

Les concentracions de GlycA han mostrat una correlació amb proteïna C reactiva d'alta sensibilitat (hsCRP), fibrinogen ( $r = 0,46$ ) i interleucina-6 (IL-6) ( $P < 0,0001$ )[170].

## 5. GLICOPROTEINES COM A MARCADOR INFLAMATORI.

Com s'ha descrit prèviament, <sup>1</sup>H-RMN és la principal tècnica metabòlica d'alt rendiment per a la quantificació de glicoproteïnes, les quals son potencials biomarcados inflamatoris emergents augmentant la seva recerca en els darrers anys. Fuertes et al, realitza a l'any 2020 una revisió bibliogràfica on es resumeixen els principals estudis realitzats fins la data en diverses malalties com les malalties metabòliques, càncer, les malalties cardiovasculars i inflamatòries cròniques entre d'altres. Els resultats tenen en comú un augment dels nivells de GlycA (o els nivells circulants de N-acetil glicoproteïnes) respecte als grups control, descrivint-se a més associacions de GlycA i amb menys intensitat GlycB amb altres biomarcadors tradicionals com hsCRP o IL-6 [168].

Les associacions entre GlycA, morbiditat i mortalitat han estat més altes i independents d'hsCRP, el que deixa entreveure que GlycA capta millor la inflamació sistèmica que l'hsCRP per tenir una naturalesa composta [179,187]. Entre alguns exemples, els nivells basals de GlycA, van mostrar una correlació estadísticament significativa amb la incidència i mortalitat relacionada amb el càncer, no observant-se aquest efecte amb hsCRP o IL-6 [187,188]. També els nivells basals de GlycA es correlacionen positivament amb la incidència de diabetis mellitus tipus 2, en una resposta gradual similar al d'hsCRP [189]. Donada la seva capacitat de reflectir la inflamació sistèmica, presenta disminucions amb l'activitat física i la pèrdua de pes [190]. Alguns tractaments farmacològics com les terapèutics biològiques antiinflamatòries (Infliximab, Adalimumab, Ustekinumab o Baricitinib) han demostrat disminuir les seves concentracions. D'altra banda, no s'han mostrat reduccions significatives de GlycA amb altres tractaments com les estatines [191] o teràpies antiinflamatòries, com metotrexat o corticoids [192].

Dintre del marc d' aquesta tesi, en aquest apartat s'exposa en primer lloc els estudis que han avaluat les glicoproteïnes com a marcadors d'inflamació en PLWH i en malaltia cardiovascular. Fins a la data, els treballs que s'exposen en aquesta tesi són els primers que descriuen el paper de les glicoproteïnes com a marcador pronòstic en PLWH immunodiscordants, PLWH controladors d'elit i individus amb hipercolesterolèmia familiar.

### 5.1 Glicoproteïnes com a marcadors inflamatoris en població PLWH.

En una cerca bibliogràfica, tan sols hi ha constància de dos treballs previs als presentats en aquesta tesi on s'hagi estudiat el paper de les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN en PLWH. Tibuakuu et al. estudien l'associació de GlycA com a marcador d'aterosclerosi coronària subclínica avaluada per tomografia axial computeritzada (TAC) en individus de la cohort MACS, una cohort prospectiva multicèntrica dels Estats Units composta per homes que tenen sexe amb homes (HSH) infectats pel VIH. Diferents conclusions s'extreuen d'aquest treball; majors nivells de GlycA es van detectar en els participants infectats pel VIH (especialment amb càrregues virals més altes) respecte als homes no infectats. A més, els nivells de GlycA es van correlacionar amb els nivells d'hsCRP, dímer-D, IL-6, fibrinogen i sCD14 tant en homes infectats pel VIH com en controls no infectats. GlycA es va associar significativament amb la presència de CAC (calci d'artèria coronària), estenosi coronària i placa calcificada tant en individus infectats com en els controls sans després d'ajustar per hsCRP, dímer-D, IL-6, fibrinogen i diferents marcadors d'activació de monòcits [193].

En l'altre estudi realitzat en PLWH, Kelesidis et al. avaluen les variacions en els marcadors d'inflamació després de la teràpia antiretroviral. GlycA va ser l'únic marcador que va disminuir en tots els grups de TARGA, per sobre d'hsCRP, IL-6 i dímer-D [194].

En els treballs presentats en aquesta tesi es presenta per primera vegada el paper de les glicoproteïnes en la pròpia evolució de la malaltia pel VIH.

### 5.2 Glicoproteïnes quantificades per <sup>1</sup>H-RMN i risc cardiovascular

Com s'ha exposat, GlycA mostra ser un marcador robust d'inflamació i, en menor mesura per tenir menys estudis, GlycB. L'hsCRP és el biomarcador més àmpliament estudiat, no obstant presenta fluctuacions a l'hora de la seva mesura i certes limitacions esmentades prèviament [165].

Diversos estudis prospectius han demostrat una correlació positiva significativa entre els nivells de GlycA elevats a nivell basal i futurs esdeveniments cardiovasculars, mantenint



les correlacions després de l'ajust per a altres factors de risc tradicionals [187,191,195,196]

En l'estudi de Duprez et al. al 2016, es van controlar 5623 pacients sans de la cohort MESA (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*) als 12.1 anys, avaluant marcadors com IL-6, dímer-D, hsCRP i GlycA com a predictors d'esdeveniments cardiovasculars, mort i hospitalitzacions relacionats amb inflamació crònica i càncer. Conclouen que la concentració de GlycA va ser significativament predictiva de risc de mort per totes les causes, malalties cardiovasculars, hospitalitzacions relacionades amb inflamacions cròniques i càncer després d'ajustar-se a altres biomarcadors i factors de risc cardiovascular. IL-6 i dímer-D també van proporcionar informació independentment de GlycA. La predicció d'hsCRP es va explicar per altres variables inflamatòries [187]. Prèviament, al 2014 l'estudi *Women's Health Study* (WHS) havia estudiat el valor predictiu de GlycA i hsCRP en un seguiment mitjà de 17.2 anys en 27491 dones sanes. WHS és l'estudi amb major mida mostral i període de seguiment més llarg. Aquest estudi demostra una correlació positiva entre els nivells inicials de GlycA i esdeveniments cardiovasculars futurs. A més, va mostrar una correlació gradual entre els nivells basals de GlycA i esdeveniments cardiovasculars, augmentant el risc gradualment amb les concentracions més elevades de GlycA. No obstant, l'associació de GlycA amb els esdeveniments cardiovasculars no va resultar significativa després d'ajustar per hsCRP, mentre hsCRP es va mantenir significativa després d'ajustar per GlycA [195].

L'estudi PREVENT (Prevenió de la malaltia renal i vascular terminal) en un seguiment d'homes i dones (N = 4.759 participants; seguiment mitjà: 8,5 anys) on també es van incloure pacients amb microalbuminúria, va reafirmar les troballes del WHS mostrant també la correlació entre els nivells basals de GlycA i les taxes futures d'esdeveniments cardiovasculars que augmenten de forma gradual amb les seves concentracions i a més, independentment de la funció renal. L'estudi va concloure que la GlycA tenia una associació amb esdeveniments cardiovasculars similar a hsCRP, sent aquesta associació més forta quan els individus presentaven valors de GlycA i hsCRP simultàniament més elevats [196], independent de la funció renal en pacients amb albuminúria.

Els autors justifiquen aquests resultats més moderats del WHS i PREVENT atribuïbles a les característiques diferents de les cohorts tals com el sexe, l'ajust per altres biomarcadors tradicionals a banda d'hsCRP, com IL-6 i dímer-D tal com es realitza en la

cohort MESA, i a la variabilitat d'hsCRP respecte a GlycA. Otvos et al. van descriure que la variabilitat intraindividual de GlycA en mesures repetides durant 5 setmanes era molt inferior a la d'hsCRP [170]. Altres dos informes van mostrar que l' $\alpha 1$  glicoproteïna àcida (un component important de GlycA) era un predictor de mortalitat més fort que l'hsCRP [197,198]. GlycA s'ha mostrat elevada fins a 10 vegades en individus aparentment sans amb nivells de citocines elevades, mostrant un estat inflamatori de baix grau crònic [199]. Benson et al. sobre els individus de la cohort MESA estratifiquen la salut cardiovascular en funció de diferents variables com tabaquisme, activitat física, IMC, dieta, pressió arterial, glicèmia, i colesterol total. Nivells més baixos de GlycA es van associar amb la salut cardiovascular [200].

També s'ha descrit el paper de GlycA en la millora de la predicció del risc de malaltia cardiovascular en poblacions d'alt risc. GlycA i les subclasses d'HDL van ser mesurades per espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear de protons en 7617 individus sotmesos a cateterisme cardíac. GlycA es va associar amb la presència i l'extensió de malaltia coronària i mortalitat per totes les causes en models ajustat per 10 factors de risc cardiovascular. GlycA i les subclasses HDL més petites van tenir efectes independents però oposats sobre la predicció del risc de mortalitat. L'addició de GlycA i subclasses HDL més petites a les escales GRACE (*Global Registry of Acute Coronary Events*) i *Framingham Heart Study Risk Scores* van millorar la predicció, la discriminació i la reclassificació del risc de mortalitat [201]. L'estudi destaca el paper de la inflamació sistèmica i la millora en l'avaluació del risc clínic en poblacions en prevenció secundària de biomarcadors com GlycA. Muhlestein et al. van estudiar 2996 pacients sotmesos a angiografia per malaltia coronària per determinar si GlycA afegeix valor independent a hsCRP en la predicció de risc cardiovascular conclouent que els nivells de GlycA i hsCRP eren marcadors independents i additius de risc de d'esdeveniments cardiovasculars majors, mort i hospitalització per insuficiència cardíaca [202]. En pacients d'alt risc amb malaltia cardiovascular que havien assolit nivells de LDL molt baixos, GlycA va predir esdeveniments per malaltia cardiovascular i mortalitat per totes les causes [203]. GlycA ha mostrat ser un potencial marcador en l'avaluació d'esdeveniments cardiovasculars, com es mostra en un estudi on es va associar a la malaltia cardiovascular subclínica en malalts amb psoriasi de manera independent a factors de risc tradicionals i a l'hsCRP [204], cosa que també podria ser extrapolable a altres malalties de base inflamatòria. GlycA i hsCRP semblen diferir en termes de estabilitat biològica en la que GlycA

presenta menys variabilitat probablement degut al seu origen compost [154]. Malgrat les diferents estimacions dels resultats descrits prèviament, tots han demostrat de manera coherent correlacions positives entre els nivells basals de GlycA i les taxes d'incidents ASCVD i la mortalitat associada. Diferents estudis mostren correlacions fins i tot després d'ajustar-se per diversos altres factors de risc establerts de ASCVD, inclosos biomarcadors inflamatoris com hsCRP i IL-6 [205].

A diferència de l'observat amb hsCRP, les estatines no redueixen GlycA [203]. Un anàlisi post-hoc en un subconjunt de participants de l'estudi MESA en els que es realitza un assaig d'intervenció amb Rosuvastatina (JUPITER) en 10039 participants amb seguiment a 1.9 anys va mostrar una incidència d'esdeveniments cardiovasculars més baixa en pacients amb nivells similars de GlycA tractats amb estatines respecte els homòlegs que no rebien estatines [191]. No obstant, curiosament la reducció d'esdeveniments cardiovasculars en els grup d'estatina *vs.* placebo va ser similar entre els diferents quartils de GlycA. Davant aquesta troballa, els autors van plantejar la hipòtesi que l'efecte fixe de la reducció de risc de les estatines entre els diferents quartils de GlycA pot ser degut a que sols actuen de forma parcial sobre la via que associa els nivells més elevats de GlycA amb risc d'esdeveniments cardiovasculars, traduint GlycA altres vies implicades amb el desenvolupament i la progressió de l'arteriosclerosi.

Altres estudis també han mostrat l'associació entre els nivells basals de GlycA i la mortalitat per totes les causes, inclosa la mortalitat relacionada amb els esdeveniments cardiovasculars [187]. Aquesta associació va disminuir lleugerament, però mantenint-se després d'ajustar per hsCRP, IL-6 i dímer-D.

En general, el valor predictiu de GlycA per a esdeveniments cardiovasculars i mortalitat relacionada, és comparable a la d'hsCRP. [187,191,196]. No obstant, GlycA manté la seva associació després d'ajustar per factors de risc tradicionals mentre que hsCRP va perdre importància en diferents estudis després d'ajustar-se amb aquests [187,188].

Fins a la data, no consten treballs que relacionen les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN com a marcador de risc cardiovascular addicional en poblacions d'individus amb HF.

### III HIPOTESI DEL TREBALL

La resposta inflamatòria és un mecanisme de defensa a una o diverses agressions que poden alterar la fisiologia del nostre organisme. És una resposta protectora que utilitza un complex entramat cel·lular i bioquímic adreçat a protegir l'estructura i funció dels òrgans i teixits. En una primera fase la inflamació es localitza al lloc de la lesió amb participació de cèl·lules competents com neutròfils, monòcits, macròfags o limfòcits però si l'insult és intens o perllongat produeix una reacció sistèmica en la que participa el fetge, produint proteïnes amb unes característiques maduració específiques, proteïnes glicades com a mediadors de fase aguda de la inflamació. Quan l'agressió és molt aguda o perllongada en el temps, el procés inflamatori sobrepasa les seves funcions protectores i passa a agredir l'organisme. En certes malalties agudes la fisiopatologia està més intervinguda per la resposta inflamatòria que pels propis agents etiològics. En alteracions cròniques immunitàries, infeccioses o metabòliques, es pot detectar una activació inflamatòria crònica sistèmica i sostinguda, amb escasses manifestacions clíniques, però que a la llarga contribueixen a la presència de complicacions tardanes. La detecció d'aquesta inflamació subclínica i la seva repercussió són encara un repte mèdic de primera magnitud.

La ressonància magnètica nuclear del sèrum permet la determinació de proteïnes glicosilades sintetitzades a nivell hepàtic en el context de processos inflamatoris crònics subclínics. Els nivells de glicoproteïnes apunten a ser un marcador més sensible i estable d'inflamació crònica subclínica que altres biomarcadors més tradicionals. En patologies cròniques, com infeccions o alteracions metabòliques, la determinació de proteïnes glicosilades per <sup>1</sup>H-RMN és una eina nova que permet detectar situacions d'inflamació crònica subclínica i avaluar les seves conseqüències.

Per tot això, la hipòtesis que plantegem en aquest treball és que concentracions elevades de glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN podrien esdevenir biomarcadors clínics en el diagnòstic i l'evolució de malalties inflamatòries cròniques, com poden ser la causada per la infecció per VIH o la hipercolesterolèmia familiar. En els PLWH hi ha un nivell de inflamació subclínica que podria ser detectat per la presència de concentracions elevades de glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN, fins i tot en aquells pacients infectats pel VIH que són controladors d'elit i que no presenten cap expressió clínica del procés. Per tant, les concentracions de glicoproteïnes es podrien correlacionar amb la situació clínica basal dels pacients en el moment del diagnòstic i l'evolució de la infecció,

sent un marcador de resposta a la teràpia antiretroviral (progressors) i de risc d'una possible evolució a l'expressió clínica de la infecció (controladors d'elit).

La hipercolesterolèmia familiar és una malaltia metabòlica crònica, i per aquest motiu considerem que les concentracions de glicoproteïnes plasmàtiques estaran incrementades i es correlacionaran amb marcadors de severitat del procés. El nivells basals de glicoproteïnes determinats per  $^1\text{H-RMN}$  podrien esdevenir marcadors de risc cardiovascular incrementat.

## IV OBJECTIUS

### OBJECTIU PRINCIPAL

Avaluar el paper de la determinació de la concentració sèrica de glicoproteïnes determinada per <sup>1</sup>H-RMN com a biomarcador de inflamació crònica subclínica i el seu paper pronòstic en processos proinflamatoris crònics com la infecció per HIV i la hipercolesterolèmia familiar heterozigota.

### OBJECTIUS OPERATIUS

1. Avaluar la relació existent entre les concentracions sèriques de les glicoproteïnes determinades <sup>1</sup>H-RMN amb el marcadors clínics i biològics en una cohort de pacients amb infecció per HIV que inicien tractament antiretroviral .
2. Conèixer el valor predictiu de les glicoproteïnes determinades <sup>1</sup>H-RMN per a la predicció d'immunodiscordància al tractament antiretroviral.
3. Determinar el paper de les glicoproteïnes per <sup>1</sup>H-RMN en l'avaluació de l'estat inflamatori en els individus no responedors. Comparar la seva capacitat de predicció amb la d'altres predictors coneguts com l'edat i el nivell de CD4 basals.

***Objectius 1, 2 y 3 abordats en la publicació 1.***

4. En persones que viuen amb HIV i que són controladors d'elit, determinar el paper de les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN en l'avaluació de l'estat inflamatori.
5. Conèixer el valor predictiu de les glicoproteïnes en la pèrdua del control viral en un grup de controladors d'elit.

***Objectius 4 i 5 abordats en la publicació 2***

6. Avaluar el paper de concentracions de glicoproteïnes en una cohort de pacients amb una alteració metabòlica crònica com hipercolesterolèmia familiar heterozigot.
7. Avaluar el paper predictiu de les glicoproteïnes en l'aparició d'alteracions vasculars subclíniques.
8. Avaluar el paper de les glicoproteïnes com a marcadors i predictors d'alteracions vascular en comparació amb l'hsCRP.

***Objectius 6, 7 i 8 abordats en la publicació 3***

## V METODOLOGIA

Els mètodes emprats en aquest treball estan detallats en cada una de les publicacions. En aquesta secció es fa un resum d' aquells aspectes metodològics generals i comuns a tota la tesis, en concret es descriuen les cohorts de pacients, el mètode analític de <sup>1</sup>H-RMN emprat per la determinació de glicoproteïnes i les bases estadístiques comuns.

### 1. Cohort PLWH no recuperadors.

Al paper 1 es realitza un estudi prospectiu i multicèntric (Hospital Joan XXIII (Tarragona), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona) i Hospital Virgen del Rocío (Sevilla)) de mostres recollides entre el 2009 i el 2011. Durant aquest període es van reclutar 221 adults amb infecció pel VIH (39 (33-45) anys) que inicien tractament antiretroviral i se'ls fa un seguiment fins a 3 anys. Els criteris d'exclusió van ser la presència d'infeccions oportunistes a l'inici de l'estudi, malalties inflamatòries actives (excepte diabetis mellitus, dislipèmia o coinfecció per hepatitis), càncer o malalties amb risc vital important. Els 221 pacients inclosos es van estudiar en el moment basal (naïve) i després de 48 i 144 setmanes de seguiment amb tractament antiretroviral. A partir del recompte de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> naïve, es van classificar en dos grups en el moment basal (<200 cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i > 200 cèl·lules T CD4<sup>+</sup>). A les 144 setmanes de TAR, el grup amb <200 cèl·lules T CD4<sup>+</sup> al moment basal es va classificar en dos subgrups: INR si el seu recompte de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> era inferior a 250 cèl·lules/ml o responedors immunològics (IR) si era igual o superior a 250 cèl·lules/ml. També es va registrar el TAR prescrit a les setmanes 48 i 144.

### 2. Cohort controladors d'elit

Per a l'estudi de controladors d'elit del paper 2, es van utilitzar mostres de sèrum congelat disponibles al biobanc espanyol HIV HGM pertanyent a la Red de Investigación en VIH/SIDA (RIS) i les dades es van registrar a la cohort RIS del Grup d'Estudi de Controladors del VIH (ECRIS). D'aquestes mostres es van seleccionar vint-i-dos pertanyents a controladors d'elit (CE), definits com a subjectes que en absència de TAR des del diagnòstic del VIH i durant els 36 mesos del seguiment van mantenir una càrrega viral indetectable. D'aquests es van distingir dos grups: 11 CE que van perdre el control de càrrega viral espontània, definit per la detecció d'almenys dues mesures consecutives

per sobre de 50 còpies d'ARN del VIH/mL en un any (CT); i 11 CE que van mantenir el control virològic durant tot el seguiment (CP). Durant el seguiment es va analitzar el perfil de glicoproteïnes: en els CT es va determinar el seu perfil dos anys abans de la pèrdua del control virològic, un any abans de la pèrdua del control virològic (T-1), 6 mesos abans del control virològic, en el moment on es va detectar càrrega viral (T0) i un any després de la pèrdua espontània de control (T+1). En els CP, també es van realitzar anàlisis repetides almenys en dos moments diferents, sense trobar diferències en els perfils de glicoproteïnes durant cap dels seguiments. Així, es van calcular els valors mitjans i es van identificar com a T0 per al grup de CP. Per a aquest estudi es van incloure altres dues cohorts de pacients a l'estudi: subjectes sans VIH negatius i PLWH amb un patró de progressió de la malaltia típic (TP), comparat per sexe i edat amb CE. Per al grup PLWH-TP, 11 pacients es van definir com a progressors típics del VIH amb immunosupressió severa ( $< 100$  cèl·lules T CD4<sup>+</sup> a l'inici de la TAR) i progressors típics del VIH amb immunosupressió no severa ( $> 350$  cèl·lules T CD4<sup>+</sup> a l'inici de la TAR). Les glicoproteïnes sèriques per a PLWH-TP es van analitzar en el moment basal abans de l'inici del TAR (T0).

Tots els pacients seleccionats tenien més de 18 anys i sense cap malaltia aguda o crònica concomitant ni estaven sota teràpies que poguessin modificar l'estat inflamatori quan es van recollir les mostres de sang (AINE, esteroides, immunomoduladors).

### 3. Cohort de pacients amb hipercolesterolèmia familiar.

Al paper 3 es realitza un estudi transversal inicial i un estudi prospectiu al seguiment de 5 anys. En el moment basal, es van incloure 295 pacients que realitzaven seguiment a la Unitat de Lípids del Hospital Universitari Sant Joan de Reus a causa d'hipercolesterolèmia familiar heterozigot amb una puntuació a la *Dutch Lipid Clinic Network (DLCN)* igual o superior a 6 (75,6% amb variants genètiques associades a HF). L'anamnesi, l'antropometria, l'exploració física i els anàlisis sanguinis, inclosa l'anàlisi d' <sup>1</sup>H-RMN sèrica, es van obtenir a l'inici del seguiment. Es va realitzar una ecografia caròtida, incloent dades sobre l'IMT carotídia i la velocitat de l'ona de pols (PWV) i es va avaluar la presència de plaques arterioscleròtiques. També es va avaluar la presència de xantomes aquil·lians. Els estudis d'ecografia es van repetir després de 5 anys de seguiment en 144 pacients amb HF.



En els tres estudis, es va complir la Declaració d'Hèlsinki i el Comitè d'Investigació Ètica i Clínica de l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) va aprovar l'estudi. Tots els participants van signar el formulari de consentiment escrit.

#### 4. Determinació de Glicoproteïnes per <sup>1</sup>H-RMN. Bases metodològiques.

El plasma i el sèrum sanguini es consideren els fluids més representatius dels canvis metabòlics al cos, el que fa que sigui el biofluid d'elecció per als estudis clínics i metabòlics [206]. En el cas del sèrum, els factors de coagulació (com el fibrinogen) i les cèl·lules sanguínies s'eliminen per centrifugació, mentre que en el cas del plasma s'obté normalment de mostres de sang amb un afegit anticoagulant adequat per evitar la coagulació abans que els components cel·lulars s'eliminin per centrifugació [168]. Alguns anticoagulants d'ús habitual inclouen heparina, àcid diaminotetraacètic d'etilè (EDTA), citrat i sals d'oxalat de sodi, potassi o liti. Aquests agents produeixen pics d'alta intensitat o senyals superposats en l'espectre de RMN [168], pel que per a algunes aplicacions de RMN es sol preferir el sèrum al plasma, tot i que els resultats d'ambdós són comparables [207]. El sèrum es prepara deixant que la mostra de sang es coaguli recollint la sang en un tub de vidre net i deixant-la reposar a temperatura ambient [206].

Per a la manipulació i emmagatzematge de les mostres, no existeix un protocol estandarditzat el que podria suposar certa variabilitat en els resultats entre diferents laboratoris [208]. En general, les mostres es poden emmagatzemar fins una setmana a temperatures inferiors a 4°C i a -20 °C per a períodes de 1-2 mesos. Per a períodes d'emmagatzematge més llargs requereixen temperatures de -70 °C o -80 °C [209], mantenint-se estables fins a més de 10 anys [199].

Les mostres s'extreuen, es preparen i s'emmagatzemen com s'especifica en l'apartat de metodologia. Una vegada s'analitza la mostra, el procediment es divideix en dues fases, obtenint inicialment l'espectre (que passa per diverses fases) i posteriorment realitzant la quantificació de glicoproteïnes. L'espectre s'obté aplicant seqüències de pols, la més utilitzada és la seqüència de pols Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) que adquireix metabòlits de baix pes molecular amb una seqüència de pols editada per difusió amb gradients bipolars, tot i que també s'utilitzen d'altres com la seqüència de presaturació de l'espectroscòpia d'efecte Overhauser nuclear (NOESY) o el retard longitudinal de corrent de Foucault (LED) amb presaturació del senyal d'aigua [206]. Per quantificar la regió en

la que ressonen les glicoproteïnes s'aplica un algoritme, havent-se descrit diversos algoritmes a la literatura [210].

### 5. Mètodes estadístics generals.

Per als estudis realitzats al Paper 1 i 2 es va utilitzar el paquet SPSS 25 (IBM, Madrid, Espanya), i SPSS 27 (IBM, Madrid, Espanya) i R es va implementar a la funció `Machine_learn` del `healthcareai` v2.5.0 al Paper 3. Les variables contínues es van provar per a la normalitat mitjançant la prova de Kolmogorov-Smirnov. Les dades es presenten com a mitjanes i percentils 25 i 75 per a les variables contínues no distribuïdes normalment o la mitjana i la desviació estàndard (DE) quan es distribueixen normalment. Les variables categòriques s'expressen en percentatges. Les diferències entre grups es van analitzar mitjançant la prova no paramètrica de Mann-Whitney o la prova paramètrica T de Student per a variables contínues i la prova de Chi quadrat per a variables categòriques. Les diferències ajustades es van investigar mitjançant anàlisis de covariància (ANCOVA). Per a comparacions múltiples es va aplicar ANOVA unidireccional seguida de la prova post hoc de Bonferroni en alguns anàlisis (Paper 2). Les associacions entre glicoproteïnes i les diferents variables contínues es van analitzar mitjançant la prova de correlació de Spearman. S'han realitzat models de regressió logística i corbes ROC per avaluar qualsevol valor predictiu. Un valor de  $p$  inferior a 0,05 s'ha considerat estadísticament significatiu.

## VI RESULTATS: TREBALLS PUBLICATS



Article

# Glycoprotein Profile Assessed by <sup>1</sup>H-NMR as a Global Inflammation Marker in Patients with HIV Infection. A Prospective Study

Ana-Irene Malo <sup>1</sup>, Anna Rull <sup>2</sup>, Josefa Girona <sup>1</sup>, Pere Domingo <sup>3</sup>, Rocío Fuertes-Martín <sup>4</sup>,  
Núria Amigó <sup>4</sup>, Cèlia Rodríguez-Borjabad <sup>1</sup>, Neus Martínez-Micaelo <sup>1</sup>, Manuel Leal <sup>5</sup>,  
Joaquim Peraire <sup>2</sup>, Xavier Correig <sup>6</sup>, Francesc Vidal <sup>2,†</sup> and Lluís Masana <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, CIBERDEM, 43201 Reus, Spain; anairenemalo@gmail.com (A.-I.M.); josefa.girona@urv.cat (J.G.); celianutricio@gmail.com (C.R.-B.); neus.martinez@urv.cat (N.M.-M.)

<sup>2</sup> INIM group and HIV Unit, Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Joan XXIII University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, IISPV. 43005 Tarragona, Spain; anna.rull@iispv.cat (A.R.); jjperaire@gmail.com (J.P.); fvidalmarsal.hj23.ics@gencat.cat (F.V.)

<sup>3</sup> Infectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; pdomingo@santpau.cat

<sup>4</sup> Biosfer Teslab SL, DEEEA, Metabolomics Platform, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, CIBERDEM, 43007 Tarragona, Spain; rociofrtsm@gmail.com (R.F.-M.); nuria.amigo@urv.cat (N.A.)

<sup>5</sup> Internal Medicine Service, Viamed-Santa Ángela de la Cruz Hospital, 41014 Seville, Spain; mleal@telefonica.net

<sup>6</sup> Department of Electronic Engineering, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, CIBERDEM, 43007 Tarragona, Spain; xavier.correig@urv.cat

\* Correspondence: luis.masana@urv.cat; Tel.: +34-977759366; Fax: +34-977759322

† These authors contributed equally to this work.

Received: 9 April 2020; Accepted: 30 April 2020; Published: 4 May 2020

**Abstract:** Plasma glycoproteins are a composite biomarker of inflammation and can be detected by <sup>1</sup>H-NMR. The aim of this study was to prospectively appraise the clinical value of plasma glycoproteins assessed by <sup>1</sup>H-NMR in people living with HIV (PLWH). A total of 221 patients with HIV infection were recruited and studied at baseline and at 48 and 144 weeks. Patients were distributed into two groups according to baseline CD4<sup>+</sup> T-cell number below or above 200 cells/μL. Patients with fewer than 200 cells/μL were distributed into the responders and nonresponders according to antiretroviral therapy (ART) response at 144 weeks. Glycoprotein concentrations were determined by <sup>1</sup>H-NMR arising from the protein bond N-acetylglucosamine and N-acetylgalactosamine signals (GlycA); and N-acetylneuraminic acid signal (GlycB) associated with the sugar–protein bond concentration and aggregation state (shapes (height/width)). Basal glycoprotein concentrations were higher in patients with < 200 CD4<sup>+</sup> T-cell/μL (Glyc A: 1040(917.9–1199.1) vs. 950.4(845.5–1050.9), *p* < 0.001, and Glyc B: 521(440.3–610.3) vs. 468.6(417.9–507.0) μ mol/L, *p* < 0.001) being reduced by ART. The height/width (H/W) ratio was the parameter showing a better association with this clinical status. Baseline glycoproteins predict the condition of responder/nonresponder. In this study, <sup>1</sup>H-NMR glycoproteins provide novel insights to assess inflammation status and have prognostic value in PLWH.

**Keywords:** HIV-1; glycoprotein; proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR); inflammation; immunological responders

## 1. Introduction

In recent decades, antiretroviral therapy (ART) has produced a drastic decrease in mortality related to immunosuppression in HIV-infected patients [1], exchanging a deadly disease for a chronic disease. This is due to the powerful effects that ART produces on viral suppression and immune restoration. In spite of this, ART does not completely restore immunity, particularly in patients presenting with advanced disease, instead maintaining a state of systemic dysfunctional activation of the immune system [2]. This state is associated with proinflammatory mediators, dysfunctional and senescent regulator T-cells, and a decrease in global immune competence, among others [3]. This low-degree proinflammatory state has a direct involvement in the pathogenesis and evolution of HIV infection. Moreover, it has been associated with several non-AIDS co-morbidities [3–10]. Several reports elsewhere have evidenced that subsequent non-AIDS events are more prevalent in patients who present with advanced disease who do not fully restore immunity despite appropriate viral suppression, the so-called immunological nonresponders (INRs) [11–15]. As an expression of the state of immune activation, different inflammatory markers have been studied, showing their relation to the appearance of morbidities/non-AIDS events and mortality [4]. Among these, the most frequently described are interleukin-6 (IL-6), D-Dimer [5–9], C-reactive protein (hsCRP) [10–13], fibrinogen, tumor necrosis factor (TNF), soluble CD14 levels (activation markers of monocytes and independent mortality predictor), and markers of intestinal barrier dysfunction and bacterial translocation (intestinal fatty acid binding protein (I-FABP), lipopolysaccharide (LPS), and bacterial DNA) [14–17]. However, the techniques used to measure a single inflammation biomarker such as hsCRP have sensitivity differences. They are associated with a single inflammation pathway and may be subject to variability between individuals and intraindividual fluctuations. Moreover, the correlation is not always present, and there is also no precise and standardized relationship between its plasma concentrations and the appearance of events [18]; therefore, searching for new systemic inflammation markers such as glycoproteins is warranted.

<sup>1</sup>H-NMR spectroscopy allows for rapid and accurate quantification of plasma glycosylated proteins from the quantification of the signal associated with the protons of the side chains of the N-acetyl carbohydrate groups (glucosamine, galactosamine and sialic acid), which are covalently linked to plasma proteins [19]. This technique allows the global identification of the glycoproteins involved in the inflammatory process. During the acute inflammatory phase of different processes, the concentration of glycosylated proteins increases, and their structure is modified by increasing the ramifications and number of monosaccharide residues. Unlike common biomarkers of inflammation, such as hsCRP or inflammatory cytokines, glycoprotein A (GlycA) and B (GlycB) are composite biomarkers that integrate the protein levels and glycation states of several of the most abundant acute-phase proteins in serum ( $\alpha$ 1-acid glycoprotein, haptoglobin,  $\alpha$ 1-antitrypsin,  $\alpha$ 1-antichymotrypsin, transferrin, and others) and play a key role in inflammatory processes [20,21]. Apart from their concentrations, other new variables, such as the parameters derived from the signal area and shape as the height and width of GlycA and GlycB, expressed as a ratio (H/W), are associated with the amount and the aggregation state or flexibility of the sugar–protein bonds generating glycosylation and have been related to inflammation status. Some investigations have demonstrated GlycA and GlycB to be good biomarkers of low-grade inflammation, and an association between these glycoproteins and several metabolic and cardiovascular events has been reported [19].

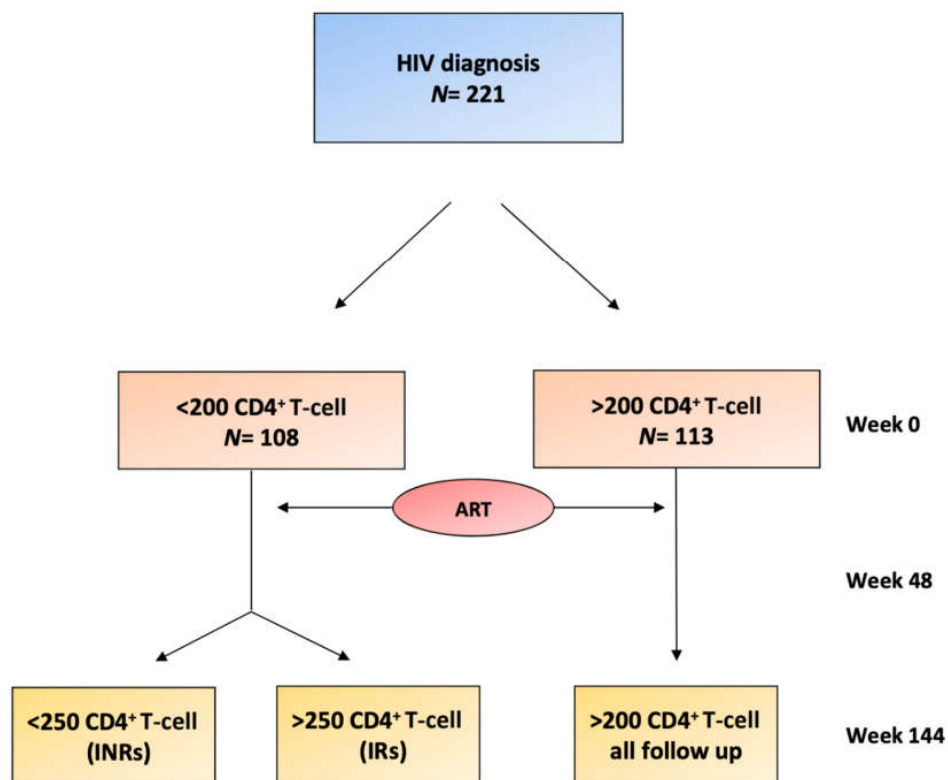
Because plasma glycoproteins play a crucial role in the modulation of the innate and adaptive immune systems, inflammation and pathological processes [20,22], they can be considered potential early diagnostic biomarkers of diseases associated with immune alterations, such as HIV infection [23,24].

In this work, we have studied plasma glycoprotein profiles assessed by <sup>1</sup>H-NMR as marker of low-grade inflammation in patients with HIV infection and their correlation with clinical and standard biochemical parameters and, prospectively, their clinical prognosis value.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design and Participants

This is a prospective, multicenter study. People living with HIV infection (PLWH) were recruited from three university hospitals (Hospital Joan XXIII, Tarragona, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, and Hospital Virgen del Rocío, Sevilla). A total of 221 adults with HIV infection (39 (33–45) years-old) who were ART naïve were recruited between 2009 and 2011 and were followed up on for up to 3 years. The exclusion criteria were the presence of opportunistic infections at the beginning of the study, active inflammatory diseases (except for diabetes mellitus, dyslipidemia or hepatitis coinfection), cancer or associated life-limiting diseases. The 221 patients included were studied at the basal timepoint (treatment naïve) and after 48 and 144 weeks of follow-up. Based on their naïve CD4<sup>+</sup> T-cell count, we classified patients into two groups at baseline (<200 CD4<sup>+</sup> T-cells and >200 CD4<sup>+</sup> T-cells). At 144 weeks on ART, the group with <200 CD4<sup>+</sup> T-cells at the basal timepoint was sorted into two subgroups: INRs if their CD4<sup>+</sup> T-cell count was less than 250 cells/mL or immunological responders (IRs) if it was equal to or greater than 250 cells/mL (Figure 1). The prescribed ART at weeks 48 and 144 was also recorded. All centers obtained the approval of the ethical committee, and the participants signed informed consent forms.



**Figure 1.** Flowchart of the patients included in the study. At week 0, the two groups were differentiated depending on the levels of CD4<sup>+</sup> T-cells (<200 CD4<sup>+</sup> T-cells or >200 CD4<sup>+</sup> T-cells). Antiretroviral therapy (ART) therapy was initiated with subsequent follow-up at 48 weeks and at 144 weeks. At 144 weeks, two groups (IRs and INRs) were differentiated within the <200 CD4<sup>+</sup> T-cell baseline group,

depending on whether they achieved >250 CD4<sup>+</sup> T-cells at week 144. INRs, immunological nonresponders; IRs, immunological responders.

## 2.2. Data Collection

At each study point, a complete physical examination was performed. Blood samples were obtained after an overnight fast. Plasma and serum aliquots were obtained and kept frozen at −80 °C in the Biobank of the Research Institute (IISPV) until used for analysis. HIV RNA viral load (VL), CD4<sup>+</sup> T-cell count, and standard laboratory parameters (renal and liver function and lipid profile) were assessed. Therapy data were also recorded, and a standardized questionnaire was administered to evaluate adherence to ART [25].

## 2.3. Glycoprotein Analysis by <sup>1</sup>H-NMR

Before <sup>1</sup>H-NMR analysis, 200 µL of serum was diluted with 50 µL of deuterated water and 300 µL of 50 mM phosphate buffer solution (PBS) at pH 7.4. <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded at 310 K on a Bruker Avance III 600 spectrometer operating at a proton frequency of 600.20 MHz (14.1 T) following previously reported procedures [26]. Briefly, we analyzed the region of the <sup>1</sup>H-NMR spectrum where the glycoproteins resonate (2.15–1.90 ppm) using several functions according to the chemical shift: GlycF, GlycA and GlycB. For each function, we determined the total area and transformed it to concentration according to the number of sugar–protein bonds. The area, height, position, and bandwidth and their ratios were also calculated. The concentrations of GlycA and GlycB provided the amount of acetyl groups of protein bond N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, and N-acetylneuraminic acid. The GlycF area arises from the concentration of −COCH<sub>3</sub> acetyl groups of N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, and N-acetylneuraminic unbonded to proteins (free fraction). Height/width ratios of GlycA and GlycB (H/W) were associated with the shape of the peaks generating the <sup>1</sup>H-NMR signals indicating the aggregation state or flexibility of the sugar–protein bonds [26,27].

## 2.4. Statistical Analysis

Continuous variables were tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov test. Data are presented as the medians and 25th and 75th percentiles for continuous variables not normally distributed or the mean and standard deviation (SD) when normally distributed. Categorical variables are expressed as percentages unless otherwise indicated. Differences between groups (<200 CD4<sup>+</sup> T-cells, >200 CD4<sup>+</sup> T-cells) were analyzed by the nonparametric Mann–Whitney test or parametric Student's *t*-test for continuous variables and the chi-squared test for categorical variables. Adjusted differences were investigated using analyses of covariance (ANCOVAs). Associations between glycoproteins and continuous variables were analyzed by Spearman's correlation test. Random forest analysis was performed to provide a selection of glycoproteins that were better classified between groups (<200 CD4<sup>+</sup> T-cells, >200 CD4<sup>+</sup> T-cells). Logistic regression models and receiver-operating characteristic curves (ROC) were also performed to assess any predictive value to identify IRs and INRs patients at week 144. Statistical analyses were conducted with the SPSS 25 package (IBM, Madrid, Spain). A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Baseline Clinical and Analytical Parameter Data

At baseline, 221 HIV antiretroviral drug-naïve patients who met the inclusion criteria were classified into two groups: 108 (48.86%) were classified in the <200 CD4<sup>+</sup> T-cells/µL group and 113 (51.13%) in the >200 CD4<sup>+</sup> T-cells/µL group. Both groups were similar with respect to sex distribution, type 2 diabetes, dyslipidemia, and renal dysfunction. The CD4<sup>+</sup> T-cell <200/µL group tended to be older than the CD4<sup>+</sup> T-cell >200/µL group. There were also differences in gamma-glutamyl-transferase (GGT) and alkaline phosphatase (FA) without differences in alanine aminotransferase (ALT) and

aspartate aminotransferase (AST) between groups. No differences in hepatitis co-infection was observed. As expected, the viral load was also different between groups (Table 1).

**Table 1.** Clinical and analytical characteristics of the study subjects. <sup>1</sup>H-NMR glycoproteins at baseline.

	All, n = 221	<200 CD4 <sup>+</sup> T-cell, n = 108	>200 CD4 <sup>+</sup> T-cell, n = 113	p Value
<b>Clinical characteristics</b>				
Age (y)	39 (33–45)	40 (34–48)	37 (30–43)	0.009
Gender (% women)	39 (17.6)	20 (18.5)	19 (16.8)	0.890
Type 2 Diabetes (% yes)	16 (7.3)	6 (5.6)	10 (8.9)	0.439
Hepatitis (% yes)	103 (47.5)	52 (49.1)	51 (45.9)	0.684
<b>Biochemical parameters</b>				
Cholesterol (mmol/L)	4.2 ± 1	4.7 ± 1.2	4.3 ± 0.8	0.422
Triglycerides (mmol/L)	1.3 (0.9–1.9)	1.39 (1–2.0)	1.2 (0.9–1.8)	0.113
LDL-C (mmol/L)	2.5 ± 0.9	2.5 ± 1.1	2.6 ± 0.6	0.788
HDL-C (mmol/L)	0.9 (0.8–1.1)	0.9 (0.7–1.1)	1(0.8–1.1)	0.841
AST (µkat/L)	0.7 (0.5–0.9)	0.7 (0.6–1)	0.7 (0.5–1)	0.158
ALT (µkat/L)	0.6 (0.5–1)	0.6 (0.5–1.1)	0.6 (0.5–0.9)	0.491
GGT (µkat/L)	0.8 (0.4–1.5)	1 (0.6–2.1)	0.5 (0.4–1.0)	<0.001
ALP (µkat/L)	0.7 (0.6–0.9)	0.8 (0.6–1)	0.6 (0.5–0.8)	<0.001
Creatinine (µmol/L)	91 (82–100)	90 (79–97)	92 (86–103.5)	0.090
GF (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	87 (77–101)	87 (79–105)	88 (77–100)	0.717
CD4 <sup>+</sup> T-cell (cells/µL)	223 (103–331)	92 (34–177)	328 (272–441)	<0.001
VL (log copies/mL)	4.98 (4.52–5.49)	5.24 (4.68–5.56)	4.77 (4.32–5.13)	<0.001
HsCRP* (mg/L)	1.6(0.70–9.00)	2.1 (0.8–10)	1.3 (0.4–5.5)	0.036
<b>Glycoproteins</b>				
Glyc B (µmol/L)	489.1 (431.4–545.7)	521 (440.3–610.3)	468.6 (417.9–507.0)	<0.001
Glyc A (µmol/L)	972.5 (890.1–1120.0)	1040 (917.9–1199.1)	950.4 (845.5–1050.9)	<0.001
H/W Glyc B	6.2 (5.5–7)	6.6 (5.6–7.8)	5.9 (5.3–6.9)	<0.001
H/W Glyc A	21.9 (19.9–25.77)	24.3 (20.6–29.33)	21.3 (19.44–23.22)	<0.001
<b>Treatment during follow-up</b>				
PI 48 weeks (%)	115 (52.0)	59 (54.6)	56 (49.6)	0.501
TDF 48 weeks (%)	83 (37.6)	46 (42.6)	37 (32.7)	0.165
PI 144 weeks (%)	95 (43.0)	51 (47.2)	44 (38.9)	0.224
TDF 144 weeks (%)	81 (36.7)	47 (43.5)	34 (30.1)	0.050

Data are shown as the *n* (percentage) for qualitative variables and median (25th percentile–75th percentile) or mean ± SD for quantitative variables. *P* values for group comparisons are reported. \* HsCRP *n* = 124. For the group <200 CD4<sup>+</sup> T-cells, *n* = 68. For the group >200 CD4<sup>+</sup> T-cells, *n* = 56. LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; ALP, alkaline phosphatase; GF, glomerular filtration; VL, viral load; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; PI, protease inhibitors; TDF, tenofovir.

### 3.2. Associations of Glycoproteins with Analytical Parameters at the Basal Timepoint

Higher levels of glycoproteins at baseline were significantly associated with the <200 CD4<sup>+</sup> T-cells/µL group in comparison with the >200 CD4<sup>+</sup> T-cells/µL group. Differences in the concentrations and H/W ratios of the glycoproteins remained significant after adjusting for age, FA, GGT, and VL (Table 1). Random forest analysis revealed that baseline H/W GlycA and H/W GlycB were the parameters that best classified the patients in these two groups (Supplemental Materials Figure S1).

HsCRP concentrations were higher in the <200 CD4<sup>+</sup> T-cells/µL group (Table 1). Baseline GlycA and B concentrations and the H/W ratios were correlated with hsCRP values (Table 2).

At baseline, glycoproteins showed a significant inverse association with baseline CD4<sup>+</sup> T-cell levels and a positive relationship with VL (Table 2). From a metabolic point of view, we found an association between glycoprotein levels and triglycerides and an inverse correlation with HDL cholesterol. After adjusting for age and viral load, the GlycA and GlycB concentrations and H/W ratios



maintained significant correlations with HDL-C, CD4<sup>+</sup> T-cells, and hsCRP. GlycA and its H/W ratio also maintained their significant correlation with triglycerides after adjustment (Table 2).

**Table 2.** Associations between <sup>1</sup>H-NMR glycoprotein variables and biochemical characteristics of the study subjects at baseline.

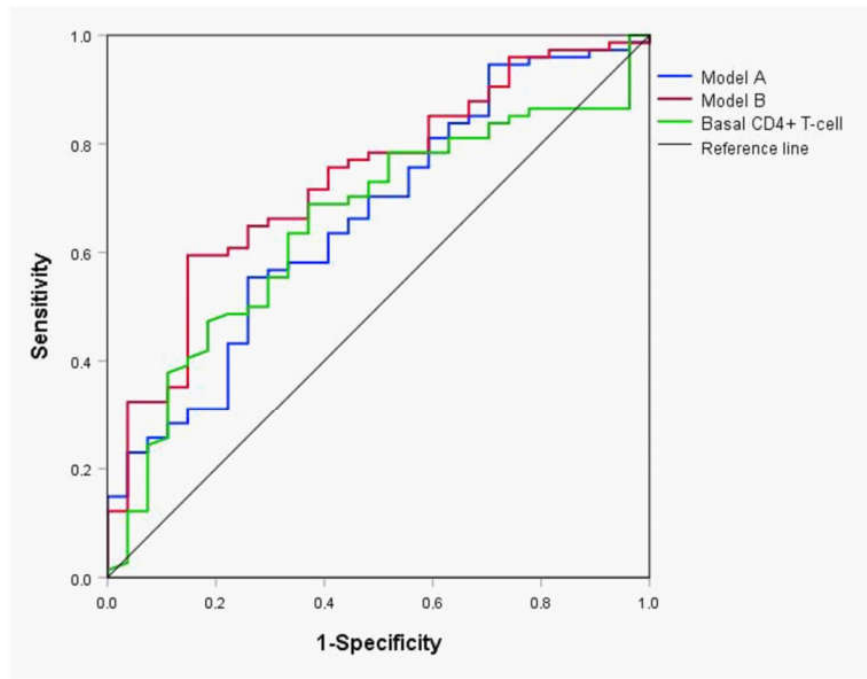
	GlycB	GlycA	H/W GlycB	H/W GlycA
Age	0.090	0.198 **	0.084	0.128
Cholesterol	-0.019	0.134	-0.018	0.017
Triglycerides	0.221 **	0.353 **	0.221 **	0.236 **
LDL-C	0.024	0.165	0.026	0.063
HDL-C	-0.259 **	-0.226 **	-0.263 **	-0.251 **
GOT	-0.103	-0.095	-0.093	-0.048
GPT	-0.132	-0.067	-0.111	-0.093
GGT	0.063	0.057	0.072	0.142
FA	0.180 *	0.116	0.175 *	0.210 **
Creatinine	-0.050	-0.035	-0.056	-0.082
GF	0.034	-0.032	0.034	0.007
CD4 <sup>+</sup> T-cell	-0.337 **	-0.297 **	-0.350 **	-0.381 **
VL	0.098	0.092	0.120	0.221 **
Hs-CRP *	0.456 **	0.454 **	0.458 **	0.512 **

Spearman correlation coefficients and *p* values (\* *p* < 0.05. \*\* *p* < 0.001) for each glycoprotein variable and biochemical parameter. LDL-c, low-density lipoprotein-cholesterol; HDL-c, high-density lipoprotein-cholesterol; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; ALP, alkaline phosphatase; GF, glomerular filtration; VL, viral load; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein. *n* = 221, \* *n* = 121.

### 3.3. Evolution of Glycoproteins and Prognosis in the Prospective Study

The basal concentrations of GlycA and GlycB and their H/W ratios in the <200 CD4<sup>+</sup> T-cells/μL group were similar between IRs and INRs at week 144 (data not shown). However, they were correlated with the final CD4<sup>+</sup> T-cell count (week 144) when analyzing all patients (Supplemental Materials Table S1). This correlation was not found when performing analysis by groups (CD4<sup>+</sup> T-cells <200 vs. CD4<sup>+</sup> T-cells > 200) or by subgroups (IRs vs. INRs), attributable to the decrease in sample size.

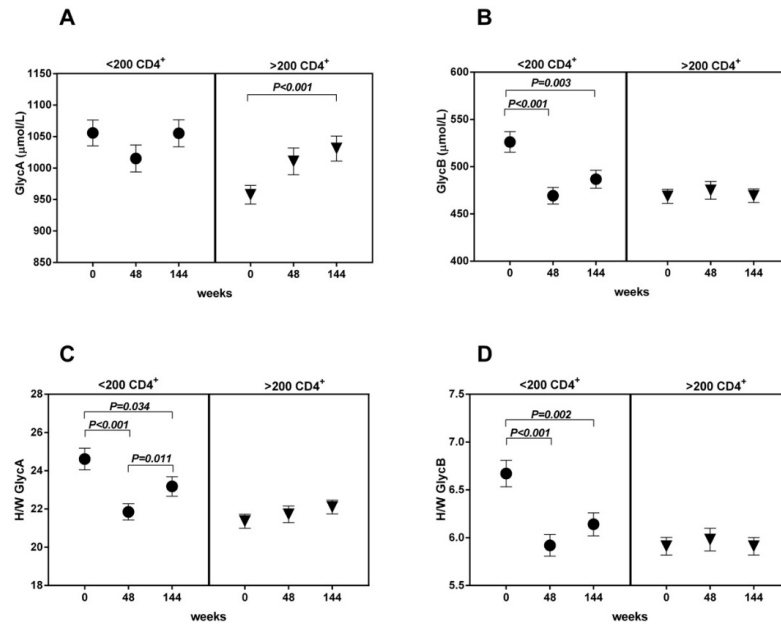
In the <200 CD4<sup>+</sup> T-cells/μL group, the ROC curves show that the model (Figure 2, model A) that contained each basal glycoprotein concentration and ratio defined an area under the curve of 0.664 (*p* = 0.012) for the prediction of which patients will be IRs or INRs at week 144. The model with all glycoproteins by <sup>1</sup>H-NMR was a better predictor of immune response than the baseline CD4<sup>+</sup> T-cell level (area under the curve 0.653, *p* = 0.019). With these results, we generated a model (Figure 2, model B) using model A, baseline CD4<sup>+</sup> T-cell level and age. This model predicted the condition of immune responder/nonresponder with an area of 0.733 (*p* < 0.001) for early identification even before the start of ART treatment, which was better than basal CD4<sup>+</sup> T-cells alone. There were no differences in ART between IRs and INRs.



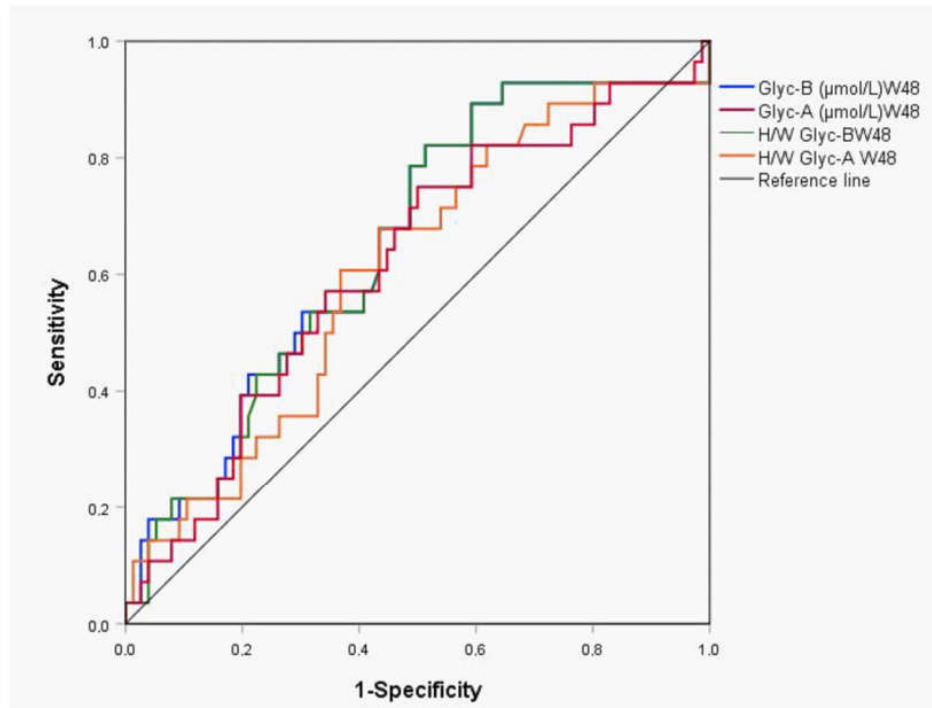
	Area	Error	P-value	95% CI	
				Lower	Upper
<b>Model A</b>	0.664	0.060	0.012	0.545	0.782
<b>Model B</b>	0.733	0.054	<0.001	0.626	0.839
<b>Basal CD4<sup>+</sup> T-cell</b>	0.653	0.059	0.019	0.537	0.770

**Figure 2.** Receiver-operating characteristic curves (ROC) curves of Model A (blue) and Model B (red) for evaluating glycoprotein biomarkers as predictors of the immunological response to ART at baseline. Model A: Area GlycA, Area GlycB, height/width (H/W) GlycA and H/W GlycB. Model B: Model A, basal CD4<sup>+</sup> T-cell count and age.

In the <200 CD4<sup>+</sup> T-cells/ $\mu$ L group, the GlycB concentrations and H/W ratios showed a significant decrease at week 48, and the level was maintained up to week 144 (Figure 3B,D). The GlycA evolution showed a similar trend, although only the H/W ratio achieved statistical significance (Figure 3A,C). This pattern was not observed in the >200 CD4<sup>+</sup> T-cells/ $\mu$ L group. The ROC curves including GlycB and its H/W ratio separately at week 48 show a predictive value of immunological response (Figure 4).



**Figure 3.** The evolution of glycoproteins ((A): Glycoprotein A; (B): Glycoprotein B; (C) and (D) Height/Width ratio for glycoprotein A and B respectively) is represented according to groups (basal <200 CD4<sup>+</sup> T-cells vs. >200 basal CD4<sup>+</sup> T-cells) and time (weeks 0–48–144).



	Area	Error	P-value	95% CI	
				Lower	Upper
<b>GlycB</b>	0.654	0.060	0.016	0.537	0.771
<b>GlycA</b>	0.617	0.062	0.069	0.494	0.739
<b>H/W GlycB</b>	0.649	0.060	0.020	0.532	0.766
<b>H/W GlycA</b>	0.608	0.062	0.091	0.487	0.730

**Figure 4.** ROC curves of each glycoprotein as a predictor biomarker of immunological response to ART at week 48.

#### 4. Discussion

Here, we studied the plasma glycoprotein profile assessed by <sup>1</sup>H-NMR in PLWH. <sup>1</sup>H-NMR allows measurement of the global plasma sugar–protein bond concentration of glycoproteins, referred to as GlycA and GlycB, as well as some related parameters such as the aggregation state (or flexibility) of the sugar–protein bonds. These data are provided by the shape of the NMR signal associated with plasmatic glycoproteins derived from the ratio between its height and width (H/W). The higher the ratio, the greater is the inflammation state, and indicates a more flexible—and probably more accessible—bond between the sugar and the glycosylated protein. Given that low-grade inflammation is a hallmark finding in treated PLWH, even in those who achieve virologic suppression, and that this low-grade inflammatory state has been linked with several non-AIDS conditions, it seems worth investigating glycoproteins as a potential biomarker of inflammation in this clinical setting.

We have observed that GlycA and GlycB concentrations are higher in patients with a worse immunological state and are also an indicator of prognosis. Those patients with higher baseline glycoprotein concentrations tend to respond less to ART. The H/W ratio is also directly associated with the clinical state and prognosis of patients.

The rationale behind these observations is that during acute phase inflammatory states, the concentration of glycosylated proteins increases, and their structure is modified by increasing the ramifications and number of monosaccharide residues, such as N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine (GlycA) or N-acetylneuraminic acid (GlycB), among others, playing a key role in inflammatory processes [19,20]. These glycoproteins are a marker composed of different acute phase proteins and their glycation states ( $\alpha$ 1 acid glycoprotein, haptoglobin,  $\alpha$ 1 antitrypsin,  $\alpha$ 1 antichymotrypsin and transferrin), representing a more global measure and therefore more stable inflammatory status [28] than traditional markers such as hsCRP. On the other hand, these parameters show less intravariability between individuals [29,30].

The composite nature of  $^1\text{H-NMR}$  glycoprotein measurement makes it possible to better capture systemic inflammation, with a greater association with morbidity and mortality compared to single biomarkers such as hsCRP [31–33].

In the HIV population, changes in glycoprotein concentrations have been evaluated based on the antiretroviral therapy used, with a decrease seen in GlycA both in patients undergoing treatment with integrase inhibitors (raltegravir) and ritonavir-boosted protease inhibitors [34]. Another study evaluated the association of GlycA in HIV patients with the presence of subclinical coronary arteriosclerosis, suggesting that this new marker could stratify cardiovascular risk in this population [35]. As far as we know, there are no studies in the literature that evaluate glycoproteins as prognostic markers for the condition of immunological responders. In a previous study in the same cohort, metabolic differences in the lipoprotein profile measured by  $^1\text{H-NMR}$  were found between responding and nonresponding patients at baseline [36].

The  $\text{CD4}^+$  T-cell count at diagnosis [37], age, parenteral drug use [38], and the rapid decrease in  $\text{CD4}^+$  T-cells [39] are factors related to poor prognosis and reaching an optimal  $\text{CD4}^+$  T-cell level. Basal glycoprotein values were correlated to both  $\text{CD4}^+$  T-cells and viral load. Viral replication occurring under nonsuppressive therapy could lead to inflammation, jeopardizing the relevance of our results; therefore, all data were adjusted for these variables. Although the baseline determination of a single glycoprotein group by itself did not predict the immunological recovery, the compilation of data related to glycoprotein measurement obtained by the  $^1\text{H-NMR}$  methods (glycoprotein groups A and B plus H/W ratios) did predict the recovery condition at baseline. The joint determination of glycoproteins even before the start of treatment was superior to the baseline  $\text{CD4}^+$  T-cell count for the prediction of IRs or INRs. A higher prediction for this condition was found by including baseline glycoprotein,  $\text{CD4}^+$  T-cells + levels and age together in a model, thus increasing the predictive value with respect to  $\text{CD4}^+$  T-cell levels alone. Moreover, baseline glycoprotein levels were correlated with the final  $\text{CD4}^+$  T-cells/ $\mu\text{L}$  count in the whole group.

Another interesting observation was the impact of therapy on inflammation markers. The striking reduction in glycoproteins at week 48 of treatment with respect to the baseline supports the early onset of antiretroviral therapy in infected patients.

Limitations of our study are the sample size, but taking into account the follow-up period results in a very informative cohort. HsCRP was available in a limited number of patients precluding head-to-head comparisons with glycoproteins but providing enough robustness to obtain reliable data at basal levels and correlations to glycoproteins. Data on obesity, a possible confounding factor because it is associated to chronic low inflammation degree, were incomplete and thus could not be analyzed, although in this group of patients, a significant prevalence of obesity was unexpected. The information given by the ROC curves performed to assess the predictive value of glycoproteins, although widely used in biomedicine, could be improved by other statistical techniques that were unavailable, such as total operating characteristic (TOC) curves that provide a broader information for each predictive threshold [40]. Glycoprotein profiling by  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy is a currently developing method, and technical improvements can be expected, although no significant changes in results are envisaged.

## 5. Conclusions

Plasma NMR spectroscopy allows a better understanding of metabolic changes in complex diseases. PLWHs are exposed lifelong to alterations in the immune system, including inflammation mechanisms, leading to complications not directly associated with HIV. According to our results, NMR glycosylation profiling focused on inflammation mediators could contribute to a better knowledge of these chronic conditions. GlycA and B signal characterization provide a wider view of inflammatory status than concentrations of a single biomarker, increasing the robustness of inflammation assessment.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/2077-0383/9/5/1344/s1](http://www.mdpi.com/2077-0383/9/5/1344/s1), Figure S1: Random forest analysis, Table S1: Spearman correlation coefficients between basal glycoproteins and final CD4+ T-cells (144 weeks).

**Author Contributions:** L.M. and F.V. are the guarantors of the article; A.-I.M., A.R., J.G., P.D., R.F.-M., N.M.-M., M.L., and J.P. collected, analyzed data, and wrote the manuscript; N.A., N.M.-M., C.R.-B., and X.C. critically reviewed the manuscript. A.-I.M. and J.G. analyzed data and wrote the manuscript. A.-I.M., F.V., and L.M. designed the study and critically reviewed the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was jointly supported by national funding from the Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM). This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the project “PI13/00796, PI16/00503, PI19/01337” and the SPANISH AIDS Research Network “RD16/0025/0006” (Co-funded by European Regional Development Fund/European Social Fund; “A way to make Europe”/“Investing in your future”, by Gilead Fellowship Program GLD14/293 and by Programa de Suport als Grups de Recerca AGAUR (2014SGR250). A.-I.M. is supported by a grant from the Diputació de Tarragona, Talent Salut, Universitat Rovira i Virgili, IISPV. A.R. is supported by a grant from the Acció Instrumental d'incorporació de científics i tecnòlegs through “PERIS SLT002/16/00101” (Departament de Salut from Generalitat de Catalunya), by the Agencia Estatal de Investigación through the project “EUIN2017-89297” (Acciones de carácter internacional “Europa Investigación”; Ministry of Economy and Competitiveness), by IISPV through the project “2019/IISPV/05” (Boosting Young Talent) and by ISCIII through the Miguel Servet Program “CP19/00146”.

**Conflicts of interest:** N.A. is stockowner of Biosfer Teslab, the company that commercializes the glycoprotein profiling described in the present manuscript. The other authors report no conflicts of interest.

## References

1. Massanella, M.; Negro, E.; Clotet, B.; Blanco, J. Immunodiscordant responses to HAART—Mechanisms and consequences. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2013**, *9*, 1135–1149.
2. Hatano, H. Immune activation and HIV persistence: Considerations for novel therapeutic interventions. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2013**, *8*, 211–216.
3. Sokoya, T.; Steel, H.C.; Nieuwoudt, M.; Rossouw, T.M. HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediat. Inflamm.* **2017**, *2017*, 6825493.
4. Leeansyah, E.; Malone, D.F.G.; Anthony, D.D.; Sandberg, J.K. Soluble biomarkers of HIV transmission, disease progression and comorbidities. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2013**, *8*, 117–124.
5. Kuller, L.H.; Tracy, R.; Belloso, W.; De Wit, S.; Drummond, F.; Lane, H.C.; Ledergerber, B.; Lundgren, J.; Neuhaus, J.; Nixon, D.; et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med.* **2008**, *5*, 1496–1508.
6. Nixon, D.E.; Landay, A.L. Biomarkers of immune dysfunction in HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2010**, *5*, 498–503.
7. Group, T.S. for M. of A.T. (SMART) S. CD4+ Count-Guided Interruption of Antiretroviral Treatment. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 2283–2296.
8. Grund, B.; Baker, J.V.; Deeks, S.G.; Wolfson, J.; Wentworth, D.; Cozzi-Lepri, A.; Cohen, C.J.; Phillips, A.; Lundgren, J.D.; Neaton, J.D.; et al. Relevance of Interleukin-6 and D-Dimer for Serious Non-AIDS Morbidity and Death among HIV-Positive Adults on Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0155100.
9. Hart, B.B.; Nordell, A.D.; Okulicz, J.F.; Palfreeman, A.; Horban, A.; Kedem, E.; Neuhaus, J.; Jacobs, D.R.; Duprez, D.A.; Neaton, J.D. Inflammation-Related Morbidity and Mortality Among HIV-Positive Adults:

- How Extensive Is It? *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2018**, *77*, 1–7.
10. Nordell, A.D.; McKenna, M.; Borges, Á.H.; Duprez, D.; Neuhaus, J.; Neaton, J.D.; INSIGHT SMART, ES-PRIT Study Groups; SILCAAT Scientific Committee Severity of cardiovascular disease outcomes among patients with HIV is related to markers of inflammation and coagulation. *J. Am. Heart Assoc.* **2014**, *3*, e000844.
  11. Triant, V.A.; Meigs, J.B.; Grinspoon, S.K. Association of C-Reactive Protein and HIV Infection with Acute Myocardial Infarction. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2009**, *1*, 268–273.
  12. Duprez, D.A.; Neuhaus, J.; Kuller, L.H.; Tracy, R.; Belloso, W.; De Wit, S.; Drummond, F.; Lane, H.C.; Ledergerber, B.; Lundgren, J.; et al. Inflammation, coagulation and cardiovascular disease in HIV-infected individuals. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44454.
  13. Borges, Á.H.; O'Connor, J.L.; Phillips, A.N.; Neaton, J.D.; Grund, B.; Neuhaus, J.; Vjecha, M.J.; Calmy, A.; Koelsch, K.K.; Lundgren, J.D.; et al. Interleukin 6 Is a Stronger Predictor of Clinical Events Than High-Sensitivity C-Reactive Protein or D-Dimer During HIV Infection. *J. Infect. Dis.* **2016**, *214*, 408–416.
  14. Sandler, N.G.; Wand, H.; Roque, A.; Law, M.; Nason, M.C.; Nixon, D.E.; Pedersen, C.; Ruxrungtham, K.; Lewin, S.R.; Emery, S.; et al. Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection. *J. Infect. Dis.* **2011**, *203*, 780–790.
  15. Byakwaga, H.; Boum, Y.; Huang, Y.; Muzoora, C.; Kembabazi, A.; Weiser, S.D.; Bennett, J.; Cao, H.; Haberer, J.E.; Deeks, S.G.; et al. The kynurenine pathway of tryptophan catabolism, CD4+ T-cell recovery, and mortality among HIV-infected Ugandans initiating antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* **2014**, *210*, 383–391.
  16. Klatt, N.R.; Funderburg, N.T.; Brenchley, J.M. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol.* **2013**, *21*, 6–13.
  17. Funderburg, N.T.; Mayne, E.; Sieg, S.F.; Asaad, R.; Jiang, W.; Kalinowska, M.; Luciano, A.A.; Stevens, W.; Rodriguez, B.; Brenchley, J.M.; et al. Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection: Relationship to in vivo coagulation and immune activation. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **2010**, *115*, 161–167.
  18. Browning, L.M.; Krebs, J.D.; Jebb, S.A. Discrimination ratio analysis of inflammatory markers: Implications for the study of inflammation in chronic disease. *Metabolism* **2004**, *53*, 899–903.
  19. Fuertes-Martín, R.; Correig, X.; Vallvé, J.-C.; Amigó, N. Title: Human Serum/Plasma Glycoprotein Analysis by 1H-NMR, an Emerging Method of Inflammatory Assessment. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 354.
  20. Gabay, C.; Kushner, I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 448–454.
  21. Ohtsubo, K.; Marth, J.D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* **2006**, *126*, 855–867.
  22. Van Kooyk, Y.; Rabinovich, G.A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 593–601.
  23. Gruys, E.; Toussaint, M.J.; Niewold, T.A.; Koopmans, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ. SCI* **2005**, *6*, 1045–1056.
  24. Gornik, O.; Lauc, G. Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases. *Dis. Markers* **2008**, *25*, 267–278.
  25. Knobel, H.; Escobar, I.; Polo, R.; Ortega, L.; Martín-Conde, M.T.; Casado, J.L.; Codina, C.; Fernández, J.; Galindo, M.J.; Ibarra, O.; et al. Recommendations from GESIDA/SEFH/PNS to improve adherence to antiviral treatment (2004). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2005**, *23*, 221–231.
  26. Fuertes-Martín, R.; Taverner, D.; Vallvé, J.-C.; Paredes, S.; Masana, L.; Correig Blanchar, X.; Amigó Grau, N. Characterization of <sup>1</sup>H NMR Plasma Glycoproteins as a New Strategy To Identify Inflammatory Patterns in Rheumatoid Arthritis. *J. Proteome Res.* **2018**, *17*, 3730–3739.
  27. Fuertes-Martín, R.; Moncayo, S.; Insenser, M.; Martínez-García, M.Á.; Luque-Ramírez, M.; Grau, N.A.; Blanchar, X.C.; Escobar-Morreale, H.F. Glycoprotein A and B Height-to-Width Ratios as Obesity-Independent Novel Biomarkers of Low-Grade Chronic Inflammation in Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *J. Proteome Res.* **2019**, *18*, 4038–4045.
  28. Otvos, J.D.; Shalaurova, I.; Wolak-Dinsmore, J.; Connelly, M.A.; Mackey, R.H.; Stein, J.H.; Tracy, R.P. GlycA: A Composite Nuclear Magnetic Resonance Biomarker of Systemic Inflammation. *Clin. Chem.* **2015**, *61*, 714–723.
  29. Danesh, J.; Wheeler, J.G.; Hirschfield, G.M.; Eda, S.; Eiriksdottir, G.; Rumley, A.; Lowe, G.D.O.; Pepys, M.B.;
-

- Guðnason, V. C-Reactive Protein and Other Circulating Markers of Inflammation in the Prediction of Coronary Heart Disease. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 1387–1397.
30. Hardikar, S.; Song, X.; Kratz, M.; Anderson, G.L.; Blount, P.L.; Reid, B.J.; Vaughan, T.L.; White, E. Intraindividual variability over time in plasma biomarkers of inflammation and effects of long-term storage. *Cancer Causes Control* **2014**, *25*, 969–976.
  31. Duprez, D.A.; Otvos, J.; Sanchez, O.A.; Mackey, R.H.; Tracy, R.; Jacobs, D.R. Comparison of the Predictive Value of GlycA and Other Biomarkers of Inflammation for Total Death, Incident Cardiovascular Events, Noncardiovascular and Noncancer Inflammatory-Related Events, and Total Cancer Events. *Clin. Chem.* **2016**, *62*, 1020–1031.
  32. Fischer, K.; Kettunen, J.; Würtz, P.; Haller, T.; Havulinna, A.S.; Kangas, A.J.; Soininen, P.; Esko, T.; Tammesoo, M.-L.; Mägi, R.; et al. Biomarker profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy for the prediction of all-cause mortality: An observational study of 17,345 persons. *PLoS Med.* **2014**, *11*, e1001606.
  33. Akinkuolie, A.O.; Buring, J.E.; Ridker, P.M.; Mora, S. A novel protein glycan biomarker and future cardiovascular disease events. *J. Am. Heart Assoc.* **2014**, *3*, e001221.
  34. Kelesidis, T.; Tran, T.T.T.; Stein, J.H.; Brown, T.T.; Moser, C.; Ribaldo, H.J.; Dube, M.P.; Murphy, R.; Yang, O.O.; Currier, J.S.; et al. Changes in Inflammation and Immune Activation with Atazanavir-, Raltegravir-, Darunavir-Based Initial Antiviral Therapy: ACTG 5260s. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *61*, 651–660.
  35. Tibuakuu, M.; Fashanu, O.E.; Zhao, D.; Otvos, J.D.; Brown, T.T.; Haberlen, S.A.; Guallar, E.; Budoff, M.J.; Palella, F.J.; Martinson, J.J.; et al. GlycA, a novel inflammatory marker, is associated with subclinical coronary disease. *AIDS* **2019**, *33*, 547–557.
  36. Rodríguez-Gallego, E.; Gómez, J.; Pacheco, Y.M.; Paire, J.; Viladés, C.; Beltrán-Debón, R.; Mallol, R.; López-Dupla, M.; Veloso, S.; Alba, V.; et al. A baseline metabolomic signature is associated with immunological CD4 + T-cell recovery after 36 months of antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *AIDS* **2018**, *32*, 565–573.
  37. Robbins, G.K.; Spritzler, J.G.; Chan, E.S.; Asmuth, D.M.; Gandhi, R.T.; Rodriguez, B.A.; Skowron, G.; Skolnik, P.R.; Shafer, R.W.; Pollard, R.B. Incomplete Reconstitution of T Cell Subsets on Combination Antiretroviral Therapy in the AIDS Clinical Trials Group Protocol 384. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 350–361.
  38. Pacheco, Y.M.; Jarrín, I.; Del Amo, J.; Moreno, S.; Iribarren, J.A.; Viciano, P.; Parra, J.; Gomez-Sirvent, J.L.; Gutierrez, F.; Blanco, J.R.; et al. Risk factors, CD4 long-term evolution and mortality of HIV-infected patients who persistently maintain low CD4 counts, despite virological response to HAART. *Curr. HIV Res.* **2009**, *7*, 612–619.
  39. Darraj, M.; Shafer, L.A.; Chan, S.; Kasper, K.; Keynan, Y. Rapid CD4 decline prior to antiretroviral therapy predicts subsequent failure to reconstitute despite HIV viral suppression. *J. Infect. Public Health* **2018**, *11*, 265–269.
  40. Pontius, R.G., Jr.; Si, K. The total operating characteristic to measure diagnostic ability for multiple thresholds. *Int. J. Geogr. Inf. Sci.* **2014**, *28*, 570–583.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## Supplemental Table

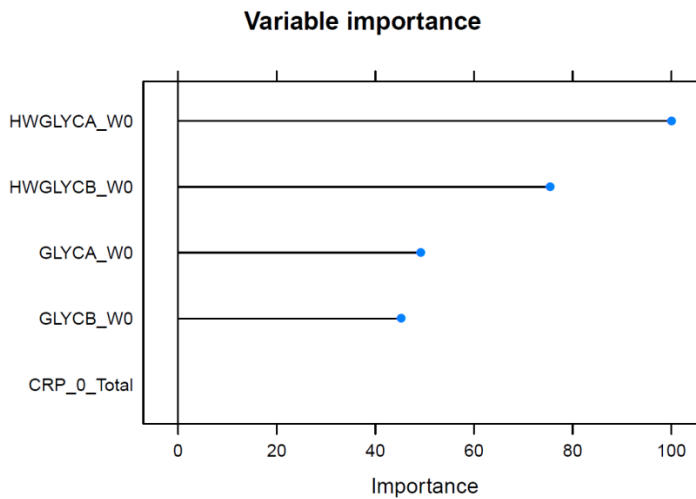
**Table S1.** Spearman correlation coefficients between basal glycoproteins and final CD4<sup>+</sup> T-cells (144 weeks).

	CD4 <sup>+</sup> T-cell	
	r	P value
GlycB	- 0.208	0.003
GlycA	-0.173	0.013
H/W GlycB	-0.209	0.003
H/W GlycA	-0.207	0.003

r, Spearman correlation coefficient.

## Supplementary Figure

**Figure S1.** Random forest analysis. The concentrations and the H/W ratios of GlycA and GlycB in the three stages (week 0, week 48 and week 144) were analyzed. The H/W ratios of GlycA and GlycB at week 0 are the parameters that best differentiated the two basal groups (<200 CD4<sup>+</sup> T-cells/ $\mu$ L vs.> 200 CD4<sup>+</sup> T-cells/ $\mu$ L).



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GLICOPROTEÏNES SÈRIQUES DETERMINADES PER 1 H-RMN COM A MARCADOR D'INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU.  
ESTUDI EN PACIENTS VIH I HF.  
Ana Irene Malo Cerisuelo



# Evolution of Serum Acute-Phase Glycoproteins Assessed by <sup>1</sup>H-NMR in HIV Elite Controllers

OPEN ACCESS

**Edited by:**

Constantinos Petrovas,  
Centre Hospitalier Universitaire  
Vaudois (CHUV), Switzerland

**Reviewed by:**

Mariza Gonçalves Morgado,  
Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz),  
Brazil

Anthony Jaworowski,  
RMIT University, Australia

**\*Correspondence:**

Lluís Masana  
luis.masana@urv.cat  
Anna Rull  
anna.rull@iispv.cat

<sup>†</sup>These authors contributed  
equally to this work and share  
first authorship

<sup>‡</sup>These authors contributed  
equally to this work and share  
senior authorship

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Viral Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 29 June 2021

**Accepted:** 26 August 2021

**Published:** 28 September 2021

**Citation:**

Malo AI, Peraire J, Ruiz-Mateos E,  
Masip J, Amigó N, Alcamí J,  
Moreno S, Girona J, García-Pardo G,  
Reig R, Vidal F, Castro A, Masana L  
and Rull A (2021) Evolution of Serum  
Acute-Phase Glycoproteins Assessed  
by <sup>1</sup>H-NMR in HIV Elite Controllers.  
Front. Immunol. 12:730691.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.730691

Ana-Irene Malo<sup>1†</sup>, Joaquim Peraire<sup>2,3,4,5†</sup>, Ezequiel Ruiz-Mateos<sup>6</sup>, Jenifer Masip<sup>2,3,4</sup>,  
Núria Amigó<sup>4,7,8</sup>, José Alcamí<sup>5,9,10</sup>, Santiago Moreno<sup>5,11</sup>, Josefa Girona<sup>4,8,12</sup>,  
Graciano García-Pardo<sup>2,3,4</sup>, Rosaura Reig<sup>2</sup>, Francesc Vidal<sup>2,3,4,5</sup>, Antoni Castro<sup>1,4,12</sup>,  
Lluís Masana<sup>1,4,8,12\*†</sup> and Anna Rull<sup>2,3,4,5\*†</sup>

<sup>1</sup> Vascular Medicine and Metabolism Unit, Hospital Universitari Sant Joan, Reus, Spain, <sup>2</sup> Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Tarragona, Spain, <sup>3</sup> Infection and Immunity Research Group (INIM), Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Reus, Spain, <sup>4</sup> Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain, <sup>5</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, <sup>6</sup> Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Instituto de Biomedicina de Sevilla-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, <sup>7</sup> Biosfer Teclab, Reus, Spain, <sup>8</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, <sup>9</sup> AIDS Immunopathogenesis Unit, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>10</sup> HIV Unit, Hospital Clinic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, <sup>11</sup> Hospital Universitario Ramón y Cajal Universidad de Alcalá, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain, <sup>12</sup> Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Reus, Spain

Elite controllers (ECs) are an exceptional group of people living with HIV (PLWH) who maintain undetectable viral loads (VLs) despite not being on antiretroviral therapy (ART). However, this phenotype is heterogeneous, with some of these subjects losing virological control over time. In this longitudinal retrospective study, serum acute-phase glycoprotein profile assessed by proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) was determined in 11 transient controllers (TCs) who spontaneously lost virological control and 11 persistent controllers (PCs) who persistently maintained virological control over time. Both PCs and TCs showed similar acute-phase glycoprotein profiles, even when TCs lost the virological control (GlycB,  $p = 0.824$  and GlycA,  $p = 0.710$ ), and the serum acute-phase glycoprotein signature in PCs did not differ from that in HIV-negative subjects (GlycB,  $p = 0.151$  and GlycA,  $p = 0.243$ ). Differences in serum glycoproteins A and B were significant only in ECs compared to HIV-typical progressors (TPs) with  $< 100$  CD4+ T-cells ( $p < 0.001$ ). <sup>1</sup>H-NMR acute-phase glycoprotein profile does not distinguish TCs from PCs before the loss of viral control. ECs maintain a low-grade inflammatory state compared to TPs. PCs revealed a closer serum signature to HIV-negative subjects, reaffirming this phenotype as a closer model of functional control of HIV.

**Keywords:** elite controllers, HIV, inflammation, acute-phase glycoproteins, proton nuclear magnetic resonance

## INTRODUCTION

Elite controllers (ECs) are a select group of people living with HIV (PLWH) who maintain a circulating viral load (VL) at undetectable levels without antiretroviral treatment (ART) (1, 2). This exceptional characteristic makes ECs a good pathogenic model for the functional control of HIV (3, 4). However, ECs consist of a heterogeneous population in terms of virological, immunological and clinical outcomes over time (5–7). Some of them maintain strong virological and immunological control for years and are called persistent controllers (PCs) while others lose virological control over time and are known as transient controllers (TCs).

Although it was once thought that ECs could have a favorable short- and long-term prognosis, recent real-life data have revealed that ECs are at increased risk of several non-AIDS events (7). Notably it is that most of these events have been pathogenically related to the subclinical low-level inflammatory state due to HIV itself (8). This fact provides the rationale behind the recommendation for initiating ART in ECs suggested by some authorities to reverse this subclinical inflammatory state (5). With respect to this issue, a major weakness is the lack of appropriate inflammatory biomarkers that could predict low-level inflammation in the long term. The inflammatory state in PLWH is usually assessed through the determination of C-reactive protein (PCR) or IL-6 in plasma, among other biomarkers (9). These molecules are easy to assess but are labile and subject to large variations if new conditions occur; hence, although useful, several limitations do exist that decrease their value.

In recent years serum glycoproteins have emerged as potential markers of inflammation-associated diseases (10–13). The composite nature of <sup>1</sup>H-NMR serum glycoprotein measurement encompasses the systemic inflammatory process more comprehensively than other individual biomarkers (14, 15). It is a technique that globally identifies glycosylated proteins, which increase their concentration and modify their structure during inflammatory processes. Thus, a small subset of various acute phase glycoproteins that are more abundant in circulation (16, 17) makes meaningful contributions to the glycoprotein A (GlycA) signal and glycoprotein B (GlycB) signal. Of note, previous studies suggested that GlycA better captures systemic inflammation even more than C-reactive protein (CRP), a widely used classical inflammatory marker (18). Circulating GlycA elevations in inflammatory states could reflect the increased concentrations of I-acid glycoprotein, haptoglobin, I-antitrypsin, I-antichymotrypsin, and transferrin. Hence, the advantage offered by GlycA than the conventional CRP is that it may integrate more multiple inflammatory pathways by capturing the global signal of several proteins and, therefore, better captures the degree of systemic inflammation. On the other hand, the measurement of GlycA presents higher reliability and lower intra-individual variability because its measures are similar in both serum and plasma samples, in fasting and non-fasting states, and also after short or long-term storage (18).

We and others have previously shown serum glycoproteins to be useful diagnostic biomarkers in PLWH (19–21). The baseline

serum glycoprotein signature by <sup>1</sup>H-NMR predicted the immunological response to ART in typical HIV progressors, emphasizing the role of inflammation mediators in poor recovery status (19). Here, we analyze the evolution of serum acute-phase glycoproteins in a cohort of ECs containing both PCs and TCs, compared to a group of HIV-typical progressors and a group of healthy HIV-negative participants. We aimed to evaluate whether there is altered expression of these inflammation-related molecules associated with phenotypic evolution in ECs. Understanding the molecular pathways associated with ECs heterogeneity would be crucial to balance the risks and benefits of ART in ECs.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Design and Participants

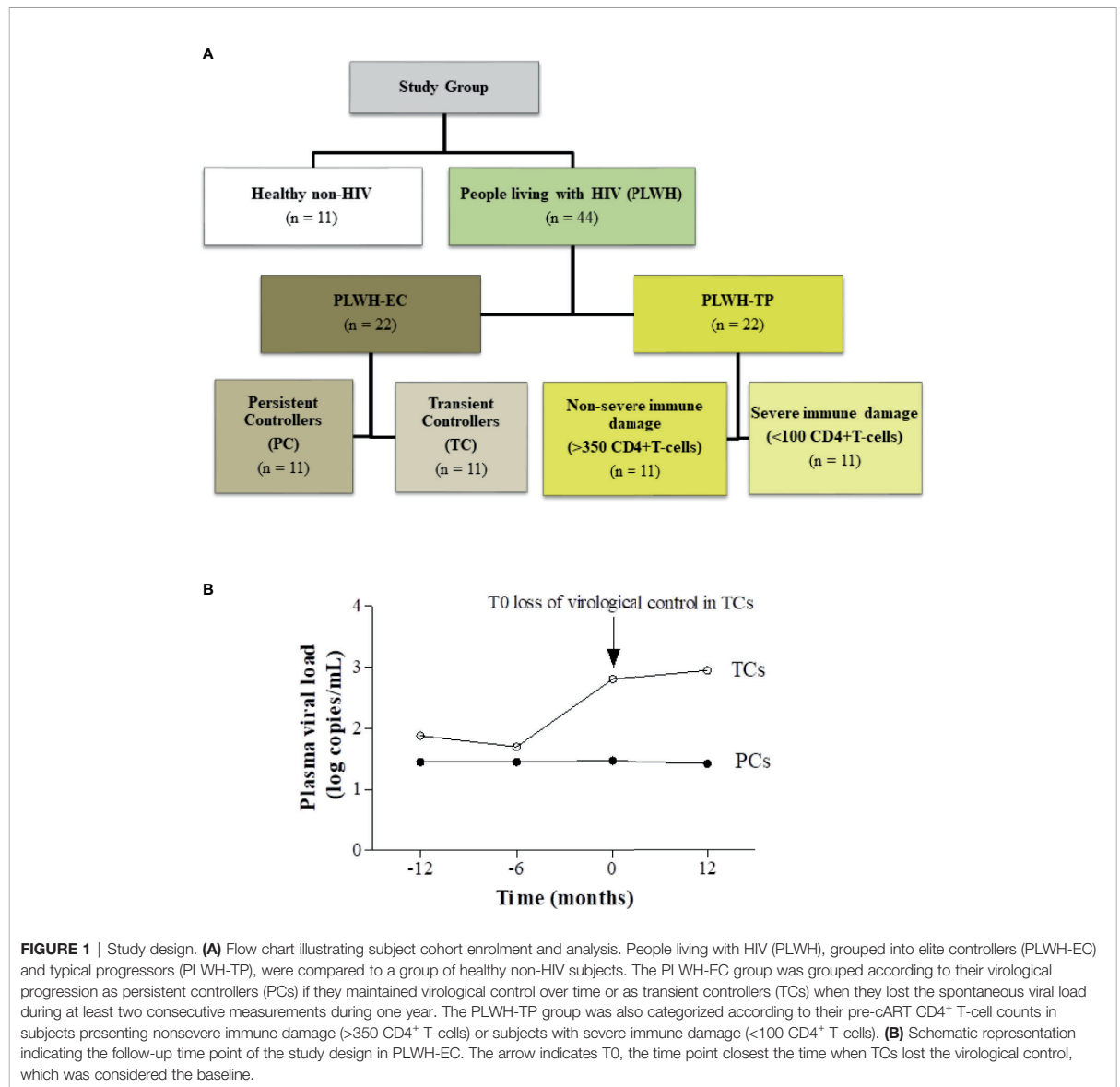
According to the study design, frozen serum samples from the Spanish HIV HGM biobank belonging to the AIDS Research Network (RIS) (22) were included and the data were recorded in the RIS cohort of the HIV Controllers Study Group (ECRIS) (5).

Twenty-two elite controllers (ECs) were selected, defined as subjects who in the absence of prior or current ART since HIV diagnosis and during the 36 months of the follow-up maintained an undetectable VL. Two groups were distinguished: 11 ECs who lost spontaneous viral load control, defined by detection at least two consecutive measurements above 50 HIV-RNA copies/mL within a year (TCs); and 11 ECs who maintained virological control throughout the follow-up (PCs), as previously described (23).

Regarding the glycoprotein profile, repeated analyses were performed during the follow-up in TCs: two years before the loss of virological control, one year before the loss of virological control (T-1), 6 months before the virological control, at the moment when viral load was detected (T0) and subsequently at one year after the spontaneous loss of control (T+1). In PCs, repeated analyses were also performed at least at two different time points, but no differences were found in the glycoprotein profiles during any of the follow-ups. Thus, median values were calculated and identified as T0 for the PC group (**Figure 1**).

Two other cohorts of patients were included in the study: healthy HIV-negative-subjects and PLWH with a typical disease progression pattern (TP), matched by sex and age with ECs (24). For the PLWH-TP group, eleven patients were defined as HIV-typical progressors with severe immunosuppression (< 100 CD4<sup>+</sup> T-cells at starting ART) and HIV-typical progressors with non-severe immunosuppression (> 350 CD4<sup>+</sup> T-cells at starting ART) (**Figure 1**) (24). Serum glycoproteins for PLWH-TP were analyzed at baseline before ART onset (T0).

All the selected patients had be age over 18 years and no had concomitant acute or chronic conditions or was taking drugs (NSAID, steroids, immunomodulators) that could eventually modify the inflammatory status when the blood samples were collected.



### Glycoprotein Analysis by <sup>1</sup>H-NMR

Samples were prepared and analysed by <sup>1</sup>H-NMR for glycoprotein profiling as previously reported (12, 19). The resonance spectra were recorded at 310 K in a Bruker Avance III 600 spectrometer at a proton frequency of 600.20 MHz (14.1 T). GlycA and GlycB are different functions depending on the chemical changes in the glycoproteins that resonate in a region of the spectrum analysed at 2.15-1.90 ppm. The total area of each function, which is translated into a concentration according to the number of sugar-protein bonds, was analysed. The number of acetyl groups of the bonds of N-acetylglucosamine and

N-acetylgalactosamine, and N-acetylneuraminic acid is reflected by the concentration of Glyc A and GlycB, respectively. The associated height/width ratios of GlycA and GlycB (H/W) were also calculated. They are associated with the peaks of the signals that are generated by 1H-NMR and that reflect the state of aggregation or the flexibility of the sugar-protein bonds (12).

### Statistical Analysis

The continuous variables presented a non-normal distribution due to the small sample size. Data are expressed as medians and 25th and 75th percentiles. Categorical variables are expressed as

percentages. Differences between two groups were analysed using the nonparametric Mann-Whitney test, and for multiple comparisons one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test was applied. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with SPSS software, version 25 (IBM, Madrid, Spain), and graphical representations were generated with GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad Inc., San Diego, CA, USA).

### Ethics

The study and all of the research protocols were conducted in accordance with the recommendations of the Ethical and Scientific Committees, and all of them were approved by the Committee for Ethical Clinical Research by following the rules of Good Clinical Practice from the Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (CEIM 041/2019). The CEIM IISPV is an independent committee, consisting of health and non-health professionals that supervise the correct compliance to the ethical principles governing clinical trials and research projects that are performed in our region, specifically in terms of methodology, ethics and laws. An informed consent form signed by each participant was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki and which includes the allowance to use the samples stored in the Biobank for related biomedical research projects.

## RESULTS

### Patient Characteristics

A flow chart illustrating patient enrolment and categorization is shown in **Figure 1A**. **Figure 1B** details a schematic representation of the study design and categorization in PLWH-EC. Clinical characteristics at T0 are presented in **Table 1**. At that time, defined by the loss of control in TC subjects, no differences were observed in age, sex, transmission route, HCV coinfection, CD4<sup>+</sup> T-cell or CD8<sup>+</sup>T-cell counts between TCs and PCs. The T0 since HIV diagnosis was not statistically significant between TCs than PCs (*P*=0.061).

### Stability in the Serum Glycoprotein Profile Before the Loss of Viral Control

To predict the loss of control in TCs, serum glycoprotein concentration and H/W ratios analyzed at 24 months, 12 months and 6 months before the loss of control in TCs were compared to T0 values in the PC group. No differences were observed among the groups of studies and thus, we selected data from 12 months before the loss of control (T-1) as the representative value for TCs (**Table 2**). Then, the serum glycoprotein profile at time when viral load was detected in TCs (T0) was also compared to T0 from the PC group. Acute-

**TABLE 1** | Clinical characteristics of the study cohort.

	PLWH-EC		P-value*	PLWH-TP		Non-HIV (n = 11)	P-value**
	PCs (n = 11)	TCs (n = 11)		>350 (n = 11)	<100 (n = 11)		
Age (years)	47 [43-50]	45 [38-56]	0.605	43 [37-47]	42 [34-48]	52 [36-53]	0.502
Male, n (%)	6 (55)	6 (55)	0.612	8 (73)	7 (63)	7 (63)	0.898
Risk factor, n (%)			0.370			–	0.012
Heterosexual	3 (27)	4 (36)		5 (45)	8 (73)		
Homo/Bisexual	2 (18)	2 (18)		6 (55)	2 (18)		
Intravenous drug abuse	6 (55)	3 (27)		–	1 (9)		
Other/Unknown	–	2 (18)		–	–		
Time since diagnosis (years)	18 [13-23]	10 [5-19]	0.061	–	–	–	–
HCV RNA detected, n (%)	4 (36)	5 (45)	0.856	–	2 (18)	–	0.001
CD4+ T-cell count (cells/μL)	651 [442-950]	720 [414-951]	0.748	408 [371-578]	38 [7-62]	–	<0.001
CD8+ T-cell count (cells/μL)	768 [553-1082]	743 [945-1224]	0.387	1217 [900-1570]	669 [400-925]	–	<0.001
CD4:CD8 ratio	1.1 [0.5-1.4]	0.8 [0.6-1.2]	0.557	0.5 [0.3-0.6]	0.1 [0.1-0.2]	–	<0.001

T0 in PLWH-ECs is defined by the loss of control in transient controllers (TCs) and the initiation of ART in PLWH-TP. Data are presented as n (%) or median (interquartile range). \*Categorical data were compared by means of a  $\chi^2$  test, whereas continuous data were compared using non-parametric Mann-Whitney test between PCs and TCs, and between all PLWH-EC, PLWH-TP and non-HIV subjects with nonparametric Kruskal-Wallis (KW) adjusted by Bonferroni post-hoc approach \*\*. *P* value < 0.05 was considered significant. EC, Elite controller; Glyc, glycoprotein; H/W, height/width glycoprotein ratio; PC, Persistent controller; PLWH, Person living with HIV; TC, Transient controller.

**TABLE 2** | Plasma glycoprotein analysis in PLWH-EC.

	PC		TC		P-value*	
	T0 (n = 11)	T-1 (n = 10)	T0 (n = 11)	PC T0 vs TC T-1	PC T0 vs TC T0	
Glyc B (μmol/L)	400.8 [356.0-443.5]	410.9 [375.1-455.5]	404.0 [373.6-462.5]	0.756	0.824	
Glyc A (μmol/L)	746.2 [638.7-887.8]	795.3 [706.2-848.5]	789.1 [718.9-914.2]	0.918	0.710	
H/W Glyc A	5.0 [4.5-5.6]	5.2 [4.7-5.7]	5.1 [4.7-5.8]	0.756	0.824	
H/W Glyc B	18.3 [15.9-20.8]	18.7 [17.7-20.8]	20.1 [17.8-20.8]	0.426	0.331	

T0 in PC shows median values from at least two different time-points during the follow-up in this group of study. In TC, T-1 corresponds to one year before the loss of viral control and T0 is defined by the closest moment where viral load was detected. \*Data was compared using non-parametric Mann-Whitney test between PC and TC in each different time-point for TC. Glyc, glycoprotein; H/W, height/width glycoprotein ratio; PC, Persistent controller; PLWH-EC, Person living with HIV defined as elite controller; TC, Transient controller.

phase glycoprotein analysis revealed similar serum glycoprotein A (Glyc A) and B (Glyc B) concentrations, as well as H/W ratios, in TCs and PCs (Table 2). However, at the point when TCs revealed viral rebound, the H/W GlycA ratio showed a significant, positive association with VL in this group of patients ( $\rho=0.683$ ,  $P=0.042$ ).

### Serum Glycoprotein Signature in PCs Closer to Healthy HIV-Negative Individuals

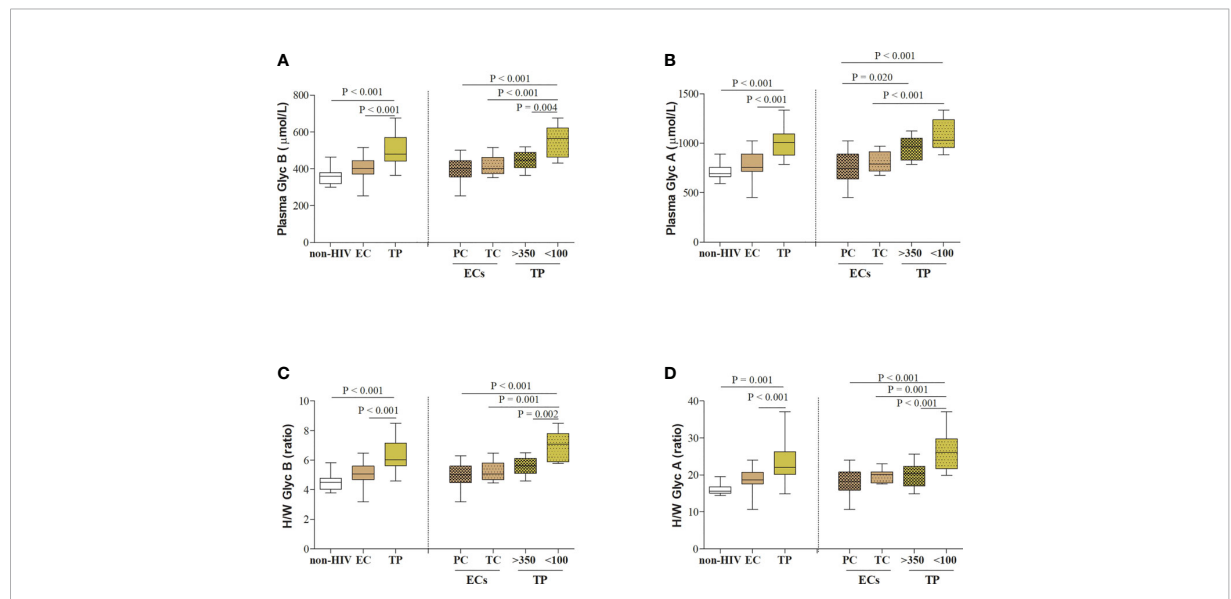
Next, serum acute-phase glycoproteins in PCs and TCs at T0 were compared to a control group of healthy HIV-negative individuals ( $n=11$ ), matched by sex and age (Figure 2 and Supplemental Table 1). Serum Glyc B and Glyc A concentrations and H/W Glyc B and Glyc A ratios were lower in HIV-negative subjects than in the PLWH-EC group (GlycB, 358.8 vs. 402.4, respectively,  $P=0.044$ ; GlycA, 691.4 vs. 757.5, respectively,  $P=0.054$ ; H/W Glyc B, 4.5 vs. 5.1, respectively,  $P=0.049$ ; H/W Glyc A, 15.7 vs. 18.7, respectively,  $P=0.002$ ). However, when the serum glycoprotein signature in healthy HIV-negative subjects was separately compared to each group of PLWH-EC, only the difference in TCs remained significant compared to the group of healthy HIV-negative subjects (Figure 2 and Supplemental Table 1). PC did not show a

glycoprotein profile significantly different from HIV-negative subjects.

### Similar Glycoproteins for PLWH-EC and Typical Progressors With > 350 CD4<sup>+</sup> T-Cells

We included in the present work 22 PLWH-TPs coming from a previously described cohort (24). For this study, a group of typical HIV-progressors (PLWH-TP) were matched by sex (68% male,  $P=0.268$ ) and age (42 [37-47],  $P=0.78$ ) with the study cohort of PLWH-EC at T0. As expected, PLWH-TP showed lower CD4<sup>+</sup> T-cell counts and increased VL compared to PLWH-EC (CD4<sup>+</sup> T-cell counts 272.0 [31.5-443.0] cells/ $\mu$ L in TPs,  $P=0.001$  and 5.46 [4.61-5.60] log copies/mL in TP,  $P<0.001$ ). PLWH-TP showed higher serum glycoprotein concentrations and H/W ratios than the PLWH-EC group (Figure 2): GlycB, 478.9 vs. 402.4, respectively,  $P<0.001$ ; GlycA, 1007.9 vs. 757.5, respectively,  $P<0.001$ ; H/W Glyc B, 6.02 vs. 5.06, respectively,  $P<0.001$ ; H/W Glyc A, 22.05 vs. 18.68, respectively,  $P=0.001$ .

When PLWH-TP were grouped according to their CD4<sup>+</sup> T-cell counts at T0 (starting cART), serum Glyc A and Glyc B concentration and H/W Glyc A and Glyc B ratios resulted significantly higher in TP with < 100 CD4<sup>+</sup> T-cells



**FIGURE 2 |** Serum acute-phase glycoprotein profile in PLWH. (A) Serum glycoprotein B and (B) glycoprotein A concentrations, and (C) height/width ratios for glycoprotein B and (D) glycoprotein A are represented for HIV-elite controllers (ECs) and HIV-typical progressors (TPs) and healthy HIV-negative individuals ( $n=11$ ), matched by sex and age. PLWH in each different cohort of HIV studies (PLWH-EC and PLWH-TP) were also classified according to the viral control or the pre-cART CD4<sup>+</sup> T-cell counts, respectively. For PLWH-EC, data for PCs corresponded to median values from at least two different time points (T0), and data for TCs corresponded to the closest moment to the loss of viral control. For PLWH-TP, data from T0 corresponded to the moment when subjects were enrolled in the study and started their first ART (pre-ART). Thus, PLWH-TP were classified in subjects presenting nonsevere immune damage (>350 CD4<sup>+</sup> T-cells) or subjects with severe immune damage (<100 CD4<sup>+</sup> T-cells). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Data are re-presented as boxes and whiskers (min to max values). EC, elite controller; Glyc, glycoprotein; H/W, height/width glycoprotein ratio; non-HIV, healthy HIV-negative individuals; PC, persistent controller; PLWH, people living with HIV; TC, transient controller; TP, typical progressor.



compared to both, PC and TCs (Figure 2). This was not the case for the group of TP with > 350 CD4<sup>+</sup> T-cells, in which no differences were found in serum glycoprotein profile except for GlycA concentration when compared with PC P = 0.020 (Figure 2).

### Longitudinal Glycoprotein Profile in TC, From Viral Control to Viral Rebound

Serum glycoprotein evolution in TC, from 24 months before to one year after the loss of virological control (T+1), was also evaluated in a longitudinal analysis. VL evolution from TC after one year of loss of control was not significantly different from baseline (T0) (3.24 [2.30-4.00] log copies/mL at T+1, P =0.612) or the decrease in the CD4<sup>+</sup> T-cell counts (516.0 [407.5-835.0] log copies/mL at T+1, P =0.499). However, TC showed a slightly decreased acute-phase glycoprotein profile at one year compared to T0, although the results were only significant for serum GlycA concentrations (P = 0.05). In fact, after one year of viral rebound (T+1), the serum glycoprotein profile in TCs (716.7 [671.4-835.5] μmol/L) became more similar to the serum glycoprotein profile of PCs at T0 (746.2 [638.7-887.8] μmol/L), although maintained a sustained low-grade inflammation in PLWH-EC compared to HIV-negative individuals (691.4 [664.8 - 755.5] μmol/L) (Figure 3).

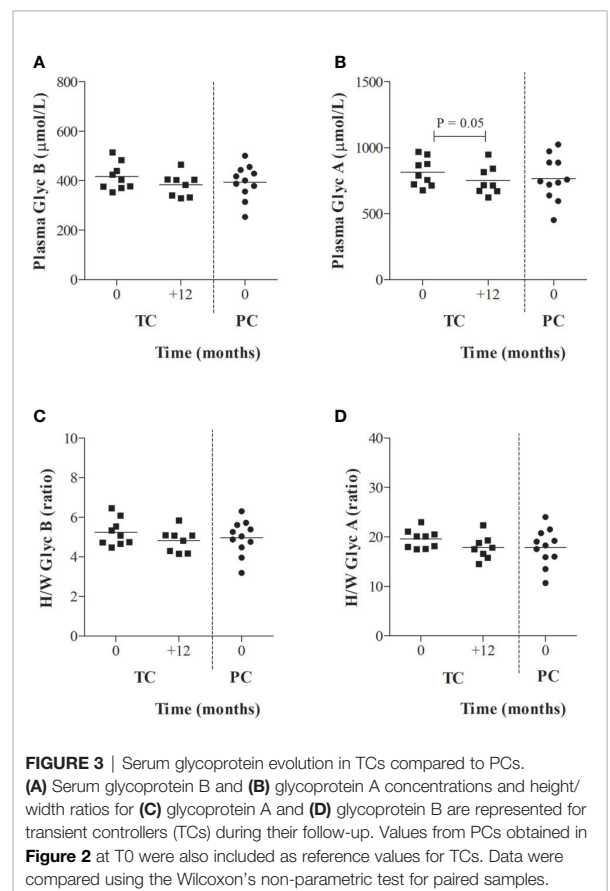
### DISCUSSION

The loss of spontaneous viral control in TC has been extensively investigated. According to different publications, it seems that there is no single mechanism responsible for controlling viral replication. This situation could be associated with genetic factors in the host (mainly HLA class I, such as HLA-B \* 57) (25), low polyfunctionality of Gag-specific T cells (26) alteration of T cell homeostasis (6), high viral diversity (26), the suppressive capacity of HIV-1 (27) and immunological mechanisms (elevated inflammatory cytokines (28), and chemokines and cytolytic enzymes as a response of the specific T cells of HIV-1). In this sense, a specific proteomic signature that analysed proteins involved in pro-inflammatory pathways (clotting factor XI, alpha-1-antymotrypsin, ficolin-2, protein 14-3-3, and galectin-binding protein-3 were considered potential biomarkers) predicted that PLWH-EC would lose control over viral load (29).

In this work, we studied the serum glycoprotein profile determined by <sup>1</sup>H-NMR in PLWH-EC. Low-grade inflammation seems to remain present in PLWH-EC and is one of the reasons why the use of antiretrovirals is debated despite spontaneous suppression of the virus. In our previous work, glycoproteins were prognostic of immune recovery in PLWH (19) and were shown to be a true reflection of the inflammatory state. This finding is based on an increase in the concentration and structure of glycosylated proteins in inflammatory states, increasing the branching and number of monosaccharide residues, including N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine (GlycA) and N-acetylneuraminic acid

(GlycB) among others (29). They are considered more stable inflammatory markers since they are compounds of several different acute phase proteins (transferrin, haptoglobin, α1 acid glycoprotein, α1 antitrypsin, α1 antitrypsin) (18). In fact, the measurement of glycoproteins presents high reliability and low intra-individual variability because its measures are similar in both serum and plasma samples, in fasting and non-fasting states, and also after short or long-term storage (30).

In the present study, we observed that the glycoprotein profile remained the same between PC and TC individuals prior to the spontaneous loss of viral control. However, a significant association of H/W GlycA was observed with viral load in TCs once they lost viral control (T0). This finding is in line with previous publications (19) in which glyco-proteins showed a marked association with viral load. PLWH-EC presented glycoprotein levels higher than those of healthy non-HIV individuals. However, when compared separately, PC and healthy non-HIV individuals did not show differences in the glycoprotein profiles, demonstrating an inflammatory status of PCs similar to that of uninfected individuals. Only TCs showed differences in glycoprotein levels compared to healthy patients. This finding reflects the low-grade inflammation that occurs in



**FIGURE 3 |** Serum glycoprotein evolution in TCs compared to PCs. (A) Serum glycoprotein B and (B) glycoprotein A concentrations and height/width ratios for (C) glycoprotein A and (D) glycoprotein B are represented for transient controllers (TCs) during their follow-up. Values from PCs obtained in Figure 2 at T0 were also included as reference values for TCs. Data were compared using the Wilcoxon's non-parametric test for paired samples.



parallel with the loss of spontaneous viral control and is responsible for non-AIDS comorbidities (8). The presence of low-grade inflammation in the absence of suppression of viral replication is also evidenced when comparing PLWH-TP with PLWH-EC, in which the concentration of glycoproteins and their proportions were higher in the PLWH-TP (the latter had higher CV and lower CD4<sup>+</sup> levels). In short, as seen in previous publications, a higher level of glycoproteins will be associated with decreased CD4 counts and higher viral load. This outcome is also reflected when separating the TPs into subgroups, in which the subgroup with the best immune status (CD4<sup>+</sup> T-cell > 350) presented a glycoprotein profile more similar to the PLWH-EC compared to the group of PLWH-TP with severe immune damage (CD4<sup>+</sup> T-cell < 100 cells/ $\mu$ L).

The main limitation of the study is the small number of subjects in each arm of the study design which probably means there was insufficient power to detect significant predictive value of the GlycA and B measures, since in previous studies they did predict immune recovery (19). However, elite controllers are an exceptional population within PLWH, and small sample sizes are common in these population studies. The relation to other HIV cohorts and HIV negatives (healthy volunteers) was used to enhance the information regarding the ECs. And since the statistical power is highest when the groups have equal sample sizes, we selected the same number of participant for the other subsets. But larger cohort studies are needed to establish whether 1H-NMR glycoproteins might be of value in predicting loss of spontaneous viral control. Another limitation was lack of data presented on potential confounders for measures of inflammation, particularly tobacco use (31).

## CONCLUSIONS

High concentrations of glycoproteins determined by <sup>1</sup>H-NMR have been associated, within the same disease, with worse states (29). To the best of our knowledge, this study is the first with elite controllers that provides an insight into their inflammatory status using this novel method of <sup>1</sup>H-NMR glycoprotein determination. In this work, we observed that glycoproteins remain at normal levels or are elevated depending on the viral control and immunological status of the patients.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Insitut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (CEIm-IISPV). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the article and approved the submitted version. The authors contributions are as follows: experimental design (AIM, JM, FV, ER-M, LM, and AR) and intellectual guidance (JA, SM, JG, RR, and AC). recruitment of subjects (JP and ER-M) and sample procurement (AIM and JM). Data collection (AIM and NA). data analysis and interpretation (AIM, JM, and AR). manuscript preparation (AIM and JM). AI-M, JM, AC, FV, LM, and AR were responsible for the study design, data analysis, and article development. FV, LM and AR reviewed and edited the manuscript.

## FUNDING

This research was funded by the Fondo de Investigacion Sanitaria [PI16/00503, PI19/01337 and PI20/00326]-ISCIII-FEDER (co-funded by the European Regional Development Fund/European Social Fund; "A way to make Europe"/"Investing in your future"); Programa de Suport als Grups de Recerca AGAUR (2017SGR948); the SPANISH AIDS Research Network [RD12/0017/0005, RD12/0025/0001, RD16/0025/0006]-ISCIII-FEDER (Spain) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas-ISCIII [CB21/13/00015, CB21/13/00020, CB13/21/00086], Madrid, Spain. JM is supported by the Universitat Rovira i Virgili under grant agreement "2019PMF-PIPF-18," through the call "Martí Franquès Research Fellowship Programme". FV is supported by grants from the Programa de Intensificació de Investigadores (INT20/00031)-ISCIII. AR is supported by a grant from IISPV through the project "2019/IISPV/05" (Boosting Young Talent), by GeSIDA through the "III Premio para Jóvenes Investigadores 2019" and by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) under grant agreement "CP19/00146" through the Miguel Servet Program.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study would not have been possible without the collaboration of all the patients and medical and nursing staff who have taken part in the project. We also acknowledge the BioBanc IISPV (B.0000853 + B.0000854) integrated in the Spanish National Biobanks Platform (PT20/00197) for its collaboration and CERCA Programme (Generalitat de Catalunya), ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network, and Biosfer Teslab, a spin-off company of Universitat Rovira i Virgili (URV) and Institut d'Investigacions Sanitàries Pere Virgili (IISPV). The comments and criticisms of the two reviewers helped us for improving the manuscript and are greatly appreciated.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.730691/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Deeks SG, Walker BD. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity* (2007) 27:406–16. doi: 10.1016/j.immuni.2007.08.010
- Navarrete-Muñoz MA, Restrepo C, Benito JM, Rallón N. Elite Controllers: A Heterogeneous Group of HIV-Infected Patients. *Virulence* (2020) 11:889–97. doi: 10.1080/21505594.2020.1788887
- Casado C, Galvez C, Pernas M, Tarancon-Diez L, Rodriguez C, Sanchez-Merino V, et al. Permanent Control of HIV-1 Pathogenesis in Exceptional Elite Controllers: A Model of Spontaneous Cure. *Sci Rep* (2020) 10:1902. doi: 10.1038/s41598-020-58696-y
- Lopez-Galindez C, Pernas M, Casado C, Olivares I, Lorenzo-Redondo R. Elite Controllers and Lessons Learned for HIV-1 Cure. *Curr Opin Virol* (2019) 38:31–6. doi: 10.1016/j.coviro.2019.05.010
- Dominguez-Molina B, Leon A, Rodriguez C, Benito JM, Lopez-Galindez C, Garcia F, et al. Analysis of Non-AIDS-Defining Events in HIV Controllers. *Clin Infect Dis* (2016) 62:1304–9. doi: 10.1093/cid/ciw120
- Benito JM, Ortiz MC, León A, Sarabia LA, Ligos JM, Montoya M, et al. Class-Modeling Analysis Reveals T-Cell Homeostasis Disturbances Involved in Loss of Immune Control in Elite Controllers. *BMC Med* (2018) 16:30. doi: 10.1186/s12916-018-1026-6
- Ruiz-Mateos E, Poveda E, Lederman MM. Antiretroviral Treatment for HIV Elite Controllers? *Pathog Immun* (2020) 5:121–33. doi: 10.20411/pai.v5i1.364
- Sokoya T, Steel HC, Nieuwoudt M, Rossouw TM. HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediators Inflammation* (2017) 2017:6825493. doi: 10.1155/2017/6825493
- Justice AC, Erlandson KM, Hunt PW, Landay A, Miotti P, Tracy RP. Can Biomarkers Advance HIV Research and Care in the Antiretroviral Therapy Era? *J Infect Dis* (2018) 217:521–8. doi: 10.1093/infdis/jix586
- Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute Phase Reaction and Acute Phase Proteins. *J Zhejiang University Sci B* (2005) 6:1045–56. doi: 10.1631/jzus.2005.B1045
- Gornik O, Lauc G. Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases. *Dis Markers* (2008) 25:267–78. doi: 10.1155/2008/493289
- Fuertes-Martin R, Taverner D, Vallvé J-C, Paredes S, Masana L, Correig Blanchar X, et al. Characterization of 1 H NMR Plasma Glycoproteins as a New Strategy To Identify Inflammatory Patterns in Rheumatoid Arthritis. *J Proteome Res* (2018) 17:3730–39. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00411
- Fuertes-Martin R, Moncayo S, Insenser M, Martínez-García MÁ, Luque-Ramírez M, Grau NA, et al. Glycoprotein A and B Height-To-Width Ratios as Obesity-Independent Novel Biomarkers of Low-Grade Chronic Inflammation in Women With Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *J Proteome Res* (2019) 18:4038–45. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00528
- Duprez DA, Otvos J, Sanchez OA, Mackey RH, Tracy R, Jacobs DR. Comparison of the Predictive Value of GlycA and Other Biomarkers of Inflammation for Total Death, Incident Cardiovascular Events, Noncardiovascular and Noncancer Inflammatory-Related Events, and Total Cancer Events. *Clin Chem* (2016) 62:1020–31. doi: 10.1373/clinchem.2016.255828
- Akinkuolie AO, Buring JE, Ridker PM, Mora SA. Novel Protein Glycan Biomarker and Future Cardiovascular Disease Events. *J Am Heart Assoc* (2014) 3:e001221. doi: 10.1161/JAHA.114.001221
- Gabay C, Kushner I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N Engl J Med* (1999) 340:448–54. doi: 10.1056/NEJM199902113400607
- Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* (2006) 126:855–67. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.019
- Malo A-I, Rull A, Girona J, Domingo P, Fuertes-Martin R, Amigó N, et al. Glycoprotein Profile Assessed by 1H-NMR as a Global Inflammation Marker in Patients With HIV Infection. A Prospective Study. *J Clin Med* (2020) 9:1344. doi: 10.3390/jcm9051344
- Otvos JD, Shalauraova I, Wolak-Dinsmore J, Connelly MA, Mackey RH, Stein JH, et al. GlycA: A Composite Nuclear Magnetic Resonance Biomarker of Systemic Inflammation. *Clin Chem* (2015) 61:714–23. doi: 10.1373/clinchem.2014.232918
- Kelesidis T, Tran TTT, Stein JH, Brown TT, Moser C, Ribaldo HJ, et al. Changes in Inflammation and Immune Activation With Atazanavir-, Raltegravir-, Darunavir-Based Initial Antiviral Therapy: ACTG 5260s. *Clin Infect Dis* (2015) 61:651–60. doi: 10.1093/cid/civ327
- Tibuakuu M, Fashanu OE, Zhao D, Otvos JD, Brown TT, Haberen SA, et al. GlycA, a Novel Inflammatory Marker, Is Associated With Subclinical Coronary Disease. *AIDS* (2019) 33:547–57. doi: 10.1097/QAD.0000000000002079
- García-Merino I, de Las Cuevas N, Jiménez JL, Gallego J, Gómez C, Prieto C, et al. Spanish HIV BioBank The Spanish HIV BioBank: A Model of Cooperative HIV Research. *Retrovirology* (2009) 6:27. doi: 10.1186/1742-4690-6-27
- Tarancon-Diez L, Rodriguez-Gallego E, Rull A, Peraire J, Viladés C, Portilla I, et al. Immunometabolism Is a Key Factor for the Persistent Spontaneous Elite Control of HIV-1 Infection. *EBioMedicine* (2019) 42:86–96. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.03.004
- Yeregui E, Viladés C, Domingo P, Ceausu A, Pacheco YM, Veloso S, et al. High Circulating SDF-1 and MCP-1 Levels and Genetic Variations in CXCL12, CCL2 and CCR5: Prognostic Signature of Immune Recovery Status in Treated HIV-Positive Patients. *EBioMedicine* (2020) 62:103077. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103077
- Miguel SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, et al. HLA B\*5701 Is Highly Associated With Restriction of Virus Replication in a Subgroup of HIV-Infected Long Term Nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97:2709–14. doi: 10.1073/pnas.050567397
- Pernas M, Tarancon-Diez L, Rodriguez-Gallego E, Gómez J, Prado JG, Casado C, et al. Factors Leading to the Loss of Natural Elite Control of HIV-1 Infection. *J Virol* (2018) 92:e01805-17. doi: 10.1128/JVI.01805-17
- Walker-Sperling VE, Pohlmeier CW, Veenhuis RT, May M, Luna KA, Kirkpatrick AR, et al. Factors Associated With the Control of Viral Replication and Virologic Breakthrough in a Recently Infected HIV-1 Controller. *EBioMedicine* (2017) 16:141–9. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.01.034
- Noel N, Lerolle N, Lécroux C, Goujard C, Venet A, Saez-Cirion A, et al. Immunologic and Virologic Progression in HIV Controllers: The Role of Viral “Blips” and Immune Activation in the ANRS CO21 CODEX Study. *PLoS One* (2015) 10:e0131922. doi: 10.1371/journal.pone.0131922
- Rodriguez-Gallego E, Tarancon-Diez L, García F, Del Romero J, Benito JM, Alba V, et al. Proteomic Profile Associated With Loss of Spontaneous Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Control. *J Infect Dis* (2019) 219:867–76. doi: 10.1093/infdis/jiy599
- Fuertes-Martin R, Correig X, Vallvé J-C, Amigó N. Title: Human Serum/Plasma Glycoprotein Analysis by 1H-NMR, an Emerging Method of Inflammatory Assessment. *J Clin Med* (2020) 9:354. doi: 10.3390/jcm9020354
- Kelesidis T, Zhang Y, Tran E, Sosa G, Middlekauff HR. Expression of Key Inflammatory Proteins Is Increased in Immune Cells From Tobacco Cigarette Smokers But Not Electronic Cigarette Vapers: Implications for Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* (2021) 10:e019324. doi: 10.1161/JAHA.120.019324

**Conflict of Interest:** NA is stockowner of Biosfer Teslab, the company that commercializes the glycoprotein profiling described in the present manuscript.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher’s Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Malo, Peraire, Ruiz-Mateos, Masip, Amigó, Alcamí, Moreno, Girona, García-Pardo, Reig, Vidal, Castro, Masana and Rull. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



**Supplementary Material**

Article

**EVOLUTION OF SERUM ACUTE-PHASE GLYCOPROTEINS ASSESSED BY 1H-NMR IN HIV ELITE CONTROLLERS**

Ana-Irene Malo<sup>†</sup>, Joaquim Peraire<sup>‡</sup>, Ezequiel Ruiz-Mateos, Jenifer Masip, Núria Amigó, José Alcamí, Santiago Moreno, Josefa Girona, Graciano García-Pardo, Rosaura Reig, Francesc Vidal, Antoni Castro, Lluís Masana<sup>†‡</sup> and Anna Rull<sup>†‡</sup>

**Supplemental Table 1.** Plasma glycoproteome analysis in the study group at time point T0.

	PLW-EC		P-value *	PLW-TP		Non-HIV (n = 11)	P-value **
	PC (n = 11)	TC (n = 11)		>350 (n = 11)	<100 (n = 11)		
Glyc B (µmol/L)	400.8 [356.0-443.5]	404.0 [373.6-462.5]	0.824	446.0 [406.3-487.5]	563.5 [463.2-621.4]	358.8 [320.6-380.2]	<b>&lt;0.001</b>
Glyc A (µmol/L)	746.2 [638.7-887.8]	789.1 [718.9-914.2]	0.710	961.9 [827.5-1051.0]	1032 [957.6-1238.0]	691.4 [664.8-755.5]	<b>&lt;0.001</b>
H/W Glyc B	5.0 [4.5-5.6]	5.1 [4.7-5.8]	0.824	5.6 [5.1-6.1]	7.1 [5.9-7.8]	4.5 [4.0-4.8]	<b>&lt;0.001</b>
H/W Glyc A	18.3 [15.9-20.8]	20.1 [17.7-20.8]	0.331	20.4 [17.1-22.4]	26.1 [21.7-29.8]	15.7 [15.1-16.8]	<b>&lt;0.001</b>

T0 in PLWH-ECs is defined by the loss of control in transient controllers (TC) and the initiation of ART in PLWH-TP. Data are presented as median [interquartile range], and compared using non-parametric Mann-Whitney test between PCs and TCs \*, and between all PLWH-EC, PLWH-TP and non-HIV subjects with nonparametric Kruskal-Wallis (KW) adjusted by Bonferroni post-hoc approach \*\*. P value < 0.05 was considered significant and is highlighted in bold.

EC, Elite controller; Glyc, glycoprotein; H/W, height/width glycoprotein ratio; PC, Persistent controller; PLWH, Person living with HIV; TC, Transient controller; TP: typical progressor.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GLICOPROTEÏNES SÈRIQUES DETERMINADES PER 1 H-RMN COM A MARCADOR D'INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU.  
ESTUDI EN PACIENTS VIH I HF.  
Ana Irene Malo Cerisuelo



Contents lists available at ScienceDirect

## Atherosclerosis

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



### Serum glycoproteins A and B assessed by <sup>1</sup>H-NMR in familial hypercholesterolemia

Ana-Irene Malo<sup>a</sup>, Josefa Girona<sup>a</sup>, Daiana Ibarretxe<sup>a</sup>, Cèlia Rodríguez-Borjabad<sup>a</sup>, Núria Amigó<sup>b</sup>,  
Núria Plana<sup>a</sup>, Lluís Masana<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, CIBERDEM, 43201, Reus, Spain

<sup>b</sup> Biosfer Teslab SL, Department of Basic Medical Sciences, Universitat Rovira i Virgili, CIBERDEM, 43201, Reus, Spain

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Familial hypercholesterolemia  
Glycoprotein profile  
Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR)  
Inflammation  
Glycoprotein A  
Glycoprotein B

#### ABSTRACT

**Background and aims:** Inflammation is a pathophysiological mechanism of atherosclerosis, and several mediators have been proposed as biomarkers. Acute-phase serum glycoproteins are upregulated in the liver during systemic inflammation. Because of their unique biochemical characteristics, they can be measured by <sup>1</sup>H-NMR, and their role as subclinical inflammation markers is under clinical evaluation. We aimed to assess the clinical value of plasma glycoproteins in familial hypercholesterolemia (FH) patients.

**Methods:** We recruited 295 FH patients (75.6% with FH-associated genetic variants). At baseline, a full glycoprotein profile, glycoprotein A and B (GlycA and B) concentrations and their height and width ratios (H/W) were analysed by <sup>1</sup>H-NMR. A carotid artery ultrasound study was performed at baseline and prospectively at the 5-year follow-up in 144 FH patients.

**Results:** At baseline, the GlycA and GlycB concentrations and their H/W ratios were correlated with lipid profile and adiposity parameters, with the correlation between the GlycA and triglyceride concentrations ( $r = 0.780$ ;  $p < 0001$ ) being the strongest. Glycoprotein concentrations were also correlated with inflammation markers, mainly hsCRP. Higher glycoprotein concentrations were observed in patients with higher intima media thickness, arterial rigidity and presence of arteriosclerotic plaques. In the multivariate and random forest analyses, the baseline GlycB concentration showed a significant contribution to the detection of FH individuals prone to develop carotid plaques.

**Conclusions:** The concentrations of serum glycoproteins as assessed by <sup>1</sup>H-NMR are robust markers of subclinical inflammation. In FH patients, they are increased in the presence of subclinical vascular damage and could be considered atherosclerosis risk markers in the long term.

#### 1. Introduction

Familial hypercholesterolemia (FH) is a genetic disease characterized by an autosomal dominant inheritance affecting genes encoding the low-density lipoprotein receptor (LDLR), proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), or apolipoprotein B (apoB). This translates into a severe elevation of LDL cholesterol concentrations (LDLc) and the progression of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) [1,2]. The incidence of ASCVD is double with respect to normolipemic individuals (14.9/1000 vs. 7.1/1000 person-years), and this excess risk is notably higher in young individuals [3]. Therefore, it is necessary to expand the study of this pathology from a more global point of view

beyond the study of lipid metabolism.

Many studies carried out in this population have established the role that inflammation plays in the evolution of vascular disease in FH patients. Along with inflammation, endothelial activation and oxidative stress have also been characterized in subjects with FH as the underlying mechanism of atherogenesis in the development of premature cardiovascular disease [4,5]. FH patients tend to have higher levels of inflammation and endothelial activation biomarkers, such as high-sensitive C-reactive protein (hsCRP), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), soluble intercellular cell-adhesion molecule, sICAM-1 and soluble E-selectin [6,7]. Higher levels of hsCRP have been described in FH patients with a positive coronary artery calcium score

\* Corresponding author.

E-mail address: [luis.masana@urv.cat](mailto:luis.masana@urv.cat) (L. Masana).

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.06.905>

Received 26 February 2021; Received in revised form 18 June 2021; Accepted 23 June 2021

Available online 25 June 2021

0021-9150/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

(CAC) compared to a control group [8] and correlated with carotid intima-media thickness (carotid IMT) [9]. However, other studies have not reported a relationship between levels of hsCRP, sICAM-1 and E-selectin and subclinical arteriosclerosis data in asymptomatic FH patients [10]. Moreover, there are inconclusive results on the independent impact of inflammation biomarkers on FH vascular alterations after adjusting for other cardiovascular risk factors [7,11]. We assessed the inflammatory state of patients with FH by measuring plasma glycoproteins by  $^1\text{H-NMR}$ .

Protein maturation, in general, includes glycosylation. The glycosylation pattern of immunoglobulins, apolipoproteins and acute phase proteins, among others, has been explored, looking for metabolic fingerprints of various diseases. Glycosylation can also modulate the function of proteins. In this study, we are not studying glycosylation patterns but rather taking advantage of the glycosylation of acute phase plasma proteins that generates a specific signal that can be detected by  $^1\text{H-NMR}$ . Human plasma acute-phase glycoproteins are members of a large group of proteins that modify their concentrations during inflammation and are referred to as acute phase reactants. They are synthesized by the liver and induced by inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 or tumour necrosis factor, representing a systemic response to local inflammation processes. They are almost all N-linked glycoproteins containing oligosaccharide chains attached to asparagine residues.  $^1\text{H-NMR}$  detects the signal produced by the acetyl groups (-COCH<sub>3</sub>) of N-acetylglucosamine and N-acetylgalactosamine (GlycA) and N-acetylneuraminic acid (GlycB) [12], and their concentrations and their derived parameters height and width ratios (H/W), which are related to signal shape (higher and narrower signals have been linked to inflammation), are measured [13]. GlycA and B are composite biomarkers that integrate the protein levels and glycosylation states of several of the most abundant acute phase proteins in serum, including alpha-1-acid glycoprotein (AGP), alpha-1-antitrypsin (AAT), alpha-1-antichymotrypsin (AACT), haptoglobin, and transferrin [14]. This makes them a more stable measure of inflammatory status with less intra-individual variability than other biomarkers, such as hsCRP [12]. GlycA and GlycB capture different aspects of the same inflammatory response, considering each other complementary. By measuring both glycoprotein signals, the chances of detecting acute phase protein modifications are improved. Glycoproteins are known to be strong biomarkers of cardiovascular disease [14].

In this study, we characterized the  $^1\text{H-NMR}$  plasma glycoprotein profile of patients with FH, exploring its association with other traditional risk factors, inflammation markers and subclinical arteriosclerosis data. Finally, we prospectively assessed its prognostic value for predicting the appearance of arteriosclerotic vascular disease.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Design and study subjects

We performed a baseline cross-sectional study and a prospective study at the 5-year follow-up. At baseline, we included 295 patients on clinical control at the Lipid Unit of our University Hospital because of heterozygous familial hypercholesterolemia with a punctuation in the Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) equal to or greater than 6 (75.6% with FH-associated genetic variants). Anamnesis, anthropometry and physical examination and blood tests, including serum  $^1\text{H-NMR}$  analysis, were obtained at baseline. A carotid ultrasound was performed, including data on carotid IMT and pulse wave velocity (PWV) and assessing the presence of atherosclerotic plaques. The presence of Achilles xanthomas was also evaluated. Ultrasound studies were repeated after 5 years of follow-up in 144 FH patients.

The study fulfilled the Helsinki Declaration, and the Ethical and Clinical Investigation Committee of the Pere Virgili Institute for Health Research (IISPV) approved the study. All participants signed the written consent form.

### 2.2. Clinical and standard biochemical variables

We retrieved anthropometric and physical examination data from the clinical history. Patients taking statins underwent a 6-week washout period. An overnight fasting blood sample was obtained from each patient in the study cohort. Plasma and serum aliquots were stored at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  in our research institute's biobank until the measurements. Biochemical parameters, lipids and apolipoproteins, including hsCRP, were measured using colorimetric, enzymatic and immunoturbidimetric assays, respectively (Spinreact, SA, Spain; Wako Chemicals GmbH, Germany; and Polymedco, New York, NY, USA), which were adapted to the Cobas Mira Plus Autoanalyser (Roche Diagnostics, Spain). sICAM-1 and sE-selectin were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) following the reagent manufacturer's instructions.

### 2.3. Carotid IMT and plaque determination

Participants underwent a vascular study with the Mylab 50 X-Vision ultrasound (Esaote, Italy). A 7.5 MHz linear array and semiautomated software were used to measure the cIMT in the far wall of both common carotid arteries. The cIMT mean was the average of 2 territories. Bifurcations and internal carotids were also measured by means of a manual method. A carotid plaque was defined as a focal structure that either encroached into the arterial lumen by at least 0.5 mm or 50% of the surrounding cIMT value or demonstrated a thickness  $>1.5$  mm, as measured from the media-adventitia interface to the intima-lumen interface.

### 2.4. Glycoprotein analysis by $^1\text{H-NMR}$

Plasma samples were analysed by  $^1\text{H-NMR}$  for glycoprotein profiling as previously reported [13,15]. This is achieved by analysing the N-acetylmethyl groups of the N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine and N-acetylneuraminic acid residues in the portions of their carbohydrates represented in the  $^1\text{H-NMR}$  spectra between 2.19 and 1.90 ppm using a deconvolution model using Lorentzian functions [12, 16]. Acetyl group concentrations are provided by the function-associated GlycA and GlycB areas. The shape parameter height to weight ratio of the Lorentzian function (H/W ratio) is related to the flexibility and aggregation state of the protein-sugar bond that generates the signal, which is higher for more flexible molecular structures [17]. The results are reported as GlycA and GlycB serum concentrations and H/W ratios of both glycoprotein groups.

### 2.5. Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was performed on continuous variables to study normality. Continuous variables are presented as medians and 25th and 75th percentiles since they are not normally distributed. Categorical variables are expressed as percentages. Differences between groups were analysed using the non-parametric Mann-Whitney test. The associations between glycoproteins and continuous variables were analysed using the Spearman correlation test and multivariate linear regression analyses including plasma lipids and inflammatory markers as independent variables.

To assess the association of the baseline glycoprotein parameters with future atherosclerotic plaque appearance, we performed multivariate analyses in the group composed of patients with follow-up sonography at 5 years ( $n = 144$ ) and who had no arteriosclerotic plaques at baseline imaging ( $n = 104$ ). All patients were on maximally tolerated statin dose plus ezetimibe, and none was on PCSK9 inhibitors during follow-up. Four different models were compared: Model 1 included only traditional parameters obtained in daily clinical practice (Model 1: age, total cholesterol, LDLc, HDLc, triglycerides); Model 2: Model 1 + GlycA; Model 3: Model 1 + GlycB; Model 4: Model 1 + hsCRP. Because of the



strong effect of age in determining plaque development, we compared the patients who developed plaque at 5 years ( $n = 24$ ) with a matched subgroup selected among those who did not develop plaque ( $n = 24$ ), and the same models were compared. This control group was selected by using the nearest neighbour matching algorithm [18] that selects the best non-plaque individual for each patient in the plaque group according to predefined covariates age, sex and BMI (Supplementary Table S1). We performed a random forest (RF) analysis based on conditional inference trees in which 500 trees were grown to evaluate the classification capability of future plaque development. Area under the ROC curve (AUC) values were calculated as a measure of classification accuracy. Then, we assessed the improvement in accuracy added by  $^1\text{H-NMR}$  profiling in the characterization of the population at higher risk of plaque development by comparing the AUCs of different models following the non-parametric approach proposed by DeLong et al. [19].

Statistical analyses were carried out using the SPSS 27 package (IBM, Madrid, Spain), and R was implemented in the Machine learn function from the *healthcareai* v2.5.0 package. A  $p$  value less than 0.05 was considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Baseline clinical and analytical parameter data

At the beginning of the study, 295 patients diagnosed with heterozygous familial hypercholesterolemia with DLCN greater than or equal to 6 were included in the study. Table 1 shows the main clinical and analytical characteristics as well as the glycoprotein data by  $^1\text{H-NMR}$  and other inflammatory biomarkers. FH patients with negative gene testing had higher BMI, abdominal circumference, TG, and GlycA (Supplementary Table S2).

#### 3.2. Associations between glycoproteins and clinical and analytical parameters at baseline

Baseline GlycA and B concentrations and H/W ratios were significantly correlated with age, weight, BMI, abdominal circumference, and systolic and diastolic blood pressure (Table 2). FH patients show a significantly higher concentration of glycoproteins than a sex and aged matched apparently healthy group of individuals obtained from our database (Supplementary Table S3). From a metabolic point of view, we found a strong association between glycoprotein and triglyceride levels and GGT and an inverse correlation with HDL cholesterol. The main effect was observed with GlycA and triglyceride concentrations ( $r = 0.780$ ,  $p < 0.001$ ) (Table 2). A multivariate linear regression analysis including inflammatory and lipid parameters confirm that triglycerides and hsCRP are independently associated with GlycA and GlycB concentrations ( $p < 0.001$ ) (Supplementary Table S4). Furthermore, we also found a significant and positive association with LDLc and the inflammatory biomarkers hsCRP, sICAM and sE-selectin. Carotid IMT and PWV also showed a positive association with glycoprotein concentrations ( $p < 0.001$ ) (Table 2). After adjusting for age and sex, BMI, waist circumference, SBP, DBP, triglycerides, total cholesterol, HDLc, ApoB and sICAM-1 remained strongly associated ( $p < 0.001$ ). Additionally, glucose, GGT, LDLc, hsCRP, and sE-selectin remained associated ( $p < 0.05$ ). PWV remained correlated with the GlycA concentration and the H/W ratio ( $p < 0.001$ ).

#### 3.3. Glycoproteins and their relationship with ultrasound parameters of subclinical arteriosclerosis

At baseline, we found an association between the level of glycoproteins and the severity of subclinical arteriosclerosis. Patients with ultrasound parameters of IMT and PWV above the median presented higher levels of GlycA and B (concentrations and ratios). As seen in Fig. 1, for IMT and PWV, there was a statistically significant increase in

**Table 1**

Clinical and analytical characteristics of the study subjects.  $^1\text{H-NMR}$  glycoproteins at baseline.

	FH patients (N = 295)
<b>Clinical characteristics</b>	
Age (years)	40 (32–49)
Sex (women %)	139 (47.11)
Ischemic heart disease (yes %)	7 (2.37)
Diabetes <sup>a</sup> (yes %)	3 (1.01)
Hypertension (yes %)	30 (10.16)
Smoke (yes %)	104 (35.25)
Weight (kg)	73 (61.50–81.50)
Height (cm)	167.50 (160–175)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.50 (23–28)
Waist circumference (cm)	87 (80–96)
SBP (mmHg)	120 (110–130)
DBP (mmHg)	75 (70–80)
Corneal arcus (yes %)	108 (36.6)
Tendinous xanthomas (yes %)	113 (38.30)
Tendinous xanthomas by ultrasound <sup>b</sup> (yes %)	97 (32.88)
DLCN	15 (11–19)
<b>Genetics</b>	
FH-associated genetic variant (yes %)	223 (75.59)
LDLR	213
PCSK9	1
APOB	9
<b>Analytical parameters</b>	
Total cholesterol (mg/dL)	317.09 (280.35–363.49)
Triglycerides (mg/dL)	97 (70.86–141.72)
LDLc (mg/dL)	243 (206–293.44)
HDLc (mg/dL)	50.27 (42.15–60.32)
Apoprotein B (mg/dL)	177.50 (152–200)
Apoprotein A1 (mg/dL)	149 (129–167)
ApoB/ApoA ratio	1.18 (0.95–1.45)
Lipoprotein (a) (mg/dL)	26.84 (8.6–72)
Glucose (mg/dL)	87 (81.08–93.69)
AST (U/L)	20 (18–24)
ALT (U/L)	20 (16–28)
GGT (U/L)	18 (13–27)
<b>Glycoproteins</b>	
GlycA (μmol/L)	817.66 (727.18–948.37)
GlycB (μmol/L)	382.73 (341.34–415.50)
H/W GlycA	18.97 (16.75–21.32)
H/W GlycB	4.81 (4.29–5.25)
<b>Other inflammatory biomarkers</b>	
HsCRP (mg/L)	2.0 (0.83–4.23)
sICAM (ng/ml)	190.40 (165.80–236.80)
sE-selectin (ng/ml)	32.29 (22.80–42.11)
<b>Ultrasound parameters</b>	
Carotid IMT (μm)	612 (530–717)
PWV (m/s)	6.58 (5.54–7.56)
Carotid plaque (yes %)	84 (28.66)

For the qualitative variables, the data are shown as n (percentage). Quantitative variables are shown as the median (25th percentile - 75th percentile). DLCN, Dutch Lipid Clinic Network; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; HsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; sICAM-1, Carotid IMT, carotid intima-media thickness; PWV, pulse wave velocity. N = 295 except for hsCRP (N = 164) and PWV (N = 120).

<sup>a</sup> According to the American Diabetes Association. (Mean HbA1c of the three patients = 6.9%).

<sup>b</sup> Defined by thickness tendon: main diameter above 5.7 mm in men and 4.9 mm in women [20].

GlycA ( $p = 0.026$ ;  $p < 0.001$ , respectively), GlycB ( $p = 0.048$ ;  $p = 0.008$ , respectively), H/W GlycA ( $p = 0.008$ ;  $p = 0.002$ , respectively) and H/W GlycB ( $p = 0.046$ ;  $p = 0.007$ , respectively). In those patients with the presence of plaque, higher concentrations in GlycA ( $p = 0.020$ ), in GlycB ( $p = 0.035$ ), in the H/W of GlycA ( $p = 0.003$ ) and in the H/W of GlycB ( $p = 0.036$ ) were also observed.

**Table 2**  
Association between <sup>1</sup>H-NMR glycoprotein variables and clinical and biochemical characteristics of the FH patients.

	GlycA	GlycB	H/W GlycA	H/W GlycB
Age	0.312**	0.257**	0.344**	0.257**
DLCN	0.001	0.066	0.017	0.066
Weight	0.298**	0.118*	0.184**	0.117*
Height	0.000	-0.124*	-0.069	-0.124*
BMI	0.420**	0.265**	0.313**	0.264**
Waist circumference	0.440**	0.280**	0.348**	0.281**
SBP	0.367**	0.317**	0.345**	0.317**
DBP	0.318**	0.259**	0.294**	0.259**
Total cholesterol	0.292**	0.273**	0.281**	0.275**
Triglycerides	0.780**	0.367**	0.582**	0.365**
LDLc	0.229**	0.238**	0.222**	0.237**
HDLc	-0.308**	-0.167**	-0.222**	-0.165**
Apoprotein B	0.435**	0.318**	0.349**	0.317**
Apoprotein A1	-0.089	0.037	0.010	0.040
ApoB/ApoA ratio	0.363**	0.216**	0.257**	0.214**
Lipoprotein (a)	0.052	0.091	0.097	0.090
Glucose	0.307**	0.215**	0.278**	0.217**
AST	0.026	0.044	0.004	0.043
ALT	0.216**	0.135*	0.157**	0.133*
GGT	0.480**	0.405**	0.463**	0.405**
HsCRP	0.427**	0.503**	0.503**	0.504**
sICAM-1	0.297**	0.292**	0.334**	0.292**
sE-selectin	0.390**	0.222*	0.341**	0.219*
Carotid IMT	0.168**	0.186**	0.214**	0.188**
PWV	0.490**	0.331**	0.400**	0.331**
Alx	0.142	0.118	0.166	0.119

Spearman correlation coefficients and p values (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ) for each glycoprotein variable and clinical or biochemical parameter. DLCN, Dutch Lipid Clinic Network; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; HsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; sICAM-1; carotid IMT, carotid intima-media thickness; PWV, pulse wave velocity. N = 295 except for hsCRP (N = 164) and PWV (N = 120).

#### 3.4. Glycoproteins in the prospective study for the prognosis of plaque appearance

The multivariate analysis performed in the whole group of patients with no baseline plaques (n = 104) showed that in all models including age as an independent variable, the other parameters lost predictive power (model 1: age, total cholesterol, LDLc, HDLc, triglycerides; model 2: model 1 + GlycA; model 3: model 1 + GlycB; model 4: model 1 + hsCRP). Only LDLc in this FH group showed some significant predictive effect. When age was not included, GlycB and total cholesterol showed a significant effect [odds ratio = 1.010, ( $p = 0.05$ ); odds ratio = 1.010, ( $p = 0.007$ ), respectively]. To further explore this relationship, an age-independent group was created (n = 48) including the patients who had developed plaque, and an age-matched comparison group was selected using the nearest neighbour matching algorithm. In this group, Model 1, including age and standard lipid profile, showed non-significant discrimination with an AUC of 0.51 (95% CI: 0.3665–0.7064). After including <sup>1</sup>H-NMR GlycA and B (models 2 and 3), the discrimination ability increased to an AUC of 0.77 (95% CI: 0.599–0.8871) when GlycB was included. The inclusion of hsCRP increased the discrimination ability of the lipid profile up to an AUC of 0.68 (95% CI: 0.5032–0.8336) but to a lower level than that of GlycB (Fig. 2A). In this model, the GlycB concentration, followed by LDLc and HDLc, had higher discrimination capacity to classify patients into the two groups (Fig. 2B).

#### 4. Discussion

In this study, we explored the role of serum glycoproteins A and B levels measured by <sup>1</sup>H-NMR in FH patients. We observed a strong correlation with adiposity parameters and lipid values, particularly

triglyceride levels, with hsCRP and other inflammation markers and subclinical atherosclerosis parameters. Prospectively, baseline glycoproteins showed a significant capacity to predict the presence of carotid atherosclerotic plaque at 5 years.

Inflammation is a milestone in atherosclerosis pathophysiology [21]. Upon cholesterol deposition in the artery wall, a local complex inflammatory reaction neutralizes biochemical injury. In this reaction, several cytokines, such as IL-1, IL-6 and TNF, are produced. Although these cytokines have mainly a local effect, they also enter the bloodstream, reaching the liver and upregulating the production of several proteins involved in systemic inflammation states. Among them, hsCRP has been considered a biomarker of cardiovascular risk [22]. The inflammatory response of the liver is characterized by the production of a group of glycoproteins referred to as acute inflammatory phase reactants, including fibrinogen, CRP, haptoglobin, serum amyloid A transferrin,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, and  $\alpha$ 1-antitrypsin, among others [23]. Interestingly, all these proteins are N-linked glycoproteins, which is a biochemical characteristic that can be picked out by <sup>1</sup>H-NMR.

<sup>1</sup>H-NMR glycoproteins have been considered a stronger and more stable marker of inflammation than any of its components, and several studies have shown their role as subclinical inflammation biomarkers and have been tested as prognostic tools in chronic diseases in which inflammation plays a role [17]. Among them, glycoprotein A, the main pick of these glycoproteins assessed by <sup>1</sup>H-NMR, has positive results as a cardiovascular risk marker [24–26].

Familial hypercholesterolemia is a high cardiovascular risk situation led by extremely high LDLc levels. Because inflammation is a main player in the atherosclerosis process, we tested the role of glycoproteins in this disease. Although our control group was retrospectively selected and limited in size, subjects with FH showed higher glycoprotein and hCRP concentrations than healthy individuals, supporting the idea that FH is a chronic subclinical inflammatory condition. Interestingly, HF patients in whom a variant mutation could not be found had higher TG, BMI, and waist circumference, and consequently higher GlycA. Although LDLc is directly associated with GlycA and GlycB, they were more strongly related to triglycerides, despite the patients in our cohort having a triglyceride concentration and BMI within the normal range suggesting that triglyceride elevations in FH patients would determine a higher cardiovascular risk. This observation reinforces the role of triglycerides as subclinical chronic inflammation mediators.

All glycoprotein parameters were significantly associated with levels of hsCRP, sICAM-1, and sE-selectin. HsCRP has been established as a clinical biomarker of cardiovascular risk, and its reduction has been associated with risk reduction, although its pathogenic role is under discussion. Moreover, the Cantos study showed that lowering IL-1B, a CRP inducer, was also associated with vascular prognosis improvement [27]. Although, neither GlycA nor GlycB were associated to changes in IMT after 5 years follow up, GlycB predicted better than hsCRP, carotid plaque atherosclerosis development prospectively. While biomarkers such as hsCRP are associated with a single inflammation pathway and have high variability between individuals as well as intra-individual fluctuations [28]. Plasma glycoproteins assessed by <sup>1</sup>H-NMR, including a set of systemic inflammation biomarkers, seem to be a more robust indication of a subclinical inflammatory state.

The main strength of our work is that it is the first study exploring the role of plasma glycoproteins assessed by <sup>1</sup>H-NMR in FH patients in a prospective manner. A limitation of our study is that we have no data on cardiovascular outcomes, and we had to analyse a surrogate of vascular alteration. Moreover, the sample size of patients analysed at 5 years was modest, and the main outcome (de novo carotid plaque) occurred in a few patients.

In conclusion, the glycoprotein profile assessed by <sup>1</sup>H-NMR seems to be a robust marker of inflammation in the FH setting. It could be considered a cardiovascular prognosis marker in FH patients contributing to the clinical decision-making process.



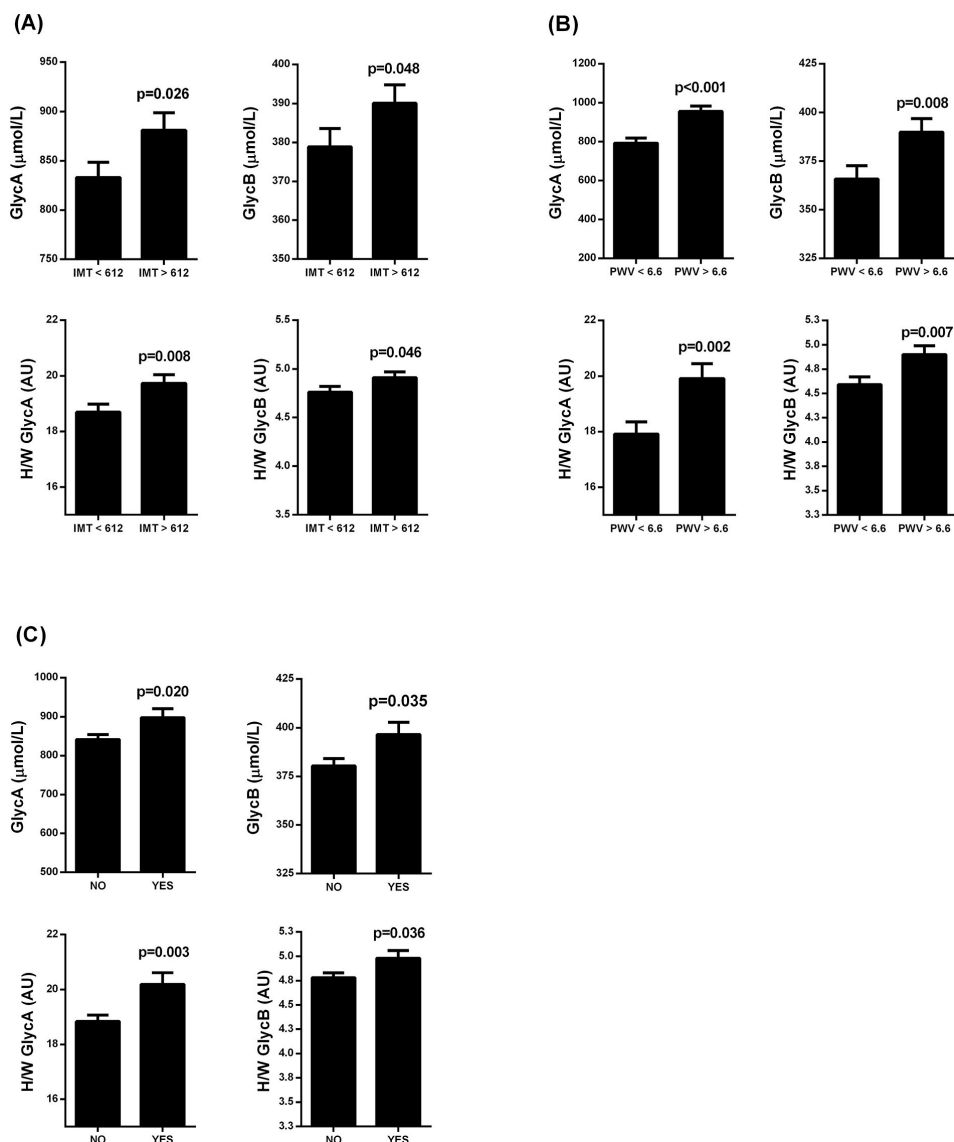


Fig. 1. Glycoprotein concentrations sorted by IMT (A), PWV (B) values (above or below median) and presence of plaque (C). IMT median = 612 µm; PWV median = 6.6 m/s. N = 295 except for PWV (N = 120).

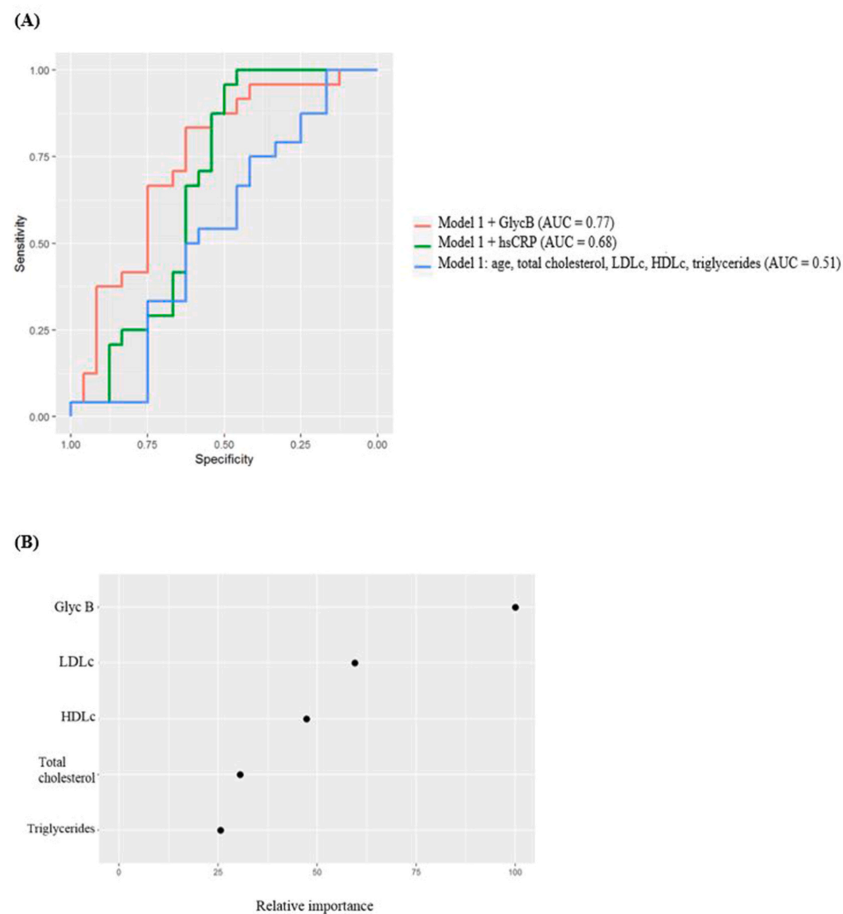
#### Financial support

This work was supported by a research grant from national funding from the Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM). This study was funded by Fundació la Marató de TV3 (ref.20152430) and the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the project PI18/00515 (co-funded by European Regional Development Fund/European Social Fund; "A way to make Europe"/"Investing in your future") and Spanish Atherosclerosis Society (SEA). The authors acknowledge the IISPV-BIOBANC for sample

handling.

#### Author contributions

L.M. and N.P. are the guarantors of the article; A.-I.M., J.G., D.I., C. R.-B., N.A. and N.P. collected and analysed the data. A.-I.M., L.M. and J.G. analysed the data and wrote the manuscript. N.A., J.G., D.I., N.A., N.P. and L.M. critically reviewed the manuscript. A.-I.M., D.I., N.P. and L.M. designed the study and critically reviewed the manuscript. The published version of the manuscript has been read and accepted by all



**Fig. 2.** Receive operating characteristic (ROC) curves and random forest variable relative importance for evaluating glycoprotein biomarkers as predictors of 5-year carotid plaque appearance. (A) ROC curve analysis: Model 1 included traditional parameters (age, total cholesterol, LDLc, HDLc, triglycerides). (B) Random forest variable relative importance by Model 1 + GlycB.

authors.

#### Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: L. M and N.A. are shareholders of Biosfer Teslab, the company that markets the glycoprotein profile carried out in this study. No other author reports conflicts of interest.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.06.905>.

#### References

- [1] L.E. Akiyamen, J. Genest, S.D. Shan, R.L. Reel, J.M. Albaum, A. Chu, et al., Estimating the prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and meta-analysis, *BMJ Open* 7 (9) (2017).
- [2] K.B. Holven, A.M. Myhre, P. Aukrust, T.A. Hagve, L. Ose, M.S. Nenseter, Patients with familial hypercholesterolaemia show enhanced spontaneous chemokine release from peripheral blood mononuclear cells ex vivo: dependency of xanthomas/xanthelasms, smoking and gender, *Eur. Heart J.* 24 (19) (2003) 1756–1762.
- [3] L. Masana, A. Zamora, N. Plana, M. Comas-Cuñí, M. García-Gil, R. Martí-Lluch, et al., Incidence of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia phenotype: analysis of 5 Years follow-up of real-world data from more than 1.5 million patients, *J. Clin. Med.* 8 (7) (2019) 1080.
- [4] R.K. Upadhyay, Emerging risk biomarkers in cardiovascular diseases and Disorders, *Journal of Lipids* 2015 (2015) 1–50.
- [5] M. El Messal, J.L. Beaudoux, A. Drissi, P. Giral, R. Chater, E. Bruckert, et al., Elevated serum levels of proinflammatory cytokines and biomarkers of matrix remodeling in never-treated patients with familial hypercholesterolemia, *Clin. Chim. Acta* 366 (1–2) (2006) 185–189.
- [6] J.T. Real, S. Martínez-Hervás, A.B. García-García, M. Civera, F.V. Pallardó, J. F. Ascaso, et al., Circulating mononuclear cells nuclear factor-kappa B activity,

- plasma xanthine oxidase, and low grade inflammatory markers in adult patients with familial hypercholesterolaemia, *Eur. J. Clin. Invest.* 40 (2) (2010) 89–94.
- [7] T. Rahman, N.S. Hamzan, A. Mokhsin, R. Rahmat, Z.O. Ibrahim, R. Razali, et al., Enhanced status of inflammation and endothelial activation in subjects with familial hypercholesterolaemia and their related unaffected family members: a case control study, *Lipids Health Dis.* 16 (1) (2017).
- [8] Z.X. Ye, H.M. Cheng, K.R. Chiou, P.H. Huang, S.J. Lin, M.J. Charng, Relation of coronary artery calcium to flow-mediated dilation and C-reactive protein levels in asymptomatic patients with heterozygous familial hypercholesterolemia, *Am. J. Cardiol.* 100 (7) (2007) 1119–1123.
- [9] Z.X. Ye, H.M. Cheng, K.R. Chiou, M.J. Charng, Relation of C-reactive protein and carotid intima media thickness in Taiwanese with familial hypercholesterolemia, *Am. J. Cardiol.* 102 (2) (2008) 184–187.
- [10] P.L. Van Haelst, J.J. Van Doormaal, F.W. Asselbergs, A.M. Van Roon, N.J.G. M. Veeger, M.M. Henneman, et al., Correlates of endothelial function and their relationship with inflammation in patients with familial hypercholesterolaemia, *Clin. Sci.* 104 (6) (2003) 627–632.
- [11] M. Ekholm, T. Kahana, G. Jörneskog, J. Brinck, N.H. Wallén, Haemostatic and inflammatory alterations in familial hypercholesterolaemia, and the impact of angiotensin II infusion, *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 16 (2) (2015) 328–338.
- [12] J.D. Otvos, I. Shalaurova, J. Wolak-Dinsmore, M.A. Connelly, R.H. Mackey, J. H. Stein, et al., GlycA: a composite nuclear magnetic resonance biomarker of systemic inflammation, *Clin. Chem.* 61 (5) (2015) 714–723.
- [13] R. Fuertes-Martín, D. Taverner, J.-C. Vallvé, S. Paredes, L. Masana, X. Correig Blanchar, et al., Characterization of <sup>1</sup>H NMR plasma glycoproteins as a new strategy to identify inflammatory patterns in rheumatoid arthritis, *J. Proteome Res.* 17 (11) (2018) 3730–3739.
- [14] R.A. Ballout, A.T. Remaley, GlycA: a new biomarker for systemic inflammation and cardiovascular disease (CVD) risk assessment, *Journal of laboratory and precision medicine* 5 (2020).
- [15] A.-I. Malo, A. Rull, J. Girona, P. Domingo, R. Fuertes-Martín, N. Amigó, et al., Glycoprotein profile Assessed by 1H-NMR as a global inflammation marker in patients with HIV infection. A prospective study, *J. Clin. Med.* 9 (5) (2020) 1344.
- [16] J.D. Bell, J.C.C. Brown, J.K. Nicholson, P.J. Sadler, Assignment of resonances for «acute-phase» glycoproteins in high resolution proton NMR spectra of human blood plasma, *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 215 (2) (1987) 311–315.
- [17] R. Fuertes-Martín, X. Correig, J.-C. Vallvé, N. Amigó, Title: human serum/plasma glycoprotein analysis by 1H-NMR, an emerging method of inflammatory assessment, *J. Clin. Med.* 9 (2) (2020) 354.
- [18] D. Ho, K. Imai, G. King, E. Stuart, Matching as nonparametric preprocessing for reducing model dependence in parametric causal inference, *Polit. Anal.* 15 (2007).
- [19] E.R. DeLong, D.M. DeLong DLC-P, Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach, *Biometrics* 44 (3) (1988) 837–845.
- [20] E. Jarauta, et al., *Atherosclerosis* 204 (2009) 345–347.
- [21] G.R. Geovanini, P. Libby, *Atherosclerosis and Inflammation: Overview and Updates*, vol. 132, Clinical Science. Portland Press Ltd, 2018, pp. 1243–1252.
- [22] S. Mora, N. Rifai, J.E. Buring, P.M. Ridker, Additive value of immunoassay-measured fibrinogen and high-sensitivity C-reactive protein levels for predicting incident cardiovascular events, *Circulation* 114 (5) (2006) 381–387.
- [23] M.W. Robinson, C. Harmon, C. O'Farrelly, *Liver Immunology and its Role in Inflammation and Homeostasis*, vol. 13, Cellular and Molecular Immunology. Chinese Soc Immunology, 2016, pp. 267–276.
- [24] M. Tibuakuu, O.E. Fashanu, D. Zhao, J.D. Otvos, T.T. Brown, S.A. Haberlen, et al., GlycA, a novel inflammatory marker, is associated with subclinical coronary disease, *AIDS (Lond.)* 33 (3) (2019) 547–557.
- [25] R.A. Ballout, A.T. Remaley, GlycA: a new biomarker for systemic inflammation and cardiovascular disease (CVD) risk assessment, *Journal of Laboratory and Precision Medicine* 5 (2020), 17–17.
- [26] M.A. Connelly, J.D. Otvos, I. Shalaurova, M.P. Playford, N.N. Mehta, GlycA, a novel biomarker of systemic inflammation and cardiovascular disease risk, *Journal of Translational Medicine. BioMed Central Ltd.* 15 (2017).
- [27] A.W. Aday, P.M. Ridker, Antiinflammatory therapy in clinical care: the CANTOS trial and beyond, *Frontiers in cardiovascular medicine* 5 (2018) 62.
- [28] L.M. Browning, J.D. Krebs, S.A. Jebb, Discrimination ratio analysis of inflammatory markers: implications for the study of inflammation in chronic disease, *Metab. Clin. Exp.* 53 (7) (2004) 899–903.

## Supplementary data

**Table S2:** Clinical and analytical characteristics of the study subjects according to the presence or absence of FH-associated genetic variants.

	No FH-associated genetic variants (n=72)	FH-associated genetic variants (n=223)	P
<b>Clinical characteristics</b>			
Age (years)	44 (38-52)	37 (30-49)	0.56
Sex (women %)	30 (41.66)	109 (48.88)	0.28
Ischemic heart disease (yes %)	3(4.16)	4(1.79)	0.25
Diabetes (yes %)	0	3 (1.34)	0.313
Hypertension (yes %)	11 (15.49)	19 (8.52)	0.1
Smoke (yes %)	23 (31.94)	81 (36.32)	0.92
Weight (kg)	76 (64.9 – 84.5)	72 (60.4 – 80.5)	0.054
Height (cm)	168 (160.25 – 175.25)	167 (158.7 – 175)	0.625
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.93(23.95 – 28.73)	25.34 (22.69 – 27.4)	0.018
Waist circumference (cm)	90 (84 – 99.5)	86 (79- 94)	0.005
SBP (mmHg)	122 (115 – 138)	120 (110 – 130)	0.057
DBP (mmHg)	80 (70 - 84)	74 (70 - 80)	0.022
Corneal arcus (yes %)	41 (56.94)	67 (30)	<0.001
Tendinous xanthomas (yes %)	37 (51.38)	76 (34.1)	0.009
Tendinous xanthomas by ultrasound (yes %)	30 (41.66)	67 (30.04)	0.998
DLCN	10 (9-12)	17 (14-20)	<0.001

### Genetics

LDLR	213
APOB	9
PCSK9	1

### Analytical parameters

Total cholesterol (mg/dL)	294.45 (265.5 – 322.89)	336.43 (286.16 – 375.10)	<0.001
LDLc (mg/dL)	211 (186 – 243)	259.65 (216 – 312.36)	<0.001
HDLc (mg/dL)	54.07 (46.7 – 62.35)	49.11 (39.44 – 59.55)	0.001
Triglycerides (mg/dl)	125.5 (88.57 – 164.82)	88.57 (62 – 127.55)	<0.001
Apoprotein B (mg/dL)	169.5 (143.5 – 183.5)	181 (154 – 212)	0.001
Apoprotein A1 (mg/dL)	153 (138.5 – 172.5)	146.5 (128 – 165)	0.027
Lipoprotein (a) (mg/dL)	30.5 (7.5 – 68.95)	21.8 (7.6 – 58.6)	0.194
Glucose (mg/dL)	91 (84.33 – 98)	86.49 (79.28 – 91.89)	0.001
AST(UI/L)	21 (18 – 26)	20 (18 – 24)	0.342
ALT (UI/L)	22 (16-38)	20 (15 – 27)	0.268
GGT (UI/L)	22 (16-38)	16 (12 – 25)	<0.001

### Glycoproteins

Glyc A (µmol/L)	869.21 (761.35 – 991.53)	803.41 (712.68 – 927.77)	0.003
Glyc B (µmol/L)	384.04 (354.43 – 420.99)	382.26 (339.19 – 412.01)	0.308
H/W GlycA	19.78 (17.55 – 22.09)	18.47 (16.31 – 20.99)	0.005
H/W GlycB	4.83 (4.46 – 5.31)	4.8 (4.26 – 5.2)	0.29

### Other inflammatory

#### biomarkers

HsCRP (mg/L)	2 (0.51 – 5.81)	2 (0.89 – 4.03)	0.91
sICAM (ng/ml)	242.4 (171.85 – 280.2)	185 (165.8 – 231.6)	0.84
sE-selectin (ng/ml)	34.95 (23.01- 40.96)	32.27 (22.8 – 42.28)	0.92

Ultrasound parameters

Carotid IMT ( $\mu\text{m}$ )	629.5 (550 – 730)	611 (525.25 – 710.5)	0.39
VPW (m/s)	7.06 (6.05 – 7.91)	6.06 (5.21 – 7.14)	<0.001
Carotid plaque yes (%)	24 (33.33)	60 (26.9)	0.27

---

BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; HsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; sICAM-1. Carotid IMT, carotid intima-media thickness; PWV, pulse wave velocity. N= 295 except for hsCRP (N=164) and PWV (N=120).

**Table S3:** Clinical and analytical characteristics of the FH group and control group. 1H-NMR glycoproteins at baseline.

	FH patients (N=295)	Controls (N=47)	P
<b>Clinical characteristics</b>			
Age (years)	40 (32 – 49)	43 (36-50)	0.063
Sex (women %)	139 (47.11)	23 (48.90)	0.876
BMI (kg/m2)	25.50 (23 – 28)	25.08 (22.9-26.7)	0.156
<b>Analytical parameters</b>			
Total cholesterol (mg/dL)	317.09 (280.35 – 363.49)	177.88 (158.55-201.08)	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	97 (70.86 – 141.72)	53.14 (44.29-79.71)	<0.001
LDLc (mg/dL)	243 (206 – 293.44)	117.56 (98.22-143.47)	<0.001
HDLc (mg/dL)	50.27 (42.15 – 60.32)	49.11 (40.99-58.78)	0.769
Apoprotein B (mg/dL)	177.50 (152 – 200)	90 (77-107)	<0.001
Apoprotein A1 (mg/dL)	149 (129 – 167)	136 (101-160)	0.008
Lipoprotein (a) (mg/dL)	26.84 (8.6 – 72)	3.80(1.30-15.80)	<0.001
<b>Glycoproteins</b>			
GlycA (µmol/L)	817.66 (727.18 – 948.37)	575.42(497.75-655.57)	<0.001
GlycB (µmol/L)	382.73 (341.34 – 415.50)	272.17(254.55-332.99)	<0.001
H/W GlycA	18.97 (16.75 – 21.32)	13.53(11.55-15.90)	<0.001
H/W GlycB	4.81 (4.29 – 5.25)	3.47(3.20-4.19)	<0.001

**Other inflammatory**

**biomarkers**

HsCRP (mg/L)	2.0 (0.83 – 4.23)	1.00(0.40-1.31)	<0.001
--------------	-------------------	-----------------	--------

---

BMI, body mass index; LDL-C, low-density lipoprotein–cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein–cholesterol; HsCRP, high-sensitivity C-reactive protein.



Table S4: Multiple linear regression-derived coefficient (b), standard errors (SE) and p-values for the two models (GlycA and GlycB) with the depended variables lipids and inflammation.

	GlycA (µmol/L)			GlycB (µmol/L)		
	beta	SE	p	beta	SE	p-value
Sex (women)	-26,133	15,697	0,098	-18,775	7,708	<b>0,016</b>
Age (years)	-0,361	0,650	0,580	0,257	0,319	0,421
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	2,266	1,876	0,229	0,762	0,921	0,409
Total cholesterol (mg/dL)	0,261	0,543	0,631	-0,002	0,267	0,995
HDLc (mg/dL)	-0,169	0,818	0,837	0,374	0,402	0,353
LDLc (mg/dL)	0,205	0,545	0,707	0,084	0,268	0,755
<b>Triglycerides (mg/dL)</b>	2,417	0,188	<b>&lt;0,0001</b>	0,430	0,092	<b>&lt;0,0001</b>
<b>HsCRP (mg/L)</b>	3,961	0,889	<b>&lt;0,0001</b>	2,934	0,437	<b>&lt;0,0001</b>

SE, standard error.

## VII RESUM DE RESULTATS

### **Primer treball** “*Glycoprotein Profile Assessed by <sup>1</sup>H-NMR as a Global Inflammation Marker in Patients with HIV Infection. A Prospective Study*”

1. Els paràmetres derivats de les glicoproteïnes (GlycA, GlycB, H/W GlycA i H/W GlycB) es mostren més elevats en pacients amb pitjor estat immunològic (< 200 CD4+ T-cell/ $\mu$ L) respecte als pacients amb > 200 CD4+ T-cell/ $\mu$ L en el moment basal; Glyc A: 1040(917.9–1199.1) vs. 950.4(845.5–1050.9),  $p < 0.001$ , i Glyc B: 521(440.3–610.3) vs. 468.6(417.9–507.0)  $\mu$  mol/L,  $p < 0.001$ , respectivament.
2. Les concentracions basals de GlycA i B i les relacions H/W es van correlacionar amb els nivells basals de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i c-HDL de forma inversa i de forma positiva amb hsCRP, la càrrega viral i triglicèrids.
3. Els paràmetres derivats de les glicoproteïnes es van correlacionar amb el recompte final de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> quan es van analitzar tots els pacients.
4. L'inici del TAR va tenir impacte sobre el nivell de glicoproteïnes, disminuint la seva concentració.
5. El model amb tots els paràmetres relacionats amb les glicoproteïnes va ser indicador pronòstic de immunodiscordança, resultant ser millor predictor que el nivell de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> basals per si sol.

### **Segon treball** “*Evolution of Serum Acute-Phase Glycoproteins Assessed by <sup>1</sup>H-NMR in HIV Elite Controllers*”

1. Els paràmetres de les glicoproteïnes no van predir la condició de controlador transitori.
2. Els paràmetres relacionats amb l'estudi de glicoproteïnes van mostrar-se augmentats en els PLWH-CE respecte als individus sans, mantenint sols aquesta

diferència en els CT al comparar-los amb els sans. Els CP van mostrar un perfil de glicoproteïnes més semblant al dels individus no infectats sense observar-se diferències.

3. Els PLWH-TP van mostrar concentracions més elevades de glicoproteïnes que els PLWH-CE, presentant el subgrup de TP T CD4+> 350 menys diferències amb els PLWH-CE.

### **Tercer treball** “*Serum glycoproteins A and B assessed by <sup>1</sup>H-NMR in familial hypercholesterolemia*”

1. GlycB va augmentar la capacitat predictiva per al desenvolupament de placa en HF del model amb l'edat i el perfil lipídic estàndard a 0,77 (IC del 95%: 0,599-0,8871) mentre que la inclusió d'hsCRP sols 0,68 (IC del 95%: 0,5032-0,8336).
2. Tots els paràmetres derivats de les glicoproteïnes (GlycA, GlycB, H/W GlycA i H/W GlycB) es van associar significativament amb els nivells d'hsCRP, sICAM-1 i sE-selectina.
3. Les glicoproteïnes van mostrar una forta correlació amb els paràmetres d'adipositat i els valors lipídics, especialment amb els nivells de triglicèrids. GlycA va revelar nivells més elevats en el grup de pacients en el que no es va identificar la variant de la mutació, els quals presentaven triglicèrids, IMC i una circumferència de la cintura més elevats.

## VIII DISCUSIÓ

**Resum de resultats global: Les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN son un marcador d'inflamació subclínica en pacients amb infecció crònica pel HIV o alteracions metabòliques cròniques.**

El senyal de les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN és un marcador emergent de l'estat inflamatori a partir de la glicosilació de proteïnes mesurat per <sup>1</sup>H-NMR. El senyal de les glicoproteïnes i especialment GlycA (la més àmpliament estudiada), han estat estudiades en els últims anys com a marcador associat a malalties metabòliques, malalties inflamatòries i càncer, demostrant que la quantificació d'aquests senyals és un bon indicador per a la detecció, el pronòstic i el seguiment terapèutic de la lesió tissular marcada per aquests processos associant-se amb el pronòstic i la mortalitat de molts d'aquests [168].

Diferents estudis han demostrat de manera consistent les correlacions entre els nivells basals de GlycA i els esdeveniments cardiovasculars i la seva mortalitat. Aquestes correlacions s'han vist mantingudes fins i tot després de ser ajustades per diferents marcadors inflamatoris com hsCRP i IL-6, tenint GlycA un valor predictiu comparable al d'hsCRP en l'avaluació del risc de esdeveniments cardiovasculars [205].

Fins la data, en la població PLWH els canvis en les concentracions de glicoproteïnes sols s'han avaluat en funció de la teràpia antiretroviral utilitzada, amb una disminució observada en GlycA tant en pacients sotmesos a tractament amb inhibidors de la integrasa (raltegravir) com amb inhibidors de la proteasa potenciats amb ritonavir [194]. Un altre estudi va avaluar l'associació de GlycA en pacients PLWH amb la presència d'arteriosclerosi coronària subclínica, cosa que suggereix que aquest nou marcador podria estratificar el risc cardiovascular en aquesta població [193]. Fins la data, no hi ha estudis a la literatura que avaluïn les glicoproteïnes com a marcadors pronòstics de la condició dels respons immunològics.

Concretament, en el primer treball "*Glycoprotein Profile Assessed by 1H-NMR as a Global Inflammation Marker in Patients with HIV Infection. A Prospective Study*", es demostra que les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN són més elevades en pacients

amb pitjor estat immunològic ( $< 200 \text{ CD4}^+ \text{ T-cell}/\mu\text{L}$ ) respecte als pacients amb  $> 200 \text{ CD4}^+ \text{ T-cell}/\mu\text{L}$  en el moment basal. Les concentracions basals de GlycA i B i les relacions H/W es van correlacionar amb els valors d'hsCRP que també van ser més elevats en el grup  $< 200 \text{ CD4}^+ \text{ T-cell}/\mu\text{L}$ . A més es van correlacionar amb els nivells basals de cèl·lules T  $\text{CD4}^+$  i c-HDL de forma inversa i de forma positiva amb la càrrega viral i triglicèrids. Les glicoproteïnes basals es van correlacionar amb el recompte final de cèl·lules T  $\text{CD4}^+$  (setmana 144) en analitzar tots els individus (no a l'anàlisi per subgrups, probablement per la mida mostral), mostrant un descens de les glicoproteïnes en el seguiment sota tractament amb TAR. Les glicoproteïnes són un indicador pronòstic on els individus amb concentracions basals de glicoproteïnes més altes presenten menys resposta al TAR; en el grup  $< 200 \text{ cèl·lules T CD4}^+/\mu\text{L}$ , el model amb totes les glicoproteïnes per  $^1\text{H-RMN}$  va ser millor predictor de la resposta immune que el nivell basal de cèl·lules T  $\text{CD4}^+$  (AUC 0,653,  $p = 0,019$ ). El model amb glicoproteïnes basals junt a cèl·lules T  $\text{CD4}^+$  basals i l'edat va predir la condició de resposta immune/no resposta amb una àrea de 0,733 ( $p < 0,001$ ) abans de l'inici del TAR, predint millor que el nivell de cèl·lules T  $\text{CD4}^+$  basals per si sol.

En el segon treball "*Evolution of Serum Acute-Phase Glycoproteins Assessed by  $^1\text{H-NMR}$  in HIV Elite Controllers*" no es van identificar diferències en les concentracions de glicoproteïnes que poguessin orientar quins CE perdrien el control espontani de la càrrega viral, el que atribuïm al reduït tamany de la mostra. No obstant, es va descriure el patró de glicoproteïnes segons la condició de cada grup amb observacions d'interès com l'associació significativa de H/W GlycA amb la càrrega viral en els CT un cop van perdre el control viral (T0), tal com es va observar en el primer treball en PLWH que comencen TAR. També es va identificar que PLWH-EC presentaven nivells de glicoproteïnes més alts que els dels individus sans no VIH. Al comparar-los per separat (CP i CT), els CP i els individus sans no VIH no van mostrar diferències en els perfils de glicoproteïnes, mostrant que els CP tenen un perfil de glicoproteïnes més semblant al dels individus no infectats. Al comparar PLWH-TP amb PLWH-CE, la concentració de glicoproteïnes i les seves proporcions eren més altes en els PLWH-TP (que presentaven càrrega viral més elevada i nivells més baixos de  $\text{CD4}^+$ , havent-se descrit ja al Paper 1 aquesta correlació). També al separar els TP en subgrups, el subgrup amb el millor estat immunitari (cèl·lules T  $\text{CD4}^+ > 350$ ) presentava un perfil de glicoproteïnes més semblant al PLWH-CE en

comparació amb el grup de PLWH-TP amb major immunosupressió (cèl·lules T CD4+ <100 cèl·lules/ $\mu$ L).

Finalment, en el tercer treball “*Serum glycoproteins A and B assessed by <sup>1</sup>H-NMR in familial hypercholesterolemia*” es van mostrar concentracions més elevades de glicoproteïnes i hsCRP en els individus amb HF respecte a individus sans. A més, tots els paràmetres derivats de les glicoproteïnes (GlycA, GlycB, H/W GlycA i H/W GlycB) es van associar significativament amb els nivells d'hsCRP, sICAM-1 i sE-selectina. D'altra banda, les glicoproteïnes van mostrar una forta correlació amb els paràmetres d'adipositat i els valors lipídics, especialment els nivells de triglicèrids. Els pacients en els que no es va identificar la variant de la mutació, presentaven uns triglicèrids, IMC i una circumferència de la cintura més elevats i també van mostrar uns nivells de GlycA més elevats. Per a la predicció del desenvolupament de placa carotídia als 5 anys es va desenvolupar un model incloent l'edat i el perfil lipídic estàndard, que va mostrar una discriminació no significativa amb una AUC de 0,51 (IC del 95%: 0,3665-0,7064). Després d'incloure <sup>1</sup>H-RMN GlycB, la capacitat de discriminació va augmentar fins a una AUC de 0,77 (IC del 95%: 0,599-0,8871) mentre que la inclusió d'hsCRP va augmentar la capacitat de discriminació del perfil lipídic sols fins a una AUC de 0,68 (IC del 95%: 0,5032-0,8336) però a un nivell inferior al de GlycB. En aquest model, la concentració de GlycB, seguida de LDLc i HDLc, tenia una major capacitat de discriminació per classificar els pacients en els dos grups. En quant a l'associació amb IMT, GlycA i GlycB no es van associar a canvis en IMT després de cinc anys de seguiment, però GlycB va predir millor que hsCRP el desenvolupament de l'aterosclerosi de la placa caròtida de forma prospectiva.

### **Les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN son un marcador més sensible que l'hsCRP.**

D'entre diversos biomarcadors estudiats en les darreres dècades, hsCRP ha estat el més fortament relacionat amb el risc d'esdeveniments cardiovasculars i la seva mortalitat de forma independent a altres factors de risc tradicionals com colesterol no HDL, el tabaquisme, o la hipertensió [211,212]. D'aquesta manera, s'ha inclòs la seva determinació en algunes guies, que recomanen la utilització d'hsCRP en pacients de risc intermedi per valorar la intensificació de les estratègies terapèutiques [213]. Com a

avantatges, hsCRP presenta una llarga estabilitat en mostres de sang congelades i resulta una tècnica fàcilment disponible en la majoria de laboratoris [214]. No obstant, s'han descrit diverses limitacions sobre la seva determinació com a marcador de malaltia cardiovascular, tals com la seva variabilitat biològica podent ser fàcilment modificable per diferents processos inflamatoris o infecciosos inclús a nivell local. Presenta a més elevada variabilitat intraindividual i també entre els diferents assajos clínics [215,216], havent-se descrit, a més, augments en funció de l'edat i sexe (major nivells en edat avançada i dones) [217]. S'han identificat nivells d'hsCRP un 40% més alts de mitjana en dones i es correlacionen positivament amb l'edat i la raça, segons diversos estudis [189,218,219]. Tot i que alguns estudis han demostrat que les dones tenen nivells basals de GlycA més elevats en comparació amb els homes, aquestes diferències no van superar el 10% sense presentar gran variabilitat entre els dos sexes [196,220]. No obstant, cal establir els intervals de GlycA de referència per a cadascun dels sexes [221]. Alguns estudis han mostrat un major nivell de variabilitat en l'hsCRP respecte als nivells de colesterol [163]. Això ha donat lloc a la cerca d'altres biomarcadors amb menys variabilitat per factors inherents propis dels individus. Otvos et al. corroboren la variabilitat d'hsCRP respecte als nivells de colesterol, mentre que les mesures seriades de GlycA van mostrar ser almenys tan estables com les de colesterol [170]. Tot i les avantatges prèviament comentats (com presentar bon rendiment analític per tenir estabilitat a llarg termini en mostres de sang congelades que són fàcilment disponibles en la majoria de laboratoris), hsCRP presenta no obstant certes limitacions ja esmentades, com ara la seva variabilitat biològica podent-se modificar les seves concentracions per diferents processos com infeccions, així com un elevat grau de variabilitat intra i interindividual i entre els diferents assajos [205]. Això ha promogut la cerca de nous biomarcadors inflamatoris alternatius que presentin major precisió i exactitud.

Alguns treballs postulen que hsCRP i les glicoproteïnes poden seguir vies inflamatòries diferents que justificarien el seu comportament diferent [222]. GlycA podria integrar diferents vies inflamatòries, de manera que milloraria la captura del grau de inflamació sistèmica a partir de la senyal global de diverses proteïnes [168]. Alguns autors suggereixen que l'ús d'ambdós marcadors pot proporcionar informació addicional sobre l'estat de la malaltia inflamatòria [185,223].

En resum, les avantatges de la determinació de glicoproteïnes respecte a hsCRP són la determinació única d'aquestes mentre que hsCRP requereix diverses mesures, que les glicoproteïnes no son dependents del dejuni, que les seves mesures són similars tant en sèrum com en plasma amb una estabilitat en el emmagatzematge a llarg termini i que presenten una menor variabilitat intraindividual degut a la seva naturalesa composta [168].

Als nostres treballs en PLWH progressors i pacients amb HF (Paper 1 i 3), els nivells de glicoproteïnes es van correlacionar amb factors predictors de cada malaltia comunament descrits fins la data (cèl·lules T CD4<sup>+</sup> basals i càrrega viral en PLWH i en nivells de lípids en HF) així com amb hsCRP. A més al Paper 3, el model de predicció de desenvolupament de placa carotídia va ser superior en el model que va incloure GlycB respecte a hsCRP.

### **Significat de GlycA, GlycB, H/W GlycA, H/W GlycB determinades per <sup>1</sup>H-RMN**

De forma similar a hsCRP, GlycA i GlycB son marcadors d'inflamació crònica [189] que tot i ser similars, capturen aspectes diferents de la resposta inflamatòria [199], visibles com a dos senyals diferents de RMN malgrat marcar modificacions similars de les mateixes proteïnes, considerant-se complementaris, amplificant les possibilitats de captar modificacions de proteïnes en fase aguda, captant les porcions d'hidrats de carboni de glicoproteïnes que contenen parts de N-acetilglucosamina i N-acetilgalactosamina (en el cas de GlycA) i àcid N-acetilneuramínic (GlycB). La quantificació de glicoproteïnes per <sup>1</sup>H-RMN a través del senyal de GlycA, proporciona una única mesura de la inflamació sistèmica que pot oferir avantatges en la pràctica clínica. A diferència de les proteïnes de fase aguda com hsCRP o les citocines inflamatòries com IL-6, que són espècies molècules discretes, les senyals de GlycA (i també GlycB) son un biomarcador compost de concentracions integrades i estats de glicosilació de les proteïnes de fase aguda més abundants al sèrum [170]. Els nivells de GlycA i GlycB s'han associat independentment amb condicions metabòliques específiques [168] i amb marcadors comuns d'inflamació com proteïna C reactiva (CRP), fibrinogen, interleucina IL-6, factor de necrosi tumoral-alfa, fosfolipasa associada a lipoproteïnes A2 i amiloide sèrica A [170]. Les correlacions entre GlycA i hsCRP han estat sols moderades en alguns estudis, el que ha suggerit que



tot i que ambdós marcadors es superposen al reflectir aspectes similars de la inflamació sistèmica també podrien identificar diferents aspectes d'aquesta [220]. L'origen compost de GlycA que mesura l'extensió i la complexitat de la N-glicosilació de diverses proteïnes plasmàtiques ofereix una descripció global de "l'estat inflamatori general de l'organisme" [170]. Alguns autors han comparat GlycA com un marcador inflamatori anàleg de l'hemoglobina A1c (HbA1c), que és un biomarcador estable de l'homeòstasi de la glucosa que, a diferència del nivell de glucosa plasmàtica, no presenta variacions diàries o postprandials significatives [224]. De la mateixa manera, en comparació amb hsCRP que té una notable variabilitat intra i interassaig [191,215,216], GlycA és més estable, amb una variabilitat biològica notablement menor (~ 5% vs ~ 30% per hsCRP) [196,220].

### **El mètode utilitzat per <sup>1</sup>H-RMN pot ser d'aplicació clínica**

Tot i que la determinació de glicoproteïnes presenta resultats consistents favorables, el mecanisme de glicosilació i el paper que desenvolupa en els processos patològics encara no està clarament entès. A més cal establir un consens sobre la tècnica per quantificar les glicoproteïnes mitjançant espectroscòpia de RMN de cara a una transferència rigorosa a la clínica en el futur, validant i estandarditzant la tècnica entre els diferents laboratoris [168].

### **Valor de les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN en PLWH no responedors**

El Paper 1, avalua per primera vegada el paper de les glicoproteïnes com a marcador inflamatori i pronòstic en pacients PLWH no responedors. Els nostres resultats van mostrar que les concentracions de GlycA i GlycB i els seus paràmetres derivats H/W són més elevades en pacients amb pitjor estat immunològic (menor recompte de CD4<sup>+</sup>) i també són un indicador pronòstic. Aquells pacients amb concentracions basals de glicoproteïnes més altes presenten menys resposta al TAR.

Fins la data, s'havien identificat com a factors relacionats amb la immunodiscordança el recompte de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> en el moment del diagnòstic [37], l'edat, l'ús de drogues per via parenteral [32] i la ràpida disminució de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> [31]. Els nostres resultats van mostrar que els valors de glicoproteïna basal es van correlacionar tant amb les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> com amb la càrrega viral. Tot i que la determinació inicial d'un únic paràmetre de glicoproteïnes per si sol no va predir la recuperació immunològica, el conjunt d'ells obtingut per <sup>1</sup>H-RMN (concentracions de Glyc A i B i els seus H/W derivats) va predir la condició de recuperació a temps basal. Aquesta determinació

conjunta fins i tot abans de l'inici del tractament, va ser superior al recompte basal de cèl·lules TCD4<sup>+</sup> per a la predicció de la recuperació o no recuperació. La predicció va augmentar al incloure al model a més de les glicoproteïnes, els nivells de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i l'edat, augmentant així el valor predictiu respecte als nivells de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> per si sols. A més, els nivells basals de glicoproteïna es van correlacionar amb el recompte final de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>/μL.

### **Valor predictiu de les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN a la resposta terapèutica en PLWH no responedors**

Un altra troballa destacada va ser l'impacte del TAR en els marcadors d'inflamació. Va haver una notable reducció de les glicoproteïnes a la setmana 48 de tractament respecte a la línia de base. En aquest cas el TAR sí va mostrar influir el descens de les glicoproteïnes, estant aquestes troballes en consonància amb les descrites per Kelesidis et al., on descriuen per primera vegada (i única) l'impacte del tractament antiretroviral sobre la concentració de glicoproteïnes. Els descens de les concentracions de glicoproteïnes durant el TAR reforça la necessitat del seu inici precoç al diagnòstic de cara a rebaixar el grau d'inflamació per disminuir la incidència d'esdeveniments no SIDA.

Donada la falta de biomarcadors fins la data que resulten fiables i robustos per a la predicció de immunodiscordança, considerem que els nostres resultats amb les glicoproteïnes com a predictors, ofereixen una nova estratègia predictiva consistent per a aquesta predicció. Això es fonamenta en que la naturalesa composta de la mesura de la glicoproteïna <sup>1</sup>H-RMN permet capturar millor la inflamació sistèmica, amb una associació més gran amb la morbiditat i la mortalitat en comparació amb biomarcadors únics com hsCRP [187,195,225]. Caldria més estudis per poder consolidar les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN com marcador de resposta immunològica.

### **Valor predictiu de les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN en controladors d'elit.**

El Paper 2, investiguem el valor predictiu del senyal de les glicoproteïnes en la pèrdua del control viral en controladors d'elit. L'objectiu va ser determinar el paper de les glicoproteïnes per RMN en l'avaluació de l'estat inflamatori en controladors d'elit, fet que és la base per a la justificació del inici de TAR, tot i el control viral espontani. En el nostre treball, descrivim el perfil de glicoproteïnes en funció de l'estat dels individus amb

infecció crònica pel VIH; PLWH-CE, controladors d'elit on es diferencien els que perden el control viral (CT) i els que el mantenen (CP), així com TP (progressadors típics diferenciant-los en funció del seu nombre de CD4<sup>+</sup>) i controls sans sense infecció pel VIH. Vam observar que el perfil de glicoproteïnes continuava sent el mateix entre individus CP i CT abans de la pèrdua espontània del control viral, sense trobar diferències que pogueren orientar a quins individus perdrien el control espontani de la càrrega viral. Tanmateix, es va observar una associació significativa de H/W GlycA amb la càrrega viral en els CT un cop van perdre el control viral (T0). Aquesta troballa està en línia amb les troballes obtingudes al Paper 1, en què les glicoproteïnes mostraven una marcada associació amb la càrrega viral. PLWH-CE presentaven nivells de glicoproteïna més alts que els dels individus sans sense infecció pel VIH. Tanmateix, quan es comparen per separat (CP i CT), els CP i els individus sans no VIH no van mostrar diferències en els perfils de glicoproteïnes, mostrant que els CP tenen un perfil de glicoproteïnes més semblant al dels individus no infectats. D'aquesta manera, sols els CT van mostrar diferències en els nivells de glicoproteïna en comparació amb els pacients sans. Aquesta troballa reflecteix la inflamació de baix grau que es produeix paral·lelament a la pèrdua del control viral espontani, responsable de les comorbiditats no relacionades amb la SIDA [76]. La presència d'inflamació de baix grau en absència de supressió de la replicació viral també s'evidencia quan es compara PLWH-TP amb PLWH-CE, en què la concentració de glicoproteïnes i les seves proporcions eren més altes en els PLWH-TP (que presentaven càrrega viral més elevada i nivells més baixos de CD4<sup>+</sup>). Així, com s'ha vist en la publicació anterior, un nivell més alt de glicoproteïnes s'associarà amb una disminució del recompte de CD4<sup>+</sup> i una càrrega viral més elevada. Aquest resultat també es va observar al separar els TP en subgrups, on el subgrup amb el millor estat immunitari (cèl·lules T CD4<sup>+</sup> > 350) presentava un perfil de glicoproteïnes més semblant al PLWH-CE en comparació amb el grup de PLWH-TP amb major immunosupressió (cèl·lules T CD4<sup>+</sup> < 100 cèl·lules/ $\mu$ L). La principal limitació d'aquest estudi va ser el nombre reduït de subjectes a cada grup de l'estudi, cosa que probablement es va traduir en que no hi havia prou potència per detectar un valor predictiu significatiu de les mesures GlycA i B, ja que en estudis anteriors (Paper 1) sí que van predir la recuperació immune. No obstant això, s'ha de tenir en compte que els controladors d'elit són una població excepcional dintre dels PLWH, i per tant els grups d'estudi són habitualment petits. D'aquesta manera, vam seleccionar el mateix nombre de participants pels altres subconjunts. Calen estudis

de cohorts més grans per establir si les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN poden ser útils per predir la pèrdua de control viral espontani.

### **Valor de les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN per detectar inflamació subclínica en HF a temps basal**

Els subjectes de la cohort HF van mostrar concentracions més elevades de glicoproteïnes i hsCRP que els individus sans, donant suport a la idea que la HF és una malaltia inflamatòria subclínica crònica. A més, tots els paràmetres derivats de les glicoproteïnes (GlycA, GlycB, H/W GlycA i H/W GlycB) es van associar significativament amb els nivells d'hsCRP, sICAM-1 i sE-selectina. Prèviament s'havia descrit la seva associació amb marcadors comuns d'inflamació com proteïna C reactiva (CRP), fibrinogen, IL-6, TNF $\alpha$ , fosfolipasa associada a lipoproteïnes A2 i amiloide sèric A [170].

D'altra banda, les glicoproteïnes van mostrar una forta correlació amb els paràmetres d'adipositat i els valors lipídics, especialment els nivells de triglicèrids, amb hsCRP i altres marcadors d'inflamació i paràmetres d'aterosclerosi subclínica. Els pacients amb HF en el que no es va identificar la variant de la mutació presentaven uns triglicèrids, índex de massa corporal (IMC) i una circumferència de la cintura més elevats respecte als individus amb mutacions identificables. Aquests individus van mostrar uns nivells de GlycA més elevats. Tot i que el LDLc s'associa directament amb GlycA i GlycB, aquestes estaven més fortament relacionats amb els triglicèrids (tot i que ambdós grups de la cohort presentaven una concentració de triglicèrids i un IMC dins del rang normal). Aquestes troballes podrien suggerir que les elevacions de triglicèrids en pacients amb HF determinarien un risc cardiovascular més alt i també reforça el paper dels triglicèrids com a mediadors de la inflamació crònica subclínica. Aquests resultats es mostren en la línia d'estudis previs on s'ha establert una correlació entre els nivells basals de GlycA i diversos altres factors de risc cardiovasculars ben establerts com hsCRP, colesterol total, LDL-C, IMC, tabaquisme, hipertensió i nivells de triglicèrids, individualment [170,187,191,195,196,220].

### **Valor predictiu de les glicoproteïnes determinades per <sup>1</sup>H-RMN per detectar lesió vascular en HF**

En aquesta línia, el Paper 3 mostra models predictius de l'aparició de placa carotídia a 5 anys de seguiment en individus HF sense presència de placa basal. Quan no es va incloure l'edat, GlycB i el colesterol total van mostrar un efecte significatiu [odds ratio = 1,010, (p

= 0,05); proporció = 1,010, ( $p = 0,007$ ), respectivament]. Per aprofundir el l'estudi d'aquesta relació, es va crear un grup independent de l'edat ( $n = 48$ ) que incloïa els pacients que havien desenvolupat placa i es va seleccionar un grup de comparació segons l'edat. En aquest grup, el model 1, incloent l'edat i el perfil lipídic estàndard, va mostrar una discriminació no significativa amb una AUC de 0,51 (IC del 95%: 0,3665-0,7064). Després d'incloure  $^1\text{H-RMN GlycB}$ , la capacitat de discriminació va augmentar fins a una AUC de 0,77 (IC del 95%: 0,599-0,8871) mentre que la inclusió de hsCRP va augmentar la capacitat de discriminació del perfil lipídic fins a una AUC de 0,68 (IC del 95%: 0,5032-0,8336) però a un nivell inferior al de GlycB. En aquest model, la concentració de GlycB, seguida de LDLc i HDLc, tenia una major capacitat de discriminació per classificar els pacients en els dos grups. La senyal de GlycB ha estat menys descrita a la bibliografia, pel que la potencia de predicció d'aquesta obre noves vies de investigació. A petició dels revisors, es va incloure finalment un anàlisi multivariant amb glicoproteïnes (Model 1 + hsCRP + (GlycA i GlycB)). És important remarcar que la inclusió d'hsCRP en el model no va mostrar millors resultats de l'AUC.

En quant a l'associació amb IMT, GlycA ni GlycB no es van associar a canvis en IMT després de cinc anys de seguiment, però GlycB va predir millor que hsCRP el desenvolupament de l'aterosclerosi de la placa caròtida de forma prospectiva. D'aquesta manera, el nostre treball mostra com les glicoproteïnes plasmàtiques avaluades per  $^1\text{H-RMN}$ , semblen ser una indicació més robusta d'un estat inflamatori subclínic en pacients HF. Considerem que el principal punt fort del Paper 3 és l'exploració del paper de les glicoproteïnes plasmàtiques avaluades per  $^1\text{H-RMN}$  en pacients amb HF de manera prospectiva. No obstant, una limitació del nostre estudi és l'ús de paràmetres d'alteració vascular en lloc de resultats sobre l'impacte en la malaltia cardiovascular, i la reducció en la mida de la mostra en els pacients analitzats als 5 anys per a la predicció de aparició de placa carotídia.

### **Recopilació de resultats del treball**

Les glicoproteïnes han mostrat ser predictores d'immunodiscordança de forma més potent que els nivells basals de  $\text{CD4}^+$  i que l'hsCRP per a la predicció de desenvolupar placa carotídia en pacients amb HF. Van mostrar augments en els PLWH-CE respecte als individus sans mantenint sols aquesta diferència els CT al comparar-los amb els sans,

mentre que els CP van mostrar un perfil de glicoproteïnes més semblant al dels individus no infectats sense observar-se diferències. Els PLWH-TP van mostrar concentracions més elevades de glicoproteïnes que els PLWH-CE, presentant el subgrup de TP T CD4+> 350 cèl·lules/mL, menys diferències amb els PLWH-CE. Es van observar correlacions de les glicoproteïnes a la cohort de VIH amb nivells de CD4<sup>+</sup> i càrrega viral (CV) i amb marcadors de perfil lipídic i condicions metabòliques en els HF, presentant en ambdós poblacions correlació amb l'hsCRP.

## IX PERSPECTIVES DE FUTUR D'AQUESTA LÍNIA DE RECERCA

La perspectiva de futur d'aquesta línia de recerca consisteix en la implementació clínica de la tecnologia estudiada. Per això s'ha de mostrar que la informació que ens dona es de utilitat en la pràctica mèdica.

- En el camp de les malalties infeccioses la utilització d'aquest marcador de inflamació pot donar claus pronòstiques. La seva utilitat en la infecció per SARS-Cov2 es un repte immediat.
- En el camp de les malalties cardiovasculars, cal avaluar si l'impacte de teràpies hipolipemiantes amb efectes antiinflamatòries pot ser monitoritzat per aquests paràmetres. Un camp d'especial interès pot ser l'estudi dels efectes dels omega-3 i en especial del eicosapent etil del que no es coneixen els mecanismes associats a la seva capacitat de prevenció cardiovascular.
- Disposem de dades sobre les concentracions de glicoproteïnes en situacions com la diabetis o la obesitat, el seu impacte clínic i la capacitat de modificar la actitud clínica està per resoldre.
- L'increment de risc vascular de les malalties autoimmunes inflamatòries cròniques podria ser millor avaluat amb marcadors com les glicoproteïnes que informen sobre un estat de inflamació sistèmica i subclínica.

## X CONCLUSIONS

Les concentracions de glicoproteïnes sèriques determinades per  $^1\text{H-NMR}$  són un marcador robust d'inflamació crònica de baix grau.

Les concentracions de glicoproteïnes sèriques determinades per  $^1\text{H-NMR}$  són tant o més informatives del grau d'inflamació que la determinació d'hsCRP, en situacions de inflamació crònica subclínica, probablement per la seva menor variabilitat biològica.

Les concentracions de glicoproteïnes sèriques determinades per  $^1\text{H-NMR}$  són un marcador pronòstic en pacients PLWH. Un major grau inflamatori s'associa a pitjor pronòstic de malaltia.

Les concentracions de glicoproteïnes sèriques determinades per  $^1\text{H-NMR}$  milloren en resposta al TAR i poden ser un marcador d'eficàcia terapèutica.

Les concentracions de glicoproteïnes sèriques determinades per  $^1\text{H-NMR}$  en controladors d'elit persistents, mostren un perfil més semblant als individus sans, a diferència dels controladors transitoris.

Els PLWH progressors típics mostren concentracions de glicoproteïnes sèriques determinades per  $^1\text{H-NMR}$  més elevades respecte als controladors d'elit, sent més marcat en els individus amb major immunosupressió.

Les concentracions de glicoproteïnes sèriques determinades per  $^1\text{H-NMR}$  són un marcador robust d'inflamació crònica de baix grau en pacients amb HF. Les seves concentracions es relacionen amb el pronòstic de desenvolupament d'arteriosclerosi subclínica.

La determinació de glicoproteïnes per  $^1\text{H-NMR}$  es pot considerar una eina eficaç amb potencial aplicació clínica en aquells processos caracteritzats per un estat inflamatori crònic subclínic.



## XI ANNEX

### Altres publicacions:

Rodríguez-Borjabad C, Narveud I, Christensen JJ, Ulven SM, **Malo AI**, Ibarretxe D, Girona J, Torvik K, Bogsrud MP, Retterstøl K, Plana N, Masana L, Holven KB. Dietary intake and lipid levels in Norwegian and Spanish children with familial hypercholesterolemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2021 Apr 9;31(4):1299-1307. doi: 10.1016/j.numecd.2020.12.002.

Masip J, Gasca-Capote C, Jimenez-Leon MR, Peraire J, Perez-Gomez A, Alba V, **Malo AI**, Leal L, Martín CR, Rallón N, Viladés C, Olona M, Vidal F, Ruiz-Mateos E, Rull A; ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network (Annex S1). Differential miRNA plasma profiles associated with the spontaneous loss of HIV-1 control: miR-199a-3p and its potential role as a biomarker for quick screening of elite controllers. *Clin Transl Med.* 2021 Jul;11(7):e474. doi: 10.1002/ctm2.474.

Amigó N, Fuertes-Martín R, **Malo AI**, Plana N, Ibarretxe D, Girona J, Correig X, Masana L. Glycoprotein Profile Measured by a <sup>1</sup>H-Nuclear Magnetic Resonance Based on Approach in Patients with Diabetes: A New Robust Method to Assess Inflammation. *Life (Basel).* 2021 Dec 16;11(12):1407. doi: 10.3390/life11121407.

Rodríguez-Borjabad C, **Malo AI**, Ibarretxe D, Girona J, Heras M, Ferré R, Feliu A, Salvadó M, Varela A, Amigó N, Masana L, Plana N; DECOPIN Group; DECOPIN GROUP Investigators who have participated in patient recruitment. Efficacy of therapeutic lifestyle changes on lipid profiles assessed by NMR in children with familial and non-familial hypercholesterolemia. *Clin Investig Arterioscler.* 2020 Mar-Apr;32(2):49-58. English, Spanish. doi: 10.1016/j.arteri.2019.10.001.

## XII BIBLIOGRAFIA

1. Takeuchi, O.; Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010, 140, 805–820, doi:10.1016/j.cell.2010.01.022.
2. Kolaczowska, E.; Kubes, P. Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013, 13, 159–175, doi:10.1038/nri3399.
3. Feehan, K.T.; Gilroy, D.W. Is Resolution the End of Inflammation? *Trends Mol Med* 2019, 25, 198–214, doi:10.1016/j.molmed.2019.01.006.
4. Sg, D.; R, T.; Dc, D. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity* 2013, 39, doi:10.1016/j.immuni.2013.10.001.
5. Massanella, M.; Negro, E.; Clotet, B.; Blanco, J. Immunodiscordant Responses to HAART--Mechanisms and Consequences. *Expert Rev Clin Immunol* 2013, 9, 1135–1149, doi:10.1586/1744666X.2013.842897.
6. Baker, J.V.; Peng, G.; Rapkin, J.; Abrams, D.I.; Silverberg, M.J.; MacArthur, R.D.; Cavert, W.P.; Henry, W.K.; Neaton, J.D.; Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS (CPCRA) CD4+ Count and Risk of Non-AIDS Diseases Following Initial Treatment for HIV Infection. *AIDS* 2008, 22, 841–848, doi:10.1097/QAD.0b013e3282f7cb76.
7. Hunt, P.W.; Lee, S.A.; Siedner, M.J. Immunologic Biomarkers, Morbidity, and Mortality in Treated HIV Infection. *J Infect Dis* 2016, 214 Suppl 2, S44-50, doi:10.1093/infdis/jiw275.
8. Freiberg, M.S.; Chang, C.-C.H.; Kuller, L.H.; Skanderson, M.; Lowy, E.; Kraemer, K.L.; Butt, A.A.; Bidwell Goetz, M.; Leaf, D.; Oursler, K.A.; et al. HIV Infection and the Risk of Acute Myocardial Infarction. *JAMA Intern Med* 2013, 173, 614–622, doi:10.1001/jamainternmed.2013.3728.
9. Weber, R.; Sabin, C.A.; Friis-Møller, N.; Reiss, P.; El-Sadr, W.M.; Kirk, O.; Dabis, F.; Law, M.G.; Pradier, C.; De Wit, S.; et al. Liver-Related Deaths in Persons Infected with the Human Immunodeficiency Virus: The D:A:D Study. *Arch Intern Med* 2006, 166, 1632–1641, doi:10.1001/archinte.166.15.1632.
10. Neuhaus, J.; Jr, D.R.J.; Baker, J. V; Calmy, A.; Rosa, A. La; Kuller, L.H.; Pett, S.L.; Ristola, M.; Michael, J.; Shlipak, M.G.; et al. Markers of Inflammation, Coagulation and Renal Function Are Elevated in Adults with HIV Infection. 2011, 201, 1788–1795, doi:10.1086/652749.Markers.

11. Burgi, A.; Brodine, S.; Wegner, S.; Milazzo, M.; Wallace, M.R.; Spooner, K.; Blazes, D.L.; Agan, B.K.; Armstrong, A.; Fraser, S.; et al. Incidence and Risk Factors for the Occurrence of Non-AIDS-Defining Cancers among Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. *Cancer* 2005, 104, 1505–1511, doi:10.1002/cncr.21334.
12. Gustafson, D.R.; Shi, Q.; Thurn, M.; Holman, S.; Minkoff, H.; Cohen, M.; Plankey, M.W.; Havlik, R.; Sharma, A.; Gange, S.; et al. Frailty and Constellations of Factors in Aging HIV-Infected and Uninfected Women--The Women's Interagency HIV Study. *J Frailty Aging* 2016, 5, 43–48, doi:10.14283/jfa.2016.79.
13. Bloch, M.; John, M.; Smith, D.; Rasmussen, T.A.; Wright, E. Managing HIV-Associated Inflammation and Ageing in the Era of Modern ART. *HIV Med* 2020, 21 Suppl 3, 2–16, doi:10.1111/hiv.12952.
14. Portilla, J. [Patient-related cardiovascular risk factors in the HIV-infected population]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009, 27 Suppl 1, 10–16, doi:10.1016/S0213-005X(09)73440-8.
15. Maniar, A.; Ellis, C.; Asmuth, D.; Pollard, R.; Rutledge, J. HIV Infection and Atherosclerosis: Evaluating the Drivers of Inflammation. *Eur J Prev Cardiol* 2013, 20, 720–728, doi:10.1177/2047487312447843.
16. McCune, J.M. The Dynamics of CD4+ T-Cell Depletion in HIV Disease. *Nature* 2001, 410, 974–979, doi:10.1038/35073648.
17. Grossman, Z.; Meier-Schellersheim, M.; Sousa, A.E.; Victorino, R.M.M.; Paul, W.E. CD4+ T-Cell Depletion in HIV Infection: Are We Closer to Understanding the Cause? *Nat Med* 2002, 8, 319–323, doi:10.1038/nm0402-319.
18. French, M.A.; King, M.S.; Tschampa, J.M.; da Silva, B.A.; Landay, A.L. Serum Immune Activation Markers Are Persistently Increased in Patients with HIV Infection after 6 Years of Antiretroviral Therapy despite Suppression of Viral Replication and Reconstitution of CD4 + T Cells. *The Journal of Infectious Diseases* 2009, 200, 1212–1215, doi:10.1086/605890.
19. Tien, P.C.; Choi, A.I.; Zolopa, A.R.; Benson, C.; Tracy, R.; Scherzer, R.; Bacchetti, P.; Shlipak, M.; Grunfeld, C. Inflammation and Mortality in HIV-Infected Adults: Analysis of the FRAM Study Cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010, 55, 316–322, doi:10.1097/QAI.0b013e3181e66216.
20. Brenchley, J.M.; Schacker, T.W.; Ruff, L.E.; Price, D.A.; Taylor, J.H.; Beilman, G.J.; Nguyen, P.L.; Khoruts, A.; Larson, M.; Haase, A.T.; et al. CD4+ T Cell Depletion

during All Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med* 2004, 200, 749–759, doi:10.1084/jem.20040874.

21. Nasi, M.; Pinti, M.; Mussini, C.; Cossarizza, A. Persistent Inflammation in HIV Infection: Established Concepts, New Perspectives. *Immunology Letters* 2014, 161, 184–188, doi:10.1016/j.imlet.2014.01.008.
22. Chevalier, M.F.; Petitjean, G.; Dunyach-Rémy, C.; Didier, C.; Girard, P.-M.; Manea, M.E.; Campa, P.; Meyer, L.; Rouzioux, C.; Lavigne, J.-P.; et al. The Th17/Treg Ratio, IL-1RA and SCD14 Levels in Primary HIV Infection Predict the T-Cell Activation Set Point in the Absence of Systemic Microbial Translocation. *PLoS Pathog* 2013, 9, e1003453, doi:10.1371/journal.ppat.1003453.
23. Brenchley, J.M.; Price, D.A.; Schacker, T.W.; Asher, T.E.; Silvestri, G.; Rao, S.; Kazzaz, Z.; Bornstein, E.; Lambotte, O.; Altmann, D.; et al. Microbial Translocation Is a Cause of Systemic Immune Activation in Chronic HIV Infection. *Nat Med* 2006, 12, 1365–1371, doi:10.1038/nm1511.
24. Vassallo, M.; Mercié, P.; Cottalorda, J.; Ticchioni, M.; Dellamonica, P. The Role of Lipopolysaccharide as a Marker of Immune Activation in HIV-1 Infected Patients: A Systematic Literature Review. *Virology Journal* 2012, 9, 174.
25. Mavigner, M.; Cazabat, M.; Dubois, M.; L'Faqihi, F.-E.; Requena, M.; Pasquier, C.; Klopp, P.; Amar, J.; Alric, L.; Barange, K.; et al. Altered CD4+ T Cell Homing to the Gut Impairs Mucosal Immune Reconstitution in Treated HIV-Infected Individuals. *J Clin Invest* 2012, 122, 62–69, doi:10.1172/JCI59011.
26. Guadalupe, M.; Sankaran, S.; George, M.D.; Reay, E.; Verhoeven, D.; Shacklett, B.L.; Flamm, J.; Wegelin, J.; Prindiville, T.; Dandekar, S. Viral Suppression and Immune Restoration in the Gastrointestinal Mucosa of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Initiating Therapy during Primary or Chronic Infection. *J Virol* 2006, 80, 8236–8247, doi:10.1128/JVI.00120-06.
27. Mehandru, S.; Poles, M.A.; Tenner-Racz, K.; Jean-Pierre, P.; Manuelli, V.; Lopez, P.; Shet, A.; Low, A.; Mohri, H.; Boden, D.; et al. Lack of Mucosal Immune Reconstitution during Prolonged Treatment of Acute and Early HIV-1 Infection. *PLoS Med* 2006, 3, e484, doi:10.1371/journal.pmed.0030484.
28. Klatt, N.R.; Funderburg, N.T.; Brenchley, J.M. Microbial Translocation, Immune Activation, and HIV Disease. *Trends in Microbiology* 2013, 21, 6–13.
29. Libby, P.; Ridker, P.M.; Hansson, G.K. Progress and Challenges in Translating the Biology of Atherosclerosis. *Nature* 2011, 473, 317–325, doi:10.1038/nature10146.

30. Appay, V.; Sauce, D. Immune Activation and Inflammation in HIV-1 Infection: Causes and Consequences. *The Journal of Pathology* 2008, 214, 231–241, doi:10.1002/path.2276.
31. Darraj, M.; Shafer, L.A.; Chan, S.; Kasper, K.; Keynan, Y. Rapid CD4 Decline Prior to Antiretroviral Therapy Predicts Subsequent Failure to Reconstitute despite HIV Viral Suppression. *Journal of Infection and Public Health* 2018, 11, 265–269, doi:10.1016/j.jiph.2017.08.001.
32. Yolanda, M.P.; Inmaculada, J.; Julia, D.A.; Santiago, M.; Jose, A.I.; Pompeyo, V.; Jorge, P.; Juan, L.G.-S.; Felix, G.; Jose, R.B.; et al. Risk Factors, CD4 Long-Term Evolution and Mortality of HIV-Infected Patients Who Persistently Maintain Low CD4 Counts, Despite Virological Response to HAART. *Current HIV Research* 2009, 7, 612–619.
33. Kelly, C.; Gaskell, K.M.; Richardson, M.; Klein, N.; Garner, P.; MacPherson, P. Discordant Immune Response with Antiretroviral Therapy in HIV-1: A Systematic Review of Clinical Outcomes. *PLoS One* 2016, 11, e0156099, doi:10.1371/journal.pone.0156099.
34. Yang, X.; Su, B.; Zhang, X.; Liu, Y.; Wu, H.; Zhang, T. Incomplete Immune Reconstitution in HIV/AIDS Patients on Antiretroviral Therapy: Challenges of Immunological Non-Responders. *J Leukoc Biol* 2020, 107, 597–612, doi:10.1002/JLB.4MR1019-189R.
35. Cf, K.; Cm, K.; Pw, H.; B, R.; Fm, H.; M, K.; Hm, C.; J, W.; M, M.; M, S.; et al. Incomplete Peripheral CD4+ Cell Count Restoration in HIV-Infected Patients Receiving Long-Term Antiretroviral Treatment. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009, 48, doi:10.1086/597093.
36. Monforte, A. d'Arminio; Abrams, D.; Pradier, C.; Weber, R.; Reiss, P.; Bonnet, F.; Kirk, O.; Law, M.; De Wit, S.; Friis-Møller, N.; et al. HIV-Induced Immunodeficiency and Mortality from AIDS-Defining and Non-AIDS-Defining Malignancies. *AIDS* 2008, 22, 2143–2153, doi:10.1097/QAD.0b013e3283112b77.
37. Gk, R.; Jg, S.; Es, C.; Dm, A.; Rt, G.; Ba, R.; G, S.; Pr, S.; Rw, S.; Rb, P. Incomplete Reconstitution of T Cell Subsets on Combination Antiretroviral Therapy in the AIDS Clinical Trials Group Protocol 384. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009, 48, doi:10.1086/595888.
38. Gandhi, R.T.; Spritzler, J.; Chan, E.; Asmuth, D.M.; Rodriguez, B.; Merigan, T.C.; Hirsch, M.S.; Shafer, R.W.; Robbins, G.K.; Pollard, R.B.; et al. Effect of Baseline-

- and Treatment-Related Factors on Immunologic Recovery after Initiation of Antiretroviral Therapy in HIV-1-Positive Subjects: Results from ACTG 384. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006, 42, 426–434, doi:10.1097/01.qai.0000226789.51992.3f.
39. Deeks, S.G.; Kitchen, C.M.R.; Liu, L.; Guo, H.; Gascon, R.; Narváez, A.B.; Hunt, P.; Martin, J.N.; Kahn, J.O.; Levy, J.; et al. Immune Activation Set Point during Early HIV Infection Predicts Subsequent CD4+ T-Cell Changes Independent of Viral Load. *Blood* 2004, 104, 942–947, doi:10.1182/blood-2003-09-3333.
40. Hunt, P.W.; Martin, J.N.; Sinclair, E.; Bredt, B.; Hagos, E.; Lampiris, H.; Deeks, S.G. T Cell Activation Is Associated with Lower CD4+ T Cell Gains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Sustained Viral Suppression during Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* 2003, 187, 1534–1543, doi:10.1086/374786.
41. Li, T.; Wu, N.; Dai, Y.; Qiu, Z.; Han, Y.; Xie, J.; Zhu, T.; Li, Y. Reduced Thymic Output Is a Major Mechanism of Immune Reconstitution Failure in HIV-Infected Patients after Long-Term Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* 2011, 53, 944–951, doi:10.1093/cid/cir552.
42. Zeng, M.; Southern, P.J.; Reilly, C.S.; Beilman, G.J.; Chipman, J.G.; Schacker, T.W.; Haase, A.T. Lymphoid Tissue Damage in HIV-1 Infection Depletes Naïve T Cells and Limits T Cell Reconstitution after Antiretroviral Therapy. *PLoS Pathog* 2012, 8, e1002437, doi:10.1371/journal.ppat.1002437.
43. Miles, B.; Miller, S.M.; Connick, E. CD4 T Follicular Helper and Regulatory Cell Dynamics and Function in HIV Infection. *Front Immunol* 2016, 7, 659, doi:10.3389/fimmu.2016.00659.
44. Mzingwane, M.L.; Tiemessen, C.T. Mechanisms of HIV Persistence in HIV Reservoirs. *Rev Med Virol* 2017, 27, doi:10.1002/rmv.1924.
45. Nasi, M.; Pinti, M.; Mussini, C.; Cossarizza, A. Persistent Inflammation in HIV Infection: Established Concepts, New Perspectives. *Immunol Lett* 2014, 161, 184–188, doi:10.1016/j.imlet.2014.01.008.
46. Gougeon, M.L.; Montagnier, L. Programmed Cell Death as a Mechanism of CD4 and CD8 T Cell Deletion in AIDS. *Molecular Control and Effect of Highly Active Anti-Retroviral Therapy. Ann N Y Acad Sci* 1999, 887, 199–212, doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07934.x.
47. Massanella, M.; Gómez-Mora, E.; Carrillo, J.; Curriu, M.; Ouchi, D.; Puig, J.; Negro, E.; Cabrera, C.; Clotet, B.; Blanco, J. Increased Ex Vivo Cell Death of Central

Memory CD4 T Cells in Treated HIV Infected Individuals with Unsatisfactory Immune Recovery. *J Transl Med* 2015, 13, 230, doi:10.1186/s12967-015-0601-2.

48. Negro, E.; Massanella, M.; Puig, J.; Pérez-Alvarez, N.; Gallego-Escuredo, J.M.; Villarroya, J.; Villarroya, F.; Moltó, J.; Santos, J.R.; Clotet, B.; et al. Nadir CD4 T Cell Count as Predictor and High CD4 T Cell Intrinsic Apoptosis as Final Mechanism of Poor CD4 T Cell Recovery in Virologically Suppressed HIV-Infected Patients: Clinical Implications. *Clin Infect Dis* 2010, 50, 1300–1308, doi:10.1086/651689.

49. Massanella, M.; Negro, E.; Pérez-Alvarez, N.; Puig, J.; Ruiz-Hernández, R.; Bofill, M.; Clotet, B.; Blanco, J. CD4 T-Cell Hyperactivation and Susceptibility to Cell Death Determine Poor CD4 T-Cell Recovery during Suppressive HAART. *AIDS* 2010, 24, 959–968, doi:10.1097/QAD.0b013e328337b957.

50. Navarrete-Muñoz, M.A.; Restrepo, C.; Benito, J.M.; Rallón, N. Elite Controllers: A Heterogeneous Group of HIV-Infected Patients. *Virulence* 2020, 11, 889–897, doi:10.1080/21505594.2020.1788887.

51. Hubert, J.B.; Burgard, M.; Dussaix, E.; Tamalet, C.; Deveau, C.; Le Chenadec, J.; Chaix, M.L.; Marchadier, E.; Vildé, J.L.; Delfraissy, J.F.; et al. Natural History of Serum HIV-1 RNA Levels in 330 Patients with a Known Date of Infection. The SEROCO Study Group. *AIDS* 2000, 14, 123–131, doi:10.1097/00002030-200001280-00007.

52. Sg, D.; Bd, W. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity* 2007, 27, doi:10.1016/j.immuni.2007.08.010.

53. Casado, C.; Galvez, C.; Pernas, M.; Tarancon-Diez, L.; Rodriguez, C.; Sanchez-Merino, V.; Vera, M.; Olivares, I.; De Pablo-Bernal, R.; Merino-Mansilla, A.; et al. Permanent Control of HIV-1 Pathogenesis in Exceptional Elite Controllers: A Model of Spontaneous Cure. *Sci Rep* 2020, 10, 1902, doi:10.1038/s41598-020-58696-y.

54. Madec, Y.; Boufassa, F.; Rouzioux, C.; Delfraissy, J.-F.; Meyer, L.; SEROCO Study Group. Undetectable Viremia without Antiretroviral Therapy in Patients with HIV Seroconversion: An Uncommon Phenomenon? *Clin Infect Dis* 2005, 40, 1350–1354, doi:10.1086/429318.

55. Madec, Y.; Boufassa, F.; Porter, K.; Meyer, L.; CASCADE Collaboration. Spontaneous Control of Viral Load and CD4 Cell Count Progression among HIV-1 Seroconverters. *AIDS* 2005, 19, 2001–2007, doi:10.1097/01.aids.0000194134.28135.cd.

56. Altfeld, M.; Allen, T.M. Hitting HIV Where It Hurts: An Alternative Approach to HIV Vaccine Design. *Trends Immunol* 2006, 27, 504–510, doi:10.1016/j.it.2006.09.007.

57. Casado, C.; Colombo, S.; Rauch, A.; Martínez, R.; Günthard, H.F.; Garcia, S.; Rodríguez, C.; Del Romero, J.; Telenti, A.; López-Galíndez, C. Host and Viral Genetic Correlates of Clinical Definitions of HIV-1 Disease Progression. *PLoS One* 2010, 5, e11079, doi:10.1371/journal.pone.0011079.
58. Sandonís, V.; Casado, C.; Alvaro, T.; Pernas, M.; Olivares, I.; García, S.; Rodríguez, C.; del Romero, J.; López-Galíndez, C. A Combination of Defective DNA and Protective Host Factors Are Found in a Set of HIV-1 Ancestral LTNPs. *Virology* 2009, 391, 73–82, doi:10.1016/j.virol.2009.05.022.
59. Hatano, H.; Delwart, E.L.; Norris, P.J.; Lee, T.-H.; Dunn-Williams, J.; Hunt, P.W.; Hoh, R.; Stramer, S.L.; Linnen, J.M.; McCune, J.M.; et al. Evidence for Persistent Low-Level Viremia in Individuals Who Control Human Immunodeficiency Virus in the Absence of Antiretroviral Therapy. *J Virol* 2009, 83, 329–335, doi:10.1128/JVI.01763-08.
60. Miura, T.; Brockman, M.A.; Brumme, Z.L.; Brumme, C.J.; Pereyra, F.; Trocha, A.; Block, B.L.; Schneidewind, A.; Allen, T.M.; Heckerman, D.; et al. HLA-Associated Alterations in Replication Capacity of Chimeric NL4-3 Viruses Carrying Gag-Protease from Elite Controllers of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 2009, 83, 140–149, doi:10.1128/JVI.01471-08.
61. Lassen, K.G.; Lobritz, M.A.; Bailey, J.R.; Johnston, S.; Nguyen, S.; Lee, B.; Chou, T.; Siliciano, R.F.; Markowitz, M.; Arts, E.J. Elite Suppressor-Derived HIV-1 Envelope Glycoproteins Exhibit Reduced Entry Efficiency and Kinetics. *PLoS Pathog* 2009, 5, e1000377, doi:10.1371/journal.ppat.1000377.
62. Hunt, P.W.; Brenchley, J.; Sinclair, E.; McCune, J.M.; Roland, M.; Page-Shafer, K.; Hsue, P.; Emu, B.; Krone, M.; Lampiris, H.; et al. Relationship between T Cell Activation and CD4+ T Cell Count in HIV-Seropositive Individuals with Undetectable Plasma HIV RNA Levels in the Absence of Therapy. *J Infect Dis* 2008, 197, 126–133, doi:10.1086/524143.
63. Emu, B.; Sinclair, E.; Favre, D.; Moretto, W.J.; Hsue, P.; Hoh, R.; Martin, J.N.; Nixon, D.F.; McCune, J.M.; Deeks, S.G. Phenotypic, Functional, and Kinetic Parameters Associated with Apparent T-Cell Control of Human Immunodeficiency Virus Replication in Individuals with and without Antiretroviral Treatment. *J Virol* 2005, 79, 14169–14178, doi:10.1128/JVI.79.22.14169-14178.2005.
64. Almeida, J.R.; Price, D.A.; Papagno, L.; Arkoub, Z.A.; Sauce, D.; Bornstein, E.; Asher, T.E.; Samri, A.; Schnuriger, A.; Theodorou, I.; et al. Superior Control of HIV-1



Replication by CD8<sup>+</sup> T Cells Is Reflected by Their Avidity, Polyfunctionality, and Clonal Turnover. *J Exp Med* 2007, 204, 2473–2485, doi:10.1084/jem.20070784.

65. Porichis, F.; Kaufmann, D.E. HIV-Specific CD4 T Cells and Immune Control of Viral Replication. *Curr Opin HIV AIDS* 2011, 6, 174–180, doi:10.1097/COH.0b013e3283454058.

66. Sáez-Cirión, A.; Hamimi, C.; Bergamaschi, A.; David, A.; Versmisse, P.; Mélard, A.; Boufassa, F.; Barré-Sinoussi, F.; Lambotte, O.; Rouzioux, C.; et al. Restriction of HIV-1 Replication in Macrophages and CD4<sup>+</sup> T Cells from HIV Controllers. *Blood* 2011, 118, 955–964, doi:10.1182/blood-2010-12-327106.

67. Pernas, M.; Tarancón-Diez, L.; Rodríguez-Gallego, E.; Gómez, J.; Prado, J.G.; Casado, C.; Dominguez-Molina, B.; Olivares, I.; Coiras, M.; León, A.; et al. Factors Leading to the Loss of Natural Elite Control of HIV-1 Infection. *J Virol* 2018, 92, doi:10.1128/JVI.01805-17.

68. Ruiz-Mateos, E.; Poveda, E.; Lederman, M.M. Antiretroviral Treatment for HIV Elite Controllers? *Pathog Immun* 2020, 5, 121–133, doi:10.20411/pai.v5i1.364.

69. Noel, N.; Lerolle, N.; Lécuroux, C.; Goujard, C.; Venet, A.; Saez-Cirion, A.; Avettand-Fenoël, V.; Meyer, L.; Boufassa, F.; Lambotte, O.; et al. Immunologic and Virologic Progression in HIV Controllers: The Role of Viral “Blips” and Immune Activation in the ANRS CO21 CODEX Study. *PLoS One* 2015, 10, e0131922, doi:10.1371/journal.pone.0131922.

70. Bello, G.; Casado, C.; García, S.; Rodríguez, C.; del Romero, J.; Carvajal-Rodríguez, A.; Posada, D.; López-Galíndez, C. Lack of Temporal Structure in the Short Term HIV-1 Evolution within Asymptomatic Naïve Patients. *Virology* 2007, 362, 294–303, doi:10.1016/j.virol.2006.11.039.

71. Chereau, F.; Madec, Y.; Sabin, C.; Obel, N.; Ruiz-Mateos, E.; Chrysos, G.; Fidler, S.; Lehmann, C.; Zangerle, R.; Wittkop, L.; et al. Impact of CD4 and CD8 Dynamics and Viral Rebounds on Loss of Virological Control in HIV Controllers. *PLoS One* 2017, 12, e0173893, doi:10.1371/journal.pone.0173893.

72. E, R.-M.; E, P.; Mm, L. Antiretroviral Treatment for HIV Elite Controllers? *Pathogens & immunity* 2020, 5, doi:10.20411/pai.v5i1.364.

73. Dominguez-Molina, B.; Leon, A.; Rodriguez, C.; Benito, J.M.; Lopez-Galindez, C.; Garcia, F.; Del Romero, J.; Gutierrez, F.; Viciano, P.; Alcamí, J.; et al. Analysis of Non-AIDS-Defining Events in HIV Controllers. *Clin Infect Dis* 2016, 62, 1304–1309, doi:10.1093/cid/ciw120.

74. Rodríguez-Gallego, E.; Tarancón-Diez, L.; García, F.; Del Romero, J.; Benito, J.M.; Alba, V.; Herrero, P.; Rull, A.; Dominguez-Molina, B.; Martinez-Madrid, O.; et al. Proteomic Profile Associated With Loss of Spontaneous Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Control. *J Infect Dis* 2019, 219, 867–876, doi:10.1093/infdis/jiy599.
75. Li, J.Z.; Arnold, K.B.; Lo, J.; Dugast, A.-S.; Plants, J.; Ribaldo, H.J.; Cesa, K.; Heisey, A.; Kuritzkes, D.R.; Lauffenburger, D.A.; et al. Differential Levels of Soluble Inflammatory Markers by Human Immunodeficiency Virus Controller Status and Demographics. *Open Forum Infect Dis* 2015, 2, ofu117, doi:10.1093/ofid/ofu117.
76. Sokoya, T.; Steel, H.C.; Nieuwoudt, M.; Rossouw, T.M. HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediators Inflamm* 2017, 2017, 6825493, doi:10.1155/2017/6825493.
77. Hart, B.B.; Nordell, A.D.; Okulicz, J.F.; Palfreeman, A.; Horban, A.; Kedem, E.; Neuhaus, J.; Jacobs, D.R.; Duprez, D.A.; Neaton, J.D. Inflammation-Related Morbidity and Mortality Among HIV-Positive Adults: How Extensive Is It? *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 2018, 77, 1–7, doi:10.1097/QAI.0000000000001554.
78. Thurman, M.; Johnson, S.; Acharya, A.; Pallikkuth, S.; Mahesh, M.; Byrareddy, S.N. Biomarkers of Activation and Inflammation to Track Disparity in Chronological and Physiological Age of People Living With HIV on Combination Antiretroviral Therapy. *Front Immunol* 2020, 11, 583934, doi:10.3389/fimmu.2020.583934.
79. Sherman, B.T.; Hu, X.; Singh, K.; Haine, L.; Rupert, A.W.; Neaton, J.D.; Lundgren, J.D.; Imamichi, T.; Chang, W.; Lane, H.C. Genome-Wide Association Study of High-Sensitivity C-Reactive Protein, D-Dimer, and Interleukin-6 Levels in Multiethnic HIV+ Cohorts. *AIDS* 2021, 35, 193–204, doi:10.1097/QAD.0000000000002738.
80. Neuhaus, J.; Jacobs, D.R.; Baker, J.V.; Calmy, A.; Duprez, D.; La Rosa, A.; Kuller, L.H.; Pett, S.L.; Ristola, M.; Ross, M.J.; et al. Markers of Inflammation, Coagulation, and Renal Function Are Elevated in Adults with HIV Infection. *J Infect Dis* 2010, 201, 1788–1795, doi:10.1086/652749.
81. Duprez, D.A.; Neuhaus, J.; Kuller, L.H.; Tracy, R.; Bellosso, W.; De Wit, S.; Drummond, F.; Lane, H.C.; Ledergerber, B.; Lundgren, J.; et al. Inflammation, Coagulation and Cardiovascular Disease in HIV-Infected Individuals. *PLoS One* 2012, 7, e44454, doi:10.1371/journal.pone.0044454.
82. Kuller, L.H.; Tracy, R.; Bellosso, W.; De Wit, S.; Drummond, F.; Lane, H.C.; Ledergerber, B.; Lundgren, J.; Neuhaus, J.; Nixon, D.; et al. Inflammatory and

Coagulation Biomarkers and Mortality in Patients with HIV Infection. *PLoS Med* 2008, 5, e203, doi:10.1371/journal.pmed.0050203.

83. Palella, F.J.; Gange, S.J.; Benning, L.; Jacobson, L.; Kaplan, R.C.; Landay, A.L.; Tracy, R.P.; Elion, R. Inflammatory Biomarkers and Abacavir Use in the Women's Interagency HIV Study and the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* 2010, 24, 1657–1665, doi:10.1097/QAD.0b013e3283389dfa.

84. Funderburg, N.T.; Mayne, E.; Sieg, S.F.; Asaad, R.; Jiang, W.; Kalinowska, M.; Luciano, A.A.; Stevens, W.; Rodriguez, B.; Brenchley, J.M.; et al. Increased Tissue Factor Expression on Circulating Monocytes in Chronic HIV Infection: Relationship to in Vivo Coagulation and Immune Activation. *Blood* 2010, 115, 161–167, doi:10.1182/blood-2009-03-210179.

85. Calabro, P.; Chang, D.W.; Willerson, J.T.; Yeh, E.T.H. Release of C-Reactive Protein in Response to Inflammatory Cytokines by Human Adipocytes: Linking Obesity to Vascular Inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2005, 46, 1112–1113, doi:10.1016/j.jacc.2005.06.017.

86. Pepys, M.B.; Hirschfield, G.M. C-Reactive Protein: A Critical Update. *J Clin Invest* 2003, 111, 1805–1812, doi:10.1172/JCI18921.

87. Grund, B.; Baker, J.V.; Deeks, S.G.; Wolfson, J.; Wentworth, D.; Cozzi-Lepri, A.; Cohen, C.J.; Phillips, A.; Lundgren, J.D.; Neaton, J.D.; et al. Relevance of Interleukin-6 and D-Dimer for Serious Non-AIDS Morbidity and Death among HIV-Positive Adults on Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLoS One* 2016, 11, e0155100, doi:10.1371/journal.pone.0155100.

88. Borges, Á.H.; O'Connor, J.L.; Phillips, A.N.; Neaton, J.D.; Grund, B.; Neuhaus, J.; Vjecha, M.J.; Calmy, A.; Koelsch, K.K.; Lundgren, J.D.; et al. Interleukin 6 Is a Stronger Predictor of Clinical Events Than High-Sensitivity C-Reactive Protein or D-Dimer During HIV Infection. *J Infect Dis* 2016, 214, 408–416, doi:10.1093/infdis/jiw173.

89. Hunt, P.W.; Sinclair, E.; Rodriguez, B.; Shive, C.; Clagett, B.; Funderburg, N.; Robinson, J.; Huang, Y.; Epling, L.; Martin, J.N.; et al. Gut Epithelial Barrier Dysfunction and Innate Immune Activation Predict Mortality in Treated HIV Infection. *J Infect Dis* 2014, 210, 1228–1238, doi:10.1093/infdis/jiu238.

90. Sandler, N.G.; Wand, H.; Roque, A.; Law, M.; Nason, M.C.; Nixon, D.E.; Pedersen, C.; Ruxrungtham, K.; Lewin, S.R.; Emery, S.; et al. Plasma Levels of Soluble

CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection. *J Infect Dis* 2011, 203, 780–790, doi:10.1093/infdis/jiq118.

91. Byakwaga, H.; Boum, Y.; Huang, Y.; Muzoora, C.; Kembabazi, A.; Weiser, S.D.; Bennett, J.; Cao, H.; Haberer, J.E.; Deeks, S.G.; et al. The Kynurenine Pathway of Tryptophan Catabolism, CD4+ T-Cell Recovery, and Mortality among HIV-Infected Ugandans Initiating Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* 2014, 210, 383–391, doi:10.1093/infdis/jiu115.

92. Kaplan, R.C.; Sinclair, E.; Landay, A.L.; Lurain, N.; Sharrett, A.R.; Gange, S.J.; Xue, X.; Hunt, P.; Karim, R.; Kern, D.M.; et al. T Cell Activation and Senescence Predict Subclinical Carotid Artery Disease in HIV-Infected Women. *J Infect Dis* 2011, 203, 452–463, doi:10.1093/infdis/jiq071.

93. Calza, L.; Pocaterra, D.; Pavoni, M.; Colangeli, V.; Manfredi, R.; Verucchi, G.; Chiodo, F.; Cantu, M.; Pariali, M. Plasma Levels of VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin, and P-Selectin in 99 HIV-Positive Patients versus 51 HIV-Negative Healthy Controls. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009, 50, 430–432, doi:10.1097/QAI.0b013e31819a292c.

94. Klatt, N.R.; Chomont, N.; Douek, D.C.; Deeks, S.G. Immune Activation and HIV Persistence: Implications for Curative Approaches to HIV Infection. *Immunol Rev* 2013, 254, 326–342, doi:10.1111/imr.12065.

95. Jacobson, M.C.; Dezube, B.J.; Aboulaflia, D.M. Thrombotic Complications in Patients Infected with HIV in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy: A Case Series. *Clin Infect Dis* 2004, 39, 1214–1222, doi:10.1086/424664.

96. Zidar, D.A.; Juchnowski, S.; Ferrari, B.; Clagett, B.; Pilch-Cooper, H.A.; Rose, S.; Rodriguez, B.; McComsey, G.A.; Sieg, S.F.; Mehta, N.N.; et al. Oxidized LDL Levels Are Increased in HIV Infection and May Drive Monocyte Activation. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2015, 69, 154–160, doi:10.1097/QAI.0000000000000566.

97. Yu, X.-H.; Fu, Y.-C.; Zhang, D.-W.; Yin, K.; Tang, C.-K. Foam Cells in Atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2013, 424, 245–252, doi:10.1016/j.cca.2013.06.006.

98. Galkina, E.; Ley, K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis (\*). *Annu Rev Immunol* 2009, 27, 165–197, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132620.

99. Triant, V.A.; Meigs, J.B.; Grinspoon, S.K. Association of C-Reactive Protein and HIV Infection with Acute Myocardial Infarction. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009, 51, 268–273, doi:10.1097/QAI.0b013e3181a9992c.

100. Nordell, A.D.; McKenna, M.; Borges, Á.H.; Duprez, D.; Neuhaus, J.; Neaton, J.D.; INSIGHT SMART, ESPRIT Study Groups; SILCAAT Scientific Committee Severity of Cardiovascular Disease Outcomes among Patients with HIV Is Related to Markers of Inflammation and Coagulation. *J Am Heart Assoc* 2014, 3, e000844, doi:10.1161/JAHA.114.000844.
101. Ford, E.S.; Greenwald, J.H.; Richterman, A.G.; Rupert, A.; Dutcher, L.; Badralmaa, Y.; Natarajan, V.; Rehm, C.; Hadigan, C.; Sereti, I. Traditional Risk Factors and D-Dimer Predict Incident Cardiovascular Disease Events in Chronic HIV Infection. *AIDS* 2010, 24, 1509–1517, doi:10.1097/QAD.0b013e32833ad914.
102. Gobert, A.; Veyri, M.; Poizot-Martin, I.; Lavolé, A.; Solas, C.; Paliche, R.; Katlama, C.; Costagliola, D.; Spano, J.-P. [HIV and cancer : What's new in 2017?]. *Bull Cancer* 2018, 105, 256–262, doi:10.1016/j.bulcan.2018.02.002.
103. Grulich, A.E.; Jin, F.; Poynten, I.M.; Vajdic, C.M. HIV, Cancer, and Aging. *Sex Health* 2011, 8, 521–525, doi:10.1071/SH11048.
104. Bedimo, R.J.; McGinnis, K.A.; Dunlap, M.; Rodriguez-Barradas, M.C.; Justice, A.C. Incidence of Non-AIDS-Defining Malignancies in HIV-Infected versus Noninfected Patients in the HAART Era: Impact of Immunosuppression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009, 52, 203–208, doi:10.1097/QAI.0b013e3181b033ab.
105. Borges, Á.H.; Silverberg, M.J.; Wentworth, D.; Grulich, A.E.; Fätkenheuer, G.; Mitsuyasu, R.; Tambussi, G.; Sabin, C.A.; Neaton, J.D.; Lundgren, J.D.; et al. Predicting Risk of Cancer during HIV Infection: The Role of Inflammatory and Coagulation Biomarkers. *AIDS* 2013, 27, 1433–1441, doi:10.1097/QAD.0b013e32835f6b0c.
106. Bora, A.; Ubaida Mohien, C.; Chaerkady, R.; Chang, L.; Moxley, R.; Sacktor, N.; Haughey, N.; McArthur, J.C.; Cotter, R.; Nath, A.; et al. Identification of Putative Biomarkers for HIV-Associated Neurocognitive Impairment in the CSF of HIV-Infected Patients under CART Therapy Determined by Mass Spectrometry. *J Neurovirol* 2014, 20, 457–465, doi:10.1007/s13365-014-0263-5.
107. Zoufaly, A.; Cozzi-Lepri, A.; Reekie, J.; Kirk, O.; Lundgren, J.; Reiss, P.; Jevtovic, D.; Machala, L.; Zangerle, R.; Mocroft, A.; et al. Immuno-Virological Discordance and the Risk of Non-AIDS and AIDS Events in a Large Observational Cohort of HIV-Patients in Europe. *PLoS One* 2014, 9, e87160, doi:10.1371/journal.pone.0087160.
108. Kestens, L.; Vanham, G.; Gigase, P.; Young, G.; Hannel, I.; Vanlangendonck, F.; Hulstaert, F.; Bach, B.A. Expression of Activation Antigens, HLA-DR and CD38, on

- CD8 Lymphocytes during HIV-1 Infection. *AIDS* 1992, 6, 793–797, doi:10.1097/00002030-199208000-00004.
109. Rousseau, R.K.; Szadkowski, L.; Kovacs, C.M.; Saikali, M.F.; Nadeem, R.; Malazogu, F.; Huibner, S.; Cummins, C.L.; Kaul, R.; Walmsley, S.L. Activation and Gut-Homing of Peripheral T Cells in HIV Immunologic Non-Responders despite Long Term Viral Suppression. *PLoS One* 2021, 16, e0254149, doi:10.1371/journal.pone.0254149.
110. García, M.; Jiménez-Sousa, M.A.; Blanco, J.; Restrepo, C.; Pacheco, Y.M.; Brochado-Kith, Ó.; López-Bernaldo, J.C.; Gutiérrez, F.; Portilla, J.; Estrada, V.; et al. CD4 Recovery Is Associated with Genetic Variation in IFN $\gamma$  and IL19 Genes. *Antiviral Res* 2019, 170, 104577, doi:10.1016/j.antiviral.2019.104577.
111. Côté, S.C.; Stilla, A.; Burke Schinkel, S.C.; Berthoud, T.K.; Angel, J.B. IL-7-Induced Proliferation of Peripheral Th17 Cells Is Impaired in HAART-Controlled HIV Infection. *AIDS* 2019, 33, 985–991, doi:10.1097/QAD.0000000000002164.
112. Zicari, S.; Sessa, L.; Cotugno, N.; Ruggiero, A.; Morrocchi, E.; Concato, C.; Rocca, S.; Zangari, P.; Manno, E.C.; Palma, P. Immune Activation, Inflammation, and Non-AIDS Co-Morbidities in HIV-Infected Patients under Long-Term ART. *Viruses* 2019, 11, E200, doi:10.3390/v11030200.
113. Rosado-Sánchez, I.; Jarrín, I.; Pozo-Balado, M.M.; de Pablo-Bernal, R.S.; Herrero-Fernández, I.; Alvarez-Ríos, A.I.; Rodríguez-Gallego, E.; Genebat, M.; Vera, M.; Berenguer, J.; et al. Higher Levels of IL-6, CD4 Turnover and Treg Frequency Are Already Present before CART in HIV-Infected Subjects with Later Low CD4 Recovery. *Antiviral Res* 2017, 142, 76–82, doi:10.1016/j.antiviral.2017.03.015.
114. Jacobs, E.S.; Keating, S.M.; Abdel-Mohsen, M.; Gibb, S.L.; Heitman, J.W.; Inglis, H.C.; Martin, J.N.; Zhang, J.; Kaidarova, Z.; Deng, X.; et al. Cytokines Elevated in HIV Elite Controllers Reduce HIV Replication In Vitro and Modulate HIV Restriction Factor Expression. *J Virol* 2017, 91, e02051-16, doi:10.1128/JVI.02051-16.
115. Pereyra, F.; Lo, J.; Triant, V.A.; Wei, J.; Buzon, M.J.; Fitch, K.V.; Hwang, J.; Campbell, J.H.; Burdo, T.H.; Williams, K.C.; et al. Increased Coronary Atherosclerosis and Immune Activation in HIV-1 Elite Controllers. *AIDS* 2012, 26, 2409–2412, doi:10.1097/QAD.0b013e32835a9950.
116. Hsue, P.Y.; Hunt, P.W.; Schnell, A.; Kalapus, S.C.; Hoh, R.; Ganz, P.; Martin, J.N.; Deeks, S.G. Role of Viral Replication, Antiretroviral Therapy, and Immunodeficiency in HIV-Associated Atherosclerosis. *AIDS* 2009, 23, 1059–1067, doi:10.1097/QAD.0b013e32832b514b.

117. Tarancon-Diez, L.; Rodríguez-Gallego, E.; Rull, A.; Peraire, J.; Viladés, C.; Portilla, I.; Jimenez-Leon, M.R.; Alba, V.; Herrero, P.; Leal, M.; et al. Immunometabolism Is a Key Factor for the Persistent Spontaneous Elite Control of HIV-1 Infection. *EBioMedicine* 2019, 42, 86–96, doi:10.1016/j.ebiom.2019.03.004.
118. Akioyamen, L.E.; Genest, J.; Shan, S.D.; Reel, R.L.; Albaum, J.M.; Chu, A.; Tu, J.V. Estimating the Prevalence of Heterozygous Familial Hypercholesterolaemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMJ Open* 2017, 7, e016461, doi:10.1136/bmjopen-2017-016461.
119. Benito-Vicente, A.; Uribe, K.B.; Jebari, S.; Galicia-Garcia, U.; Ostolaza, H.; Martin, C. Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. *Int J Mol Sci* 2018, 19, E3426, doi:10.3390/ijms19113426.
120. Di Taranto, M.D.; Giacobbe, C.; Fortunato, G. Familial Hypercholesterolemia: A Complex Genetic Disease with Variable Phenotypes. *European Journal of Medical Genetics* 2020, 63, 103831, doi:10.1016/j.ejmg.2019.103831.
121. Holven, K.B.; Myhre, A.M.; Aukrust, P.; Hagve, T.A.; Ose, L.; Nenseter, M.S. Patients with Familial Hypercholesterolaemia Show Enhanced Spontaneous Chemokine Release from Peripheral Blood Mononuclear Cells Ex Vivo. Dependency of Xanthomas/Xanthelasms, Smoking and Gender. *Eur Heart J* 2003, 24, 1756–1762, doi:10.1016/s0195-668x(03)00467-6.
122. Schwenke, D.C.; Carew, T.E. Initiation of Atherosclerotic Lesions in Cholesterol-Fed Rabbits. II. Selective Retention of LDL vs. Selective Increases in LDL Permeability in Susceptible Sites of Arteries. *Arteriosclerosis* 1989, 9, 908–918, doi:10.1161/01.atv.9.6.908.
123. Masana, L.; Zamora, A.; Plana, N.; Comas-Cufí, M.; Garcia-Gil, M.; Martí-Lluch, R.; Ponjoan, A.; Alves-Cabrato, L.; Elosua, R.; Marrugat, J.; et al. Incidence of Cardiovascular Disease in Patients with Familial Hypercholesterolemia Phenotype: Analysis of 5 Years Follow-Up of Real-World Data from More than 1.5 Million Patients. *J Clin Med* 2019, 8, E1080, doi:10.3390/jcm8071080.
124. Pérez de Isla, L.; Alonso, R.; Mata, N.; Fernández-Pérez, C.; Muñoz, O.; Díaz-Díaz, J.L.; Saltijeral, A.; Fuentes-Jiménez, F.; de Andrés, R.; Zambón, D.; et al. Predicting Cardiovascular Events in Familial Hypercholesterolemia: The SAFEHEART Registry (Spanish Familial Hypercholesterolemia Cohort Study). *Circulation* 2017, 135, 2133–2144, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024541.

125. De Bacquer, D.; De Smedt, D.; Kotseva, K.; Jennings, C.; Wood, D.; Rydén, L.; Gyberg, V.; Shahim, B.; Amouyel, P.; Bruthans, J.; et al. Incidence of Cardiovascular Events in Patients with Stabilized Coronary Heart Disease: The EUROASPIRE IV Follow-up Study. *Eur J Epidemiol* 2019, 34, 247–258, doi:10.1007/s10654-018-0454-0.
126. Humphries, S.E.; Cooper, J.A.; Capps, N.; Durrington, P.N.; Jones, B.; McDowell, I.F.W.; Soran, H.; Neil, A.H.W.; Simon Broome Familial Hyperlipidaemia Register Group Coronary Heart Disease Mortality in Severe vs. Non-Severe Familial Hypercholesterolaemia in the Simon Broome Register. *Atherosclerosis* 2019, 281, 207–212, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.11.014.
127. Perez-Calahorra, S.; Laclaustra, M.; Marco-Benedí, V.; Lamiquiz-Moneo, I.; Pedro-Botet, J.; Plana, N.; Sanchez-Hernandez, R.M.; Amor, A.J.; Almagro, F.; Fuentes, F.; et al. Effect of Lipid-Lowering Treatment in Cardiovascular Disease Prevalence in Familial Hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2019, 284, 245–252, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.003.
128. Steinberg, D. Hypercholesterolemia and Inflammation in Atherogenesis: Two Sides of the Same Coin. *Mol Nutr Food Res* 2005, 49, 995–998, doi:10.1002/mnfr.200500081.
129. Zhu, Y.; Xian, X.; Wang, Z.; Bi, Y.; Chen, Q.; Han, X.; Tang, D.; Chen, R. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules* 2018, 8, 80, doi:10.3390/biom8030080.
130. Chistiakov, D.A.; Melnichenko, A.A.; Grechko, A.V.; Myasoedova, V.A.; Orekhov, A.N. Potential of Anti-Inflammatory Agents for Treatment of Atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 2018, 104, 114–124, doi:10.1016/j.yexmp.2018.01.008.
131. Ranjit, N.; Diez-Roux, A.V.; Shea, S.; Cushman, M.; Seeman, T.; Jackson, S.A.; Ni, H. Psychosocial Factors and Inflammation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arch Intern Med* 2007, 167, 174–181, doi:10.1001/archinte.167.2.174.
132. Liu, Y.; Yu, H.; Zhang, Y.; Zhao, Y. TLRs Are Important Inflammatory Factors in Atherosclerosis and May Be a Therapeutic Target. *Med Hypotheses* 2008, 70, 314–316, doi:10.1016/j.mehy.2007.05.030.
133. Upadhyay, R.K. Emerging Risk Biomarkers in Cardiovascular Diseases and Disorders. *J Lipids* 2015, 2015, 971453, doi:10.1155/2015/971453.
134. El Messal, M.; Beaudoux, J.-L.; Drissi, A.; Giral, P.; Chater, R.; Bruckert, E.; Adlouni, A.; Chapman, M.J. Elevated Serum Levels of Proinflammatory Cytokines and Biomarkers of Matrix Remodeling in Never-Treated Patients with Familial



Hypercholesterolemia. *Clin Chim Acta* 2006, 366, 185–189, doi:10.1016/j.cca.2005.09.027.

135. Li, Y.; Zhong, X.; Cheng, G.; Zhao, C.; Zhang, L.; Hong, Y.; Wan, Q.; He, R.; Wang, Z. Hs-CRP and All-Cause, Cardiovascular, and Cancer Mortality Risk: A Meta-Analysis. *Atherosclerosis* 2017, 259, 75–82, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.02.003.

136. Badimon, L.; Peña, E.; Arderiu, G.; Padró, T.; Slevin, M.; Vilahur, G.; Chiva-Blanch, G. C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis. *Front Immunol* 2018, 9, 430, doi:10.3389/fimmu.2018.00430.

137. Jones, S.A. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol* 2005, 175, 3463–3468, doi:10.4049/jimmunol.175.6.3463.

138. Aker, S.; Bantis, C.; Reis, P.; Kuhr, N.; Schwandt, C.; Grabensee, B.; Heering, P.; Ivens, K. Influence of Interleukin-6 G-174C Gene Polymorphism on Coronary Artery Disease, Cardiovascular Complications and Mortality in Dialysis Patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009, 24, 2847–2851, doi:10.1093/ndt/gfp141.

139. Price, D.T.; Loscalzo, J. Cellular Adhesion Molecules and Atherogenesis. In *Collaboration with The American Physiological Society*, Thomas E. Andreoli, MD, Editor. *The American Journal of Medicine* 1999, 107, 85–97, doi:10.1016/S0002-9343(99)00153-9.

140. Pasquali, A.; Trabetti, E.; Romanelli, M.G.; Galavotti, R.; Martinelli, N.; Girelli, D.; Gambaro, G.; Olivieri, O.; Pignatti, P.F. Detection of a Large Deletion in the P-Selectin (SELP) Gene. *Mol Cell Probes* 2010, 24, 161–165, doi:10.1016/j.mcp.2009.11.006.

141. Mantovani, A.; Garlanda, C.; Locati, M. Macrophage Diversity and Polarization in Atherosclerosis: A Question of Balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, 29, 1419–1423, doi:10.1161/ATVBAHA.108.180497.

142. Virmani, R.; Kolodgie, F.D.; Burke, A.P.; Finn, A.V.; Gold, H.K.; Tulenko, T.N.; Wrenn, S.P.; Narula, J. Atherosclerotic Plaque Progression and Vulnerability to Rupture: Angiogenesis as a Source of Intraplaque Hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25, 2054–2061, doi:10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18.

143. Real, J.T.; Martínez-Hervás, S.; García-García, A.B.; Civera, M.; Pallardó, F.V.; Ascaso, J.F.; Viña, J.R.; Chaves, F.J.; Carmena, R. Circulating Mononuclear Cells Nuclear Factor-Kappa B Activity, Plasma Xanthine Oxidase, and Low Grade Inflammatory Markers in Adult Patients with Familial Hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 2010, 40, 89–94, doi:10.1111/j.1365-2362.2009.02218.x.

144. Gokalp, D.; Tuzcu, A.; Bahceci, M.; Arikan, S.; Pirinccioglu, A.G.; Bahceci, S. Levels of Proinflammatory Cytokines and Hs-CRP in Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolaemia. *Acta Cardiol* 2009, 64, 603–609, doi:10.2143/AC.64.5.2042689.
145. Rahman, T.; Hamzan, N.S.; Mokhsin, A.; Rahmat, R.; Ibrahim, Z.O.; Razali, R.; Thevarajah, M.; Nawawi, H. Enhanced Status of Inflammation and Endothelial Activation in Subjects with Familial Hypercholesterolaemia and Their Related Unaffected Family Members: A Case Control Study. *Lipids Health Dis* 2017, 16, 81, doi:10.1186/s12944-017-0470-1.
146. Ye, Z.-X.; Cheng, H.-M.; Chiou, K.-R.; Huang, P.-H.; Lin, S.-J.; Charng, M.-J. Relation of Coronary Artery Calcium to Flow-Mediated Dilation and C-Reactive Protein Levels in Asymptomatic Patients with Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2007, 100, 1119–1123, doi:10.1016/j.amjcard.2007.05.034.
147. Ye, Z.-X.; Cheng, H.-M.; Chiou, K.-R.; Charng, M.-J. Relation of C-Reactive Protein and Carotid Intima Media Thickness in Taiwanese with Familial Hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2008, 102, 184–187, doi:10.1016/j.amjcard.2008.03.039.
148. Cheng, H.M.; Ye, Z.X.; Chiou, K.R.; Lin, S.J.; Charng, M.J. Vascular Stiffness in Familial Hypercholesterolaemia Is Associated with C-Reactive Protein and Cholesterol Burden. *Eur J Clin Invest* 2007, 37, 197–206, doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01772.x.
149. van Haelst, P.L.; van Doormaal, J.J.; Asselbergs, F.W.; van Roon, A.M.; Veeger, N.J.G.M.; Henneman, M.M.; Smit, A.J.; Tervaert, J.W.C.; May, J.F.; Gans, R.O.B. Correlates of Endothelial Function and Their Relationship with Inflammation in Patients with Familial Hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2003, 104, 627–632, doi:10.1042/CS20020293.
150. Ekholm, M.; Kahan, T.; Jörneskog, G.; Brinck, J.; Wallén, N.H. Haemostatic and Inflammatory Alterations in Familial Hypercholesterolaemia, and the Impact of Angiotensin II Infusion. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015, 16, 328–338, doi:10.1177/1470320315575848.
151. van Wissen, S.; Trip, M.D.; Smilde, T.J.; de Graaf, J.; Stalenhoef, A.F.H.; Kastelein, J.J.P. Differential Hs-CRP Reduction in Patients with Familial Hypercholesterolemia Treated with Aggressive or Conventional Statin Therapy. *Atherosclerosis* 2002, 165, 361–366, doi:10.1016/s0021-9150(02)00280-0.

152. Mohrschlatt, M.F.; de Maat, M.P.; Westendorp, R.G.; Smelt, A.H. C-Reactive Protein in Patients with Familial Hypercholesterolemia: No Effect of Simvastatin Therapy. *Atherosclerosis* 2001, 157, 491–494, doi:10.1016/s0021-9150(00)00754-1.
153. Danesh, J.; Kaptoge, S.; Mann, A.G.; Sarwar, N.; Wood, A.; Angleman, S.B.; Wensley, F.; Higgins, J.P.T.; Lennon, L.; Eiriksdottir, G.; et al. Long-Term Interleukin-6 Levels and Subsequent Risk of Coronary Heart Disease: Two New Prospective Studies and a Systematic Review. *PLoS Med* 2008, 5, e78, doi:10.1371/journal.pmed.0050078.
154. Emerging Risk Factors Collaboration; Kaptoge, S.; Di Angelantonio, E.; Pennells, L.; Wood, A.M.; White, I.R.; Gao, P.; Walker, M.; Thompson, A.; Sarwar, N.; et al. C-Reactive Protein, Fibrinogen, and Cardiovascular Disease Prediction. *N Engl J Med* 2012, 367, 1310–1320, doi:10.1056/NEJMoa1107477.
155. Packard, R.R.S.; Libby, P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clin Chem* 2008, 54, 24–38, doi:10.1373/clinchem.2007.097360.
156. null, null; Greenland, P.; Alpert, J.S.; Beller, G.A.; Benjamin, E.J.; Budoff, M.J.; Fayad, Z.A.; Foster, E.; Hlatky, Mark.A.; Hodgson, J.McB.; et al. 2010 ACCF/AHA Guideline for Assessment of Cardiovascular Risk in Asymptomatic Adults: Executive Summary. *Circulation* 2010, 122, 2748–2764, doi:10.1161/CIR.0b013e3182051bab.
157. Ridker, P.M.; Hennekens, C.H.; Buring, J.E.; Rifai, N. C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women. *N Engl J Med* 2000, 342, 836–843, doi:10.1056/NEJM200003233421202.
158. Bassuk, S.S.; Rifai, N.; Ridker, P.M. High-Sensitivity C-Reactive Protein: Clinical Importance. *Curr Probl Cardiol* 2004, 29, 439–493.
159. Adukauskienė, D.; Čiginskienė, A.; Adukauskaitė, A.; Pentiokinienė, D.; Šlapikas, R.; Čeponienė, I. Clinical Relevance of High Sensitivity C-Reactive Protein in Cardiology. *Medicina (Kaunas)* 2016, 52, 1–10, doi:10.1016/j.medici.2015.12.001.
160. Koenig, W. High-Sensitivity C-Reactive Protein and Atherosclerotic Disease: From Improved Risk Prediction to Risk-Guided Therapy. *Int J Cardiol* 2013, 168, 5126–5134, doi:10.1016/j.ijcard.2013.07.113.
161. Ridker, P.M.; Danielson, E.; Fonseca, F.A.H.; Genest, J.; Gotto, A.M.; Kastelein, J.J.P.; Koenig, W.; Libby, P.; Lorenzatti, A.J.; MacFadyen, J.G.; et al. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *N Engl J Med* 2008, 359, 2195–2207, doi:10.1056/NEJMoa0807646.

162. Aday, A.W.; Ridker, P.M. Antiinflammatory Therapy in Clinical Care: The CANTOS Trial and Beyond. *Front Cardiovasc Med* 2018, 5, 62, doi:10.3389/fcvm.2018.00062.
163. DeGoma, E.M.; French, B.; Dunbar, R.L.; Allison, M.A.; Mohler, E.R.; Budoff, M.J. Intraindividual Variability of C-Reactive Protein: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012, 224, 274–279, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.017.
164. Shah, T.; Casas, J.P.; Cooper, J.A.; Tzoulaki, I.; Sofat, R.; McCormack, V.; Smeeth, L.; Deanfield, J.E.; Lowe, G.D.; Rumley, A.; et al. Critical Appraisal of CRP Measurement for the Prediction of Coronary Heart Disease Events: New Data and Systematic Review of 31 Prospective Cohorts. *Int J Epidemiol* 2009, 38, 217–231, doi:10.1093/ije/dyn217.
165. Lloyd-Jones, D.M.; Liu, K.; Tian, L.; Greenland, P. Narrative Review: Assessment of C-Reactive Protein in Risk Prediction for Cardiovascular Disease. *Ann Intern Med* 2006, 145, 35–42, doi:10.7326/0003-4819-145-1-200607040-00129.
166. Schnell-Inderst, P.; Schwarzer, R.; Göhler, A.; Grandi, N.; Grabein, K.; Stollenwerk, B.; Manne, J.; Klauss, V.; Siebert, U.; Wasem, J. Prognostic Value, Clinical Effectiveness, and Cost-Effectiveness of High-Sensitivity C-Reactive Protein as a Marker for Major Cardiac Events in Asymptomatic Individuals: A Health Technology Assessment Report. *Int J Technol Assess Health Care* 2010, 26, 30–39, doi:10.1017/S0266462309990870.
167. Blinc, L.; Mlinaric, M.; Battelino, T.; Groselj, U. High-Sensitivity C-Reactive Protein and Carotid Intima Media Thickness as Markers of Subclinical Inflammation and Atherosclerosis in Pediatric Patients with Hypercholesterolemia. *Molecules* 2020, 25, E5118, doi:10.3390/molecules25215118.
168. Fuertes-Martín, R.; Correig, X.; Vallvé, J.-C.; Amigó, N. Title: Human Serum/Plasma Glycoprotein Analysis by 1H-NMR, an Emerging Method of Inflammatory Assessment. *J Clin Med* 2020, 9, doi:10.3390/jcm9020354.
169. Colley, K.J.; Varki, A.; Kinoshita, T. Cellular Organization of Glycosylation. In *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2015.

170. Otvos, J.D.; Shalaurova, I.; Wolak-Dinsmore, J.; Connelly, M.A.; Mackey, R.H.; Stein, J.H.; Tracy, R.P. GlycA: A Composite Nuclear Magnetic Resonance Biomarker of Systemic Inflammation. *Clin Chem* 2015, 61, 714–723, doi:10.1373/clinchem.2014.232918.
171. Lyons, J.J.; Milner, J.D.; Rosenzweig, S.D. Glycans Instructing Immunity: The Emerging Role of Altered Glycosylation in Clinical Immunology. *Front Pediatr* 2015, 3, 54, doi:10.3389/fped.2015.00054.
172. Vanhooren, V.; Laroy, W.; Libert, C.; Chen, C. N-Glycan Profiling in the Study of Human Aging. *Biogerontology* 2008, 9, 351–356, doi:10.1007/s10522-008-9140-z.
173. Ohtsubo, K.; Marth, J.D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* 2006, 126, 855–867, doi:10.1016/j.cell.2006.08.019.
174. Lauc, G.; Pezer, M.; Rudan, I.; Campbell, H. Mechanisms of Disease: The Human N-Glycome. *Biochim Biophys Acta* 2016, 1860, 1574–1582, doi:10.1016/j.bbagen.2015.10.016.
175. Gornik, O.; Lauc, G. Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases. *Dis Markers* 2008, 25, 267–278, doi:10.1155/2008/493289.
176. McCarthy, C.; Saldova, R.; Wormald, M.R.; Rudd, P.M.; McElvaney, N.G.; Reeves, E.P. The Role and Importance of Glycosylation of Acute Phase Proteins with Focus on Alpha-1 Antitrypsin in Acute and Chronic Inflammatory Conditions. *J Proteome Res* 2014, 13, 3131–3143, doi:10.1021/pr500146y.
177. Hart, G.W.; Copeland, R.J. Glycomics Hits the Big Time. *Cell* 2010, 143, 672–676, doi:10.1016/j.cell.2010.11.008.
178. Silva, M.L.S. Cancer Serum Biomarkers Based on Aberrant Post-Translational Modifications of Glycoproteins: Clinical Value and Discovery Strategies. *Biochim Biophys Acta* 2015, 1856, 165–177, doi:10.1016/j.bbcan.2015.07.002.
179. Connelly, M.A.; Gruppen, E.G.; Otvos, J.D.; Dullaart, R.P.F. Inflammatory Glycoproteins in Cardiometabolic Disorders, Autoimmune Diseases and Cancer. *Clin Chim Acta* 2016, 459, 177–186, doi:10.1016/j.cca.2016.06.012.
180. Soininen, P.; Kangas, A.J.; Würtz, P.; Suna, T.; Ala-Korpela, M. Quantitative Serum Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics in Cardiovascular Epidemiology and Genetics. *Circ Cardiovasc Genet* 2015, 8, 192–206, doi:10.1161/CIRCGENETICS.114.000216.
181. Lenz, E.M.; Bright, J.; Wilson, I.D.; Morgan, S.R.; Nash, A.F.P. A <sup>1</sup>H NMR-Based Metabonomic Study of Urine and Plasma Samples Obtained from Healthy Human

Subjects. *J Pharm Biomed Anal* 2003, 33, 1103–1115, doi:10.1016/s0731-7085(03)00410-2.

182. Rodríguez-Borjabad, C.; Malo, A.I.; Ibarretxe, D.; Girona, J.; Heras, M.; Ferré, R.; Feliu, A.; Salvadó, M.; Varela, A.; Amigó, N.; et al. Efficacy of Therapeutic Lifestyle Changes on Lipid Profiles Assessed by NMR in Children with Familial and Non-Familial Hypercholesterolemia. *Clin Investig Arterioscler* 2020, 32, 49–58, doi:10.1016/j.arteri.2019.10.001.

183. Mallol, R.; Amigó, N.; Rodríguez, M.A.; Heras, M.; Vinaixa, M.; Plana, N.; Rock, E.; Ribalta, J.; Yanes, O.; Masana, L.; et al. Liposcale: A Novel Advanced Lipoprotein Test Based on 2D Diffusion-Ordered 1H NMR Spectroscopy. *J Lipid Res* 2015, 56, 737–746, doi:10.1194/jlr.D050120.

184. Girona, J.; Amigó, N.; Ibarretxe, D.; Plana, N.; Rodríguez-Borjabad, C.; Heras, M.; Ferré, R.; Gil, M.; Correig, X.; Masana, L. HDL Triglycerides: A New Marker of Metabolic and Cardiovascular Risk. *Int J Mol Sci* 2019, 20, E3151, doi:10.3390/ijms20133151.

185. Fuertes-Martín, R.; Taverner, D.; Vallvé, J.-C.; Paredes, S.; Masana, L.; Correig Blanchar, X.; Amigó Grau, N. Characterization of 1H NMR Plasma Glycoproteins as a New Strategy To Identify Inflammatory Patterns in Rheumatoid Arthritis. *J Proteome Res* 2018, 17, 3730–3739, doi:10.1021/acs.jproteome.8b00411.

186. Bell, J.D.; Brown, J.C.; Nicholson, J.K.; Sadler, P.J. Assignment of Resonances for “acute-Phase” Glycoproteins in High Resolution Proton NMR Spectra of Human Blood Plasma. *FEBS Lett* 1987, 215, 311–315, doi:10.1016/0014-5793(87)80168-0.

187. Duprez, D.A.; Otvos, J.; Sanchez, O.A.; Mackey, R.H.; Tracy, R.; Jacobs, D.R. Comparison of the Predictive Value of GlycA and Other Biomarkers of Inflammation for Total Death, Incident Cardiovascular Events, Noncardiovascular and Noncancer Inflammatory-Related Events, and Total Cancer Events. *Clin Chem* 2016, 62, 1020–1031, doi:10.1373/clinchem.2016.255828.

188. Gruppen, E.G.; Kunutsor, S.K.; Kieneker, L.M.; van der Vegt, B.; Connelly, M.A.; de Bock, G.H.; Gansevoort, R.T.; Bakker, S.J.L.; Dullaart, R.P.F. GlycA, a Novel pro-Inflammatory Glycoprotein Biomarker Is Associated with Mortality: Results from the PREVEND Study and Meta-Analysis. *J Intern Med* 2019, 286, 596–609, doi:10.1111/joim.12953.

189. Lorenzo, C.; Festa, A.; Hanley, A.J.; Rewers, M.J.; Escalante, A.; Haffner, S.M. Novel Protein Glycan-Derived Markers of Systemic Inflammation and C-Reactive

Protein in Relation to Glycemia, Insulin Resistance, and Insulin Secretion. *Diabetes Care* 2017, 40, 375–382, doi:10.2337/dc16-1569.

190. Bartlett, D.B.; Slentz, C.A.; Connelly, M.A.; Piner, L.W.; Willis, L.H.; Bateman, L.A.; Granville, E.O.; Bales, C.W.; Huffman, K.M.; Kraus, W.E. Association of the Composite Inflammatory Biomarker GlycA, with Exercise-Induced Changes in Body Habitus in Men and Women with Prediabetes. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 2017, 5608287, doi:10.1155/2017/5608287.

191. Akinkuolie, A.O.; Glynn, R.J.; Padmanabhan, L.; Ridker, P.M.; Mora, S. Circulating N-Linked Glycoprotein Side-Chain Biomarker, Rosuvastatin Therapy, and Incident Cardiovascular Disease: An Analysis From the JUPITER Trial. *J Am Heart Assoc* 2016, 5, e003822, doi:10.1161/JAHA.116.003822.

192. Ormseth, M.J.; Chung, C.P.; Oeser, A.M.; Connelly, M.A.; Sokka, T.; Raggi, P.; Solus, J.F.; Otvos, J.D.; Stein, C.M. Utility of a Novel Inflammatory Marker, GlycA, for Assessment of Rheumatoid Arthritis Disease Activity and Coronary Atherosclerosis. *Arthritis Res Ther* 2015, 17, 117, doi:10.1186/s13075-015-0646-x.

193. Tibuakuu, M.; Fashanu, O.E.; Zhao, D.; Otvos, J.D.; Brown, T.T.; Haberlen, S.A.; Guallar, E.; Budoff, M.J.; Palella, F.J.; Martinson, J.J.; et al. GlycA, a Novel Inflammatory Marker, Is Associated with Subclinical Coronary Disease. *AIDS* 2019, 33, 547–557, doi:10.1097/QAD.0000000000002079.

194. Kelesidis, T.; Tran, T.T.T.; Stein, J.H.; Brown, T.T.; Moser, C.; Ribaldo, H.J.; Dube, M.P.; Murphy, R.; Yang, O.O.; Currier, J.S.; et al. Changes in Inflammation and Immune Activation With Atazanavir-, Raltegravir-, Darunavir-Based Initial Antiviral Therapy: ACTG 5260s. *Clin Infect Dis* 2015, 61, 651–660, doi:10.1093/cid/civ327.

195. Ao, A.; Je, B.; Pm, R.; S, M. A Novel Protein Glycan Biomarker and Future Cardiovascular Disease Events. *Journal of the American Heart Association* 2014, 3, doi:10.1161/JAHA.114.001221.

196. Gruppen, E.G.; Riphagen, I.J.; Connelly, M.A.; Otvos, J.D.; Bakker, S.J.L.; Dullaart, R.P.F. GlycA, a Pro-Inflammatory Glycoprotein Biomarker, and Incident Cardiovascular Disease: Relationship with C-Reactive Protein and Renal Function. *PLoS One* 2015, 10, e0139057, doi:10.1371/journal.pone.0139057.

197. Carriere, I.; Dupuy, A.-M.; Lacroux, A.; Cristol, J.-P.; Delcourt, C.; Pathologies Oculaires Liées à l'Age Study Group Biomarkers of Inflammation and Malnutrition Associated with Early Death in Healthy Elderly People. *J Am Geriatr Soc* 2008, 56, 840–846, doi:10.1111/j.1532-5415.2008.01677.x.

198. Agorastos, A.; Hauger, R.L.; Barkauskas, D.A.; Moeller-Bertram, T.; Clopton, P.L.; Haji, U.; Lohr, J.B.; Geraciotti, T.D.; Patel, P.M.; Chrousos, G.P.; et al. Circadian Rhythmicity, Variability and Correlation of Interleukin-6 Levels in Plasma and Cerebrospinal Fluid of Healthy Men. *Psychoneuroendocrinology* 2014, 44, 71–82, doi:10.1016/j.psyneuen.2014.02.020.
199. Ritchie, S.C.; Würtz, P.; Nath, A.P.; Abraham, G.; Havulinna, A.S.; Fearnley, L.G.; Sarin, A.-P.; Kangas, A.J.; Soininen, P.; Aalto, K.; et al. The Biomarker GlycA Is Associated with Chronic Inflammation and Predicts Long-Term Risk of Severe Infection. *Cell Syst* 2015, 1, 293–301, doi:10.1016/j.cels.2015.09.007.
200. Benson, E.-M.A.; Tibuakuu, M.; Zhao, D.; Akinkuolie, A.O.; Otvos, J.D.; Duprez, D.A.; Jacobs, D.R.; Mora, S.; Michos, E.D. Associations of Ideal Cardiovascular Health with GlycA, a Novel Inflammatory Marker: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Clin Cardiol* 2018, 41, 1439–1445, doi:10.1002/clc.23069.
201. McGarrah, R.W.; Kelly, J.P.; Craig, D.M.; Haynes, C.; Jessee, R.C.; Huffman, K.M.; Kraus, W.E.; Shah, S.H. A Novel Protein Glycan-Derived Inflammation Biomarker Independently Predicts Cardiovascular Disease and Modifies the Association of HDL Subclasses with Mortality. *Clin Chem* 2017, 63, 288–296, doi:10.1373/clinchem.2016.261636.
202. Muhlestein, J.B.; May, H.T.; Galenko, O.; Knowlton, K.U.; Otvos, J.D.; Connelly, M.A.; Lappe, D.L.; Anderson, J.L. GlycA and HsCRP Are Independent and Additive Predictors of Future Cardiovascular Events among Patients Undergoing Angiography: The Intermountain Heart Collaborative Study. *Am Heart J* 2018, 202, 27–32, doi:10.1016/j.ahj.2018.04.003.
203. Otvos, J.D.; Guyton, J.R.; Connelly, M.A.; Akapame, S.; Bittner, V.; Kopecky, S.L.; Lacy, M.; Marcovina, S.M.; Muhlestein, J.B.; Boden, W.E. Relations of GlycA and Lipoprotein Particle Subspecies with Cardiovascular Events and Mortality: A Post Hoc Analysis of the AIM-HIGH Trial. *J Clin Lipidol* 2018, 12, 348-355.e2, doi:10.1016/j.jacl.2018.01.002.
204. Joshi, A.A.; Lerman, J.B.; Aberra, T.M.; Afshar, M.; Teague, H.L.; Rodante, J.A.; Krishnamoorthy, P.; Ng, Q.; Aridi, T.Z.; Salahuddin, T.; et al. GlycA Is a Novel Biomarker of Inflammation and Subclinical Cardiovascular Disease in Psoriasis. *Circ Res* 2016, 119, 1242–1253, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309637.



205. Ballout, R.A.; Remaley, A.T. GlycA: A New Biomarker for Systemic Inflammation and Cardiovascular Disease (CVD) Risk Assessment. *J Lab Precis Med* 2020, 5, 17, doi:10.21037/jlpm.2020.03.03.
206. Mallol, R.; Rodriguez, M.A.; Brezmes, J.; Masana, L.; Correig, X. Human Serum/Plasma Lipoprotein Analysis by NMR: Application to the Study of Diabetic Dyslipidemia. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2013, 70, 1–24, doi:10.1016/j.pnmrs.2012.09.001.
207. Torri, G.M.; Torri, J.; Gulian, J.M.; Vion-Dury, J.; Viout, P.; Cozzone, P.J. Magnetic Resonance Spectroscopy of Serum and Acute-Phase Proteins Revisited: A Multiparametric Statistical Analysis of Metabolite Variations in Inflammatory, Infectious and Miscellaneous Diseases. *Clin Chim Acta* 1999, 279, 77–96, doi:10.1016/s0009-8981(98)00166-1.
208. Aru, V.; Lam, C.; Khakimov, B.; Hoefsloot, H.C.J.; Zwanenburg, G.; Lind, M.V.; Schäfer, H.; van Duynhoven, J.; Jacobs, D.M.; Smilde, A.K.; et al. Quantification of Lipoprotein Profiles by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2017, 94, 210–219, doi:10.1016/j.trac.2017.07.009.
209. Sears, B.; Deckelbaum, R.J.; Janiak, M.J.; Shipley, G.G.; Small, D.M. Temperature-Dependent <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Human Serum Low Density Lipoproteins. *Biochemistry* 1976, 15, 4151–4157, doi:10.1021/bi00664a003.
210. De Meyer, T.; Sinnaeve, D.; Van Gasse, B.; Tsiorkova, E.; Rietzschel, E.R.; De Buyzere, M.L.; Gillebert, T.C.; Bekaert, S.; Martins, J.C.; Van Criekinge, W. NMR-Based Characterization of Metabolic Alterations in Hypertension Using an Adaptive, Intelligent Binning Algorithm. *Anal Chem* 2008, 80, 3783–3790, doi:10.1021/ac7025964.
211. Emerging Risk Factors Collaboration; Kaptoge, S.; Di Angelantonio, E.; Lowe, G.; Pepys, M.B.; Thompson, S.G.; Collins, R.; Danesh, J. C-Reactive Protein Concentration and Risk of Coronary Heart Disease, Stroke, and Mortality: An Individual Participant Meta-Analysis. *Lancet* 2010, 375, 132–140, doi:10.1016/S0140-6736(09)61717-7.
212. Kuller, L.H.; Tracy, R.P.; Shaten, J.; Meilahn, E.N. Relation of C-Reactive Protein and Coronary Heart Disease in the MRFIT Nested Case-Control Study. *Multiple*

- Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 1996, 144, 537–547, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a008963.
213. Arnett, D.K.; Blumenthal, R.S.; Albert, M.A.; Buroker, A.B.; Goldberger, Z.D.; Hahn, E.J.; Himmelfarb, C.D.; Khera, A.; Lloyd-Jones, D.; McEvoy, J.W.; et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2019, 74, 1376–1414, doi:10.1016/j.jacc.2019.03.009.
214. Musunuru, K.; Kral, B.G.; Blumenthal, R.S.; Fuster, V.; Campbell, C.Y.; Gluckman, T.J.; Lange, R.A.; Topol, E.J.; Willerson, J.T.; Desai, M.Y.; et al. The Use of High-Sensitivity Assays for C-Reactive Protein in Clinical Practice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008, 5, 621–635, doi:10.1038/ncpcardio1322.
215. Bogaty, P.; Dagenais, G.R.; Joseph, L.; Boyer, L.; Leblanc, A.; Bélisle, P.; Brophy, J.M. Time Variability of C-Reactive Protein: Implications for Clinical Risk Stratification. *PLoS One* 2013, 8, e60759, doi:10.1371/journal.pone.0060759.
216. Bower, J.K.; Lazo, M.; Juraschek, S.P.; Selvin, E. Within-Person Variability in High-Sensitivity C-Reactive Protein. *Arch Intern Med* 2012, 172, 1519–1521, doi:10.1001/archinternmed.2012.3712.
217. Hutchinson, W.L.; Koenig, W.; Fröhlich, M.; Sund, M.; Lowe, G.D.; Pepys, M.B. Immunoradiometric Assay of Circulating C-Reactive Protein: Age-Related Values in the Adult General Population. *Clin Chem* 2000, 46, 934–938.
218. Lakoski, S.G.; Cushman, M.; Criqui, M.; Rundek, T.; Blumenthal, R.S.; D'Agostino, R.B.; Herrington, D.M. Gender and C-Reactive Protein: Data from the Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA) Cohort. *Am Heart J* 2006, 152, 593–598, doi:10.1016/j.ahj.2006.02.015.
219. Wong, N.D.; Pio, J.; Valencia, R.; Thakal, G. Distribution of C-Reactive Protein and Its Relation to Risk Factors and Coronary Heart Disease Risk Estimation in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. *Prev Cardiol* 2001, 4, 109–114, doi:10.1111/j.1520-037x.2001.00570.x.
220. Connelly, M.A.; Gruppen, E.G.; Wolak-Dinsmore, J.; Matyus, S.P.; Riphagen, I.J.; Shalurova, I.; Bakker, S.J.L.; Otvos, J.D.; Dullaart, R.P.F. GlycA, a Marker of Acute Phase Glycoproteins, and the Risk of Incident Type 2 Diabetes Mellitus: PREVEND Study. *Clin Chim Acta* 2016, 452, 10–17, doi:10.1016/j.cca.2015.11.001.

221. Ding, N.; Nie, H.; Sun, X.; Sun, W.; Qu, Y.; Liu, X.; Yao, Y.; Liang, X.; Chen, C.C.; Li, Y. Human Serum N-Glycan Profiles Are Age and Sex Dependent. *Age Ageing* 2011, 40, 568–575, doi:10.1093/ageing/afr084.
222. Manmadhan, A.; Lin, B.-X.; Zhong, J.; Parikh, M.; Berger, J.S.; Fisher, E.A.; Heffron, S.P. Elevated GlycA in Severe Obesity Is Normalized by Bariatric Surgery. *Diabetes Obes Metab* 2019, 21, 178–182, doi:10.1111/dom.13481.
223. Gruppen, E.G.; Connelly, M.A.; Otvos, J.D.; Bakker, S.J.L.; Dullaart, R.P.F. A Novel Protein Glycan Biomarker and LCAT Activity in Metabolic Syndrome. *Eur J Clin Invest* 2015, 45, 850–859, doi:10.1111/eci.12481.
224. Rohlfing, C.; Wiedmeyer, H.-M.; Little, R.; Grotz, V.L.; Tennill, A.; England, J.; Madsen, R.; Goldstein, D. Biological Variation of Glycohemoglobin. *Clin Chem* 2002, 48, 1116–1118.
225. Fischer, K.; Kettunen, J.; Würtz, P.; Haller, T.; Havulinna, A.S.; Kangas, A.J.; Soininen, P.; Esko, T.; Tammesoo, M.-L.; Mägi, R.; et al. Biomarker Profiling by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Prediction of All-Cause Mortality: An Observational Study of 17,345 Persons. *PLoS Med* 2014, 11, e1001606, doi:10.1371/journal.pmed.1001606.