



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Jorge
Torre Eiriz

Tesis doctoral

Cambios en el N-glicoma sérico
en relación con la edad y el
sexo. Patrones asociados con
comorbilidad general y con
enfermedades cardiovasculares

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Investigación Clínica en Medicina



Tesis doctoral

**Cambios en el N-glicoma sérico en relación con la edad y el sexo.
Patrones asociados con comorbilidad general y con enfermedades
cardiovasculares**

JORGE TORRE EIRIZ

ESCOLA DE DOUTORAMENTO DA USC

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN MEDICINA CLÍNICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANO 2023



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Cambios en el N-glicoma sérico en relación con la edad y el sexo. Patrones asociados con comorbilidad general y con enfermedades cardiovasculares

D. Jorge Torre Eiriz

Presento mi tesis siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela, 21 de octubre de 2023

Fdo.: Jorge Torre Eiriz

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Cambios en el N-glicoma sérico en relación con la edad y el sexo. Patrones asociados con comorbilidad general y con enfermedades cardiovasculares

Prof. Arturo González Quintela

Prof^a. Carmen Vidal Pan

INFORMAN:

Que la presente tesis se corresponde con el trabajo realizado por D. Jorge Torre Eiriz, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, ya que como directores de esta afirmamos no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctorado, declaran también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de monográfica en los que la participación del doctorando fue decisiva para su elaboración.

En Santiago de Compostela, 21 de octubre de 2023

Fdo.: Arturo González Quintela

Fdo.: Carmen Vidal Pan

AUTORIZACIÓN DEL TUTOR DE LA TESIS

Cambios en el N-glicoma sérico en relación con la edad y el sexo. Patrones asociados con comorbilidad general y con enfermedades cardiovasculares

Prof. Arturo González Quintela

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D. Jorge Torre Eiriz, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de monográfica en los que la participación del doctorando fue decisiva para su elaboración.

En Santiago de Compostela, 21 de octubre de 2023

Fdo.: Arturo González Quintela

ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

Los estudios de la presente tesis fueron revisados y aprobados por el Comité Regional de Ética (Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia / Comité de Ética de la Investigación Santiago-Lugo), código CEIC 2016-464 (adjunto como Anexo).

FINANCIACIÓN

Los trabajos de la presente tesis fueron financiados por el Instituto de Salud Carlos III mediante los proyectos PI13/2594, PI16/01404, y PI20/01069, la Red de Trastornos Adictivos (RTA, RD16/0017/0018 y la Red de Actividades Preventivas y de Promoción de Salud en Atención Primaria (RedIAPP, RD16/0007/0006), todos ellos cofinanciados con fondos FEDER.

CONFLICTOS DE INTERESES

El autor y los directores de esta tesis declaran no tener conflictos de interés en relación con los contenidos de la presente tesis doctoral.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo mostrar mi agradecimiento a los directores de esta tesis doctoral, los profesores D. Arturo González Quintela y D.^a Carmen Vidal Pan, por sus ideas, conocimiento científico y supervisión permanente para la puesta en marcha y consecución de este trabajo, sin los cuales no hubiera sido posible.

También me gustaría agradecer al Dr. Francisco Gude Sampedro y a Óscar Lado Baleato por la estimable ayuda en el trabajo bioestadístico. A la gestora de datos, Manuela Alonso Sampedro. Y a los responsables de las técnicas de los estudios glicómicos, Radka Fahey y Roisin O'Flaherty (NIBRT).

Gracias a muchos amigos y compañeros de trabajo que he tenido durante mi vida profesional, que han sido inspiración para mí y me han valido de ejemplo dentro y fuera del ámbito laboral.

Y por último y lo más importante, agradecer a mi familia. A mis padres, por su cariño, paciencia y apoyo incondicional, así como por inculcarme los valores que hoy me definen como persona; y a mi hermano, que desde pequeño me ha acompañado y con el que siempre he mantenido una relación muy estrecha.

RESUMEN

Objetivo general: Describir, en una población adulta general, la evolución del N-glicoma sérico con la edad en hombres y mujeres, e investigar la posible asociación de los patrones de N-glicoma con la comorbilidad relacionada con la edad, y en concreto con las enfermedades cardiovasculares arteriales.

Métodos: En un estudio de diseño transversal, analizamos 1.516 adultos seleccionados al azar (55,3% mujeres; mediana de edad 52 años; rango 18-91 años) de un municipio (A Estrada, Galicia, España). El N-glicoma sérico se estudió mediante cromatografía de interacción hidrófila (HILIC) con cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) que permitió el aislamiento de 46 picos de N-glicanos (*glycan peaks*, GP). Las covariables incluyeron factores del estilo de vida (consumo de tabaco y alcohol, y actividad física), trastornos metabólicos (obesidad, diabetes y síndrome metabólico), marcadores de glicación (hemoglobina glicada, fructosamina, albúmina glicada), marcadores inflamatorios (velocidad de sedimentación globular, proteína C-reactiva sérica, IL-6, IL-8, TNF-alfa y sIL-2R séricos), así como un índice de comorbilidad. Se utilizó el análisis de componentes principales (mediante un algoritmo basado en K-medias) para definir grupos de individuos en función de los 46 GPs obtenidos en los cromatogramas. De modo específico, se investigó la asociación de patrones del N-glicoma (balances entre GPs, mediante el algoritmo *selbal* de R) con la enfermedad cardiovascular arterial (cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular y enfermedad arterial periférica), que estuvo presente, en conjunto, en el 17,2% de los sujetos de estudio.

Resultados y conclusiones, alineadas con los objetivos específicos:

Objetivo 1. Describir la evolución del N-glicoma sérico con la edad, en hombres y en mujeres.

- Los N-glicanos sencillos como los mono-antenarios (A1), agalactosilados (G0), no-sialilados (S0) y oligomanosa (OM) aumentan con el envejecimiento en ambos sexos.
- Los N-glicanos complejos, como los tetra-antenarios (A4) y tetragalactosilados (G4), son más abundantes en los hombres, pero aumentan con la edad en las mujeres hasta igualarse en edades avanzadas. Por contra, los N-glicanos trigalactosilados (G3) y triantenarios (A3) se encuentran a un mayor nivel de abundancia en las mujeres en todas las edades.
- La fucosilación central (core) disminuye con la edad en ambos sexos. La fucosilación periférica (outer-arm) aumenta hasta edades medias de la vida y se estabiliza a partir de ahí, en ambos sexos.
- La sialilación es el fenómeno más irregular en su comportamiento con la edad, con diferencias entre hombres y mujeres a partir de edades medias, coincidentes con la menopausia en la mujer. Este dimorfismo afecta especialmente a los N-glicanos trisialilados (S3, descenso en los hombres, ascenso continuo en las mujeres) y tetrasialilados (S4, con aumento progresivo con la edad en las mujeres)

frente a niveles estable con la edad en hombres), así como a los biantenarios (A2, estabilización a esa edad en los hombres, continuo descenso en las mujeres).

Objetivo 2. Resumir, mediante técnicas estadísticas apropiadas, los resultados del N-glicoma en patrones simplificados que permitan su comparación.

- El análisis de componentes principales ha demostrado ser una herramienta que permite reducir la complejidad en la interpretación de los datos composicionales del N-glicoma sérico.
- El análisis de balances de N-glicanos (*selbal*) es otra herramienta que permite reducir la complejidad en la interpretación de los datos composicionales del N-glicoma sérico y definir N-glicanos asociados con efectos, como enfermedad.

Objetivo 3. Investigar la posible asociación de patrones del N-glicoma asociados con el envejecimiento con enfermedades frecuentes, especialmente metabólicas, con marcadores de inflamación e índices de comorbilidad.

- Mediante análisis de componentes principales de los 46 picos de N-glicanos del cromatograma, los individuos pueden agruparse en dos *clusters* principales, el primero de los cuales está definido por los N-glicanos más sencillos y el segundo por los más complejos.
- Los individuos del *cluster* asociado a los N-glicanos más sencillos presentan una mayor edad, mayores niveles de glucemia y de marcadores de glicación, mayores niveles de algunos marcadores de inflamación, menor tasa de filtrado glomerular y mayor comorbilidad.

Objetivo 4. Investigar la posible asociación de las enfermedades cardiovasculares arteriales (enfermedad cerebrovascular, cardiopatía isquémica y arteriopatía periférica) con cambios en el N-glicoma sérico.

- Los individuos con enfermedad cardiovascular arterial presentan, en el análisis de componentes principales, mayor abundancia de N-glicanos de menor y mayor complejidad, con menor abundancia de N-glicanos de complejidad intermedia. La enfermedad cerebrovascular es una excepción.
- De modo particular, un N-glicano biantenariario, digalactosilado y disialilado, con N-acetilglucosamina bisectriz, no fucosilado, se asocia independiente y negativamente (efecto protector) con la enfermedad cardiovascular arterial.

En conjunto, los resultados son concordantes con la idea de que el N-glicoma sérico podría ser, en línea con la hipótesis del *inflammaging*, un marcador de envejecimiento inflamatorio no saludable.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

| | |
|-----------------|--|
| A | ramificación (antenas de glicano) |
| A1 | monoantenario |
| A2 | biantenario |
| A3 | triantenario |
| A4 | tetraantenario |
| B | bisectriz (GlcNAc bisectriz en la estructura del glicano) |
| CF | core-fucosa |
| CODA | análisis de datos composicionales (<i>Compositional Data Analysis</i>) |
| DSA-FACE | <i>DNA Sequencing equipment-Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis</i> |
| F | fucosilación de glicano |
| G | galactosilación de glicano |
| G0 | agalactosilado |
| G1 | monogalactosilado |
| G2 | digalactosilado |
| G3 | trigalactosilado |
| G4 | tetragalactosilado |
| GA | albúmina glicada (<i>glycated albumin</i>) |
| GAM | Modelo aditivo generalizado (<i>Generalized Additive Model</i>) |
| HILIC | <i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i> (cromatografía líquida de interacción hidrófila) ultra-performance liquid chromatography [UPLC]), |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| ilr | <i>isometric log-ratios</i> |
| LC-MSn | <i>Liquid Chromatography/Multiple Stage Mass Spectrometry</i> |
| OM | oligomanosa (<i>high-mannose</i>). |
| OF | <i>outer-arm fucose</i> |
| PCA | Análisis de componentes principales (<i>Principal Component Analysis</i>) |
| RMN | resonancia magnética nuclear |
| S | sialilación de glicano |
| S0 | neutro [asialilado] |
| S1 | monosialilado |
| S2 | disialilado |
| S3 | trisialilado |
| S4 | tetrasialilado |
| SNFG | Nomenclatura simbólica para glicanos (<i>Symbol Nomenclature for Glycans</i>) |
| UPLC | <i>Ultra-performance liquid chromatography</i> (cromatografía líquida de alta resolución) |
| UPLC-ESI-QqQ-MS | <i>Ultrahigh Performance Liquid Chromatography method coupled with Triple Quadrupole Mass Spectrometry</i> |

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 21 |
| 1.1. La glicómica y el estudio del <i>N</i>-glicoma sérico | 23 |
| 1.2. El <i>N</i>-glicoma sérico en el envejecimiento humano | 30 |
| 1.3. El <i>N</i>-glicoma sérico en las enfermedades cardiovasculares en humanos | 36 |
| 2. Objetivos | 39 |
| 3. Métodos | 43 |
| 3.1. Diseño, ámbito y población del estudio | 45 |
| 3.2. Aspectos éticos | 46 |
| 3.3. Determinaciones principales | 46 |
| 3.3.1. Historial de tabaquismo | 46 |
| 3.3.2. Historial de consumo de alcohol | 46 |
| 3.3.3. Historial de actividad física habitual | 46 |
| 3.3.4. Definición de alteraciones metabólicas | 46 |
| 3.3.5. Cuantificación general de morbilidad | 47 |
| 3.3.6. Cuantificación del riesgo cardiovascular | 47 |
| 3.3.7. Definición de enfermedad cardiovascular arterial | 47 |
| 3.3.8. Determinaciones analíticas de rutina clínica | 48 |
| 3.3.9. Determinación de marcadores de inflamación | 48 |
| 3.3.10. Determinación de marcadores de glicación y control glucémico | 48 |
| 3.3.11. Determinaciones de marcadores de glicosilación: análisis del <i>N</i> -glicoma sérico | 49 |
| 3.4. Análisis estadísticos | 56 |
| 3.4.1. Aspectos generales: el problema de los datos composicionales | 56 |
| 3.4.2. Aspectos específicos: Estudio 1 (objetivos 1-3) | 56 |
| 3.4.3. Aspectos específicos: Estudio 2 (objetivo 4) | 58 |
| 4. Resultados | 61 |
| 4.1. Correlación entre los diferentes <i>N</i>-glicanos | 63 |
| 4.2. Comparación del <i>N</i>-glicoma entre hombres y mujeres | 66 |
| 4.3. Efecto de la edad en el <i>N</i>-glicoma en hombres y mujeres | 67 |
| 4.4. Análisis de componentes principales y definición de clusters | 75 |
| 4.5. Asociación específica del <i>N</i>-glicoma sérico con enfermedad cardiovascular arterial | 81 |

| | |
|--|-----|
| 5. Discusión | 87 |
| 5.1. Justificación general de los trabajos | 89 |
| 5.2. Fortalezas y limitaciones de los estudios | 90 |
| 5.2.1. Fortalezas de los estudios | 90 |
| 5.2.2. Limitaciones de los estudios | 91 |
| 5.3. Contextualización de los resultados | 94 |
| 6. Conclusiones | 107 |
| 7. Fuentes referenciadas | 111 |
| 8. Anexos | 123 |
| Anexo I. Cuestionario administrado a los participantes | 125 |
| Anexo II. Dictamen del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia | 151 |
| Anexo III. Lista de verificación de STROBE | 155 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Ejemplo de la estructura y nomenclatura de los <i>N</i> -glicanos | 25 |
| Figura 2. Esquema del análisis del <i>N</i> -glicoma sérico | 28 |
| Figura 3. Ejemplo de cromatogramas representativos de <i>N</i> -glicoma sérico en hombres y en mujeres | 29 |
| Figura 4. Esquema-perfil del estudio | 45 |
| Figura 5. Ejemplo de cromatograma en el que se representan ejemplos de la estructura de <i>N</i> -glicano más importantes | 50 |
| Figura 6. Localización en el cromatograma de los <i>N</i> -glicanos clasificados como oligomanosa | 55 |
| Figura 7. Localización en el cromatograma de los <i>N</i> -glicanos clasificados como core-fucosilados | 55 |
| Figura 8. Localización en el cromatograma de los <i>N</i> -glicanos clasificados con fucosilación periférica | 56 |
| Figura 9. Distribución de los datos de los cromatogramas del <i>N</i> -glicoma sérico a efectos estadísticos: el problema de los datos composicionales o constreñidos. | 57 |
| Figura 10. Matriz de correlaciones de la abundancia de los 46 GPs (en porcentaje). | 63 |
| Figura 11. Matriz de correlaciones entre las diferentes agrupaciones de <i>N</i> -glicanos | 64 |
| Figura 12. Abundancia de los picos de glicanos (GP) en relación a la edad y sexo | 68 |
| Figura 13. Abundancia de 46 picos de glicanos (GP) en relación a edad y sexo. | 69 |
| Figura 14. Abundancia de <i>N</i> -glicanos según su galactosilación (G0 a-, G1 mono-, G2 di-, G3 tri-, G4 tetra-galactosilados) en relación a la edad en los hombres y mujeres del estudio | 71 |
| Figura 15. Abundancia de <i>N</i> -glicanos según su ramificación (A1 mono-, A2 di-, A3 tri-, A4 tetra-antenados) en relación a la edad en los hombres y mujeres del estudio | 72 |
| Figura 16. Abundancia de <i>N</i> -glicanos según su sialilación (S0 a-, S1 mono-, S2 di-, S3 tri- y S4 tetra-sialilados), en relación a la edad en los hombres y mujeres del estudio | 73 |
| Figura 17. Abundancia de <i>N</i> -glicanos según su fucosilación (core-fucosa [CF] y fucosilación periférica [outer-arm, OF]) y según estructura de oligomanosa (high mannose, OM) en los hombres y mujeres del estudio | 74 |
| Figura 18. Gráfico de sedimentación del análisis de componentes principales | 76 |
| Figura 19. Contribución de las variables (GPs) a las dimensiones 1 y 2 | 76 |
| Figura 20. Biplot del análisis de componentes principales que representa las dos dimensiones (Dim) principales (1 y 2), con la representación de los vectores de cada uno de los picos de glicanos (GP). | 77 |
| Figura 21. Rasgos diferenciales de <i>N</i> -glicanos en los dos cluster | 79 |
| Figura 22. Biplot con los grupos (clusters) definidos por Kmedias tras el análisis de componentes principales del conjunto de los picos de glicano (GPs) | 82 |
| Figura 23. Ejemplo simplificado de la evolución con la edad y la degalactosilación de algunos <i>N</i> -glicanos | 98 |
| Figura 24. Esquema hipotético del círculo vicioso entre alteraciones de la glicosilación, activación inmune e inflamming | 99 |
| Figura 25. Visión esquemática de los resultados principales de la asociación del <i>N</i> -glicoma sérico con las enfermedades cardiovasculares arteriales mediante el algoritmo selbal de R | 103 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Diferencias fundamentales entre glicación y glicosilación | 25 |
| Tabla 2. Estructuras principales de cada uno de los 46 glycan peaks (GP) en el cromatograma | 51 |
| Tabla 3. Agrupaciones de los 46 N-glicanos basadas en sus características bioquímicas comunes | 54 |
| Tabla 4. Picos de glicanos (<i>glycan peaks</i>, GP) en hombres y mujeres | 65 |
| Tabla 5. Agrupaciones-tipo de N-glicanos en hombres y mujeres | 66 |
| Tabla 6. Agrupaciones-tipo de N-glicanos en hombres y mujeres, estratificados en grupos de edad | 70 |
| Tabla 7. Agrupaciones de N-glicanos en los grupos definidos por análisis de componentes principales | 78 |
| Tabla 8. Comparación de datos demográficos, de estilo de vida, metabólicos, inflamatorios y de comorbilidad en los grupos definidos por análisis de componentes principales de los N-glicanos | 80 |
| Tabla 9. Balances de glycan peaks (GPs) asociados con enfermedad cardiovascular arterial (cardiopatía isquémica, ondas Q patológicas, enfermedad cerebrovascular o enfermedad arterial periférica) | 83 |
| Tabla 10. Balances de glycan peaks (GPs) asociados con enfermedad cardiovascular arterial no cerebral (cardiopatía isquémica, ondas Q patológicas, o enfermedad arterial periférica) | 84 |
| Tabla 11. Esquema de los hallazgos principales del estudio, alineados con los objetivos | 96 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La glicómica y el estudio del *N*-glicoma sérico

La glicómica, o el estudio comprensivo de los glicomas o conjunto de azúcares (bien libres o bien, más frecuentemente, unidos a otras moléculas, fundamentalmente proteínas), fue calificada como una de las 10 tecnologías emergentes que podrían cambiar el panorama de la ciencia en los próximos años (*MIT's Magazine, 2003*). Sin embargo, la glicómica ha recibido menos atención que otras disciplinas análogas, como la proteómica o la genómica. Es posible que ello sea debido a la complejidad glicómica, a la variabilidad de la glicosilación entre personas y a lo largo de la vida de la misma persona, así como a la dificultad técnica para los estudios glicómicos. También es cierto que la glicómica rompe un tanto el esquema clásico de ADN - ARN - proteína - función, ya que la diferente glicosilación de las proteínas, puede modificar drásticamente su función. Baste decir, por ejemplo, que un cambio en un único glicano en la inmunoglobulina E (IgE) puede condicionar el desarrollo o no de anafilaxia (*Shade et al., 2015*).

Una buena parte de las proteínas tienen glicanos unidos a ellas y son por tanto glicoproteínas. Los glicanos se pueden unir a las proteínas por enlaces covalentes *N*- (al grupo amida del aminoácido asparagina, Figura 1) o por enlaces *O*- (al grupo hidroxilo de serina o treonina). Los más abundantes en el humano, los más estudiados hasta la fecha y aquellos cuyas variantes más se han visto asociadas a enfermedad son los *N*-glicanos (*Varki et al., 2008*).

La glicosilación es un proceso enzimático diferente de la mera glicación química y es la modificación post-traslacional más común de las proteínas. En la Tabla 1 se resumen las características principales diferenciales entre la glicación y la glicosilación. La *N*-glicosilación de las proteínas tiene lugar en el citosol, concretamente, en el retículo endoplasmático y se completa en el aparato de Golgi. A medida que se van sintetizando las proteínas, van ingresando en la luz del retículo endoplásmico gracias a un complejo de translocación. Las modificaciones de la proteína que ocurren durante su síntesis se conocen como co-traduccionales y una de ellas es, precisamente, la unión de las estas cadenas hidrocarbonadas a proteínas. Muchos de los oligosacáridos que forman parte de glicoproteínas, concretamente los *N*-glicanos, están unidos a residuos de asparagina (Asn) mediante un enlace β -*N*-glicosídico por la acción de diversas glicosiltransferasas, codificadas por sus respectivos genes (*Varki et al., 2008*). Esta base genética convierte a la glicosilación, contrariamente a la glicación, en un proceso regulado. Los *N*-oligosacáridos que se transfieren a las cadenas polipeptídicas nacientes son homogéneos, relativamente simples y comunes a casi todas las células eucariotas, pero durante el tránsito posterior por el complejo de Golgi los *N*-glicanos son sometidos a marcadas modificaciones en su estructura, generando una enorme diversidad química. Los genes que codifican proteínas

directamente involucradas en la biosíntesis de glicanos son múltiples; su repertorio de aproximadamente 250 a 900 genes comprende del 1 al 4 % de todos los genes humanos (*Kikuchi y Narimatsu, 2006; Narimatsu, 2006; Cummings y Pierce, 2014*).

En la luz del retículo endoplásmico, un oligosacárido es inicialmente transferido en bloque a partir del dolicol pirofosfato a una asparagina (Asn) presente en un *secuón*. Un *secuón* es una secuencia de consenso, en este caso Asn-X-Ser/Thr. En ella, “X” puede ser cualquier aminoácido, con la excepción de prolina. La enzima que cataliza la transferencia del oligosacárido se denomina oligosacariltransferasa (OST). Los *N*-glicanos se encuentran unidos a residuos de asparagina vía un núcleo (o esqueleto común, backbone) formado por dos *N*-acetilglucosaminas y tres manosas (Figura 1). Algunos *N*-glicanos sólo añaden manosas a continuación de ese núcleo o esqueleto y se denominan oligomanosa (anteriormente, se denominan altos en manosa [*high mannose*]). Al esqueleto se pueden añadir (Figura 1) nuevas moléculas de *N*-acetilglucosamina, configurando antenas que van de 1 a 4 (*N*-glicanos mono-, bi-, tri- o tetraantenarios). A su vez, estas *N*-acetilglucosaminas pueden estar o no unidas a galactosa (Figura 1), configurando *N*-glicanos a-, mono-, di-, tri- o tetragalactosilados. Estas galactosas pueden estar unidas o no a ácido *N*-acetilneuramínico (siálico). Por último, los *N*-glicanos pueden estar o no fucosilados (unidos a fucosa central [llamada *core*, en la primera *N*-acetilglucosamina del núcleo o esqueleto, Figura 1], o periférica, en las antenas [*outer arm*]). El patrón de glicosilación de las proteínas puede ser así muy variable, configurando diferentes glicofomas (misma proteína con diferente patrón de *N*-glicosilación).

La glicosilación de las proteínas es variable de un individuo a otro, y es variable para un mismo individuo en función de circunstancias ambientales y se asocia, como causa o consecuencia, con enfermedades. Así pues, la variabilidad glicómica es mucho mayor que la variabilidad genómica o proteómica. Esto es importante, porque la diferente glicosilación de las proteínas influye en su estabilidad, altera su conformación espacial e influye en su función en la interacción con otras proteínas, incluidas aquellas que intervienen en la diferenciación y desarrollo celular. Algunas estimaciones iniciales aventuraban que afectaba a la mitad las proteínas humanas (*Apweiler et al., 1999; Moremen et al., 2012*). Sin embargo, es posible que menos de una quinta parte de todas las proteínas estén glicosiladas (*Khoury et al., 2011*). La glicosilación, que se da en todas las células eucariotas, es así determinante en la salud y en la enfermedad (*Varki et al., 2008*). A pesar de ello, la glicómica ha recibido, en general, menos atención que la proteómica.

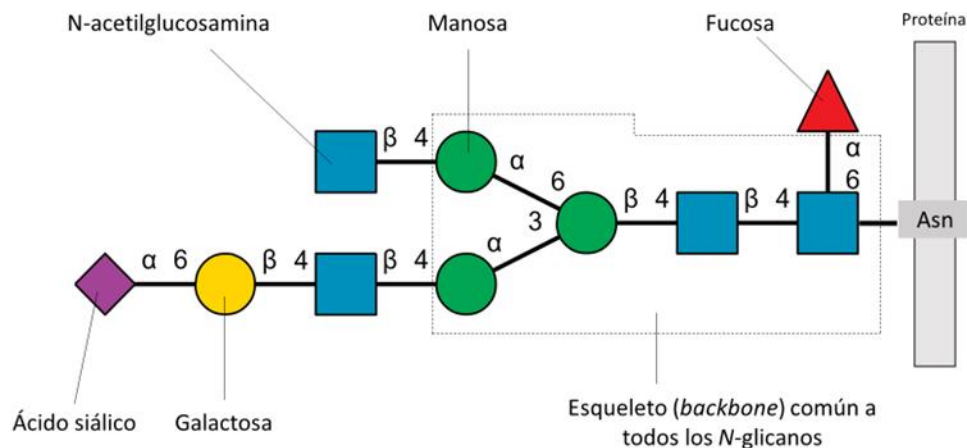


Figura 1. Ejemplo de la estructura y nomenclatura de los *N*-glicanos. Todos ellos contienen una columna vertebral (*backbone*) común de dos moléculas de *N*-acetilglucosamina. La primera de ellas se une al aminoácido asparagina (Asn) en la proteína. La segunda de ellas está unida a una molécula de manosa que, a su vez, está unida a otras dos manosas que completan el backbone común. Estas últimas manosas están unidas a moléculas de *N*-acetilglucosamina, cuyo número determina la ramificación (2 antenas en este caso). Estas moléculas de *N*-acetilglucosamina pueden estar o no galactosiladas (una de ellas lo está, en este caso) y la galactosa puede estar o no sililada, como en este ejemplo. Algunos glicanos, como el de la figura, pueden estar fucosilados. La fucosa puede unirse a la primera *N*-acetilglucosamina del *backbone* (core-fucosa, como en el ejemplo presentado) o la fucosilación puede estar en las ramas periféricas (*outer arm fucose*). Este glicano se corresponde con el pico 17 (GP17) de los cromatogramas que se han obtenido en el presente trabajo (ver Anexo 1). De acuerdo con la agrupación por sus características (Saldova *et al.*, 2014), se clasificaría como monosialilado (S1), monogalactosilado (G1), biantenarico (A2) y core-fucosilado (CF). En la nomenclatura internacional SNFG (*Symbol Nomenclature for Glycans*) su denominación sería FA2[3]G1S[6]1. Los números entre corchetes hacen referencia a la posición del enlace químico en la molécula. La figura es de elaboración de los autores.

Tabla 1. Diferencias fundamentales entre glicación y glicosilación

| Característica | Glicación | Glicosilación |
|------------------------|---|---|
| Tipo de modificación | No enzimática | Enzimática |
| Regulación | No | Sí |
| Molécula añadida | Glucosa, fructosa o galactosa, con modificaciones posteriores | Glicano (O-glicano o <i>N</i> -glicano compuestos de <i>N</i> -acetilglucosamina, manosa, galactosa, fucosa, ácido siálico) |
| Lugar y modo | Adición covalente a proteína o lípido, fundamentalmente en la circulación | Modificación postraslacional intracelular (retículo endoplásmico o aparato de Golgi) |
| Proteínas involucradas | Maduras | Inmaduras o no modificadas |
| Efecto predominante | Hace la proteína afuncional e inestable | Hace la proteína funcional (variable según la glicosilación) y estable |

En los últimos años, debido al avance que se está experimentando en el campo de los fármacos biológicos y de los anticuerpos monoclonales, la glicómica está ganando importancia tecnológica farmacéutica. Dado que la forma de glicosilación de una determinada proteína es un factor esencial crítico para condicionar su solubilidad, su estabilidad y su función, la glicosilación condiciona la mayor o menor actividad biológica de los biofármacos que consisten en proteínas, así como su farmacocinética y su farmacodinámica (Jefferis, 2009; Costa et al., 2014; Yang y Bartlett, 2019). Por ello, las agencias reguladoras del medicamento, tanto las americanas (FDA, *Food and Drug Administration*) como europeas (Agencia Europea del Medicamento, EMA) han elaborado guías para normalizar la glicosilación de estos productos farmacéuticos glicosilados. A modo de ejemplos, se sabe que la glicosilación de anticuerpos monoclonales que se utilizan en el tratamiento del cáncer o de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide influye en la efectividad de estos *biológicos* (Schwab y Nimmerjahn, 2014, Liu, 2015; Cymer et al., 2018).

Las plataformas de uso habitual en proteómica, fundamentalmente la espectrometría de masas, pueden ser utilizadas para estudios glicómicos en sistemas de alto rendimiento (*high-throughput*) que permiten analizar gran número de muestras en un mismo ensayo. Para el análisis de la glicosilación se utilizan 3 posibles aproximaciones analíticas (Kam et al., 2007; Klein, 2007; Royle et al., 2008; Mariño et al., 2010; Wuhler, 2013):

1. *Análisis de las glicoproteínas intactas.*

Existen varios métodos para el estudio de los glicanos unidos a proteínas intactas como cromatografía, electroforesis, espectrometría de masas y otras técnicas espectroscópicas. Cuando se trata del análisis y la caracterización de glicoproteínas terapéuticas es imprescindible utilizar espectrometría de masas, pero en investigación funcional su uso está muy limitado por el alto coste que supone identificar pequeñas diferencias de masas mediante técnicas como las fuentes de ionización y de resonancia ciclotrónica de iones (Zhang et al., 2016; Lu et al., 2018; Dominguez-Vega et al., 2018; Rojas-Macias et al., 2019). Por estos motivos, los análisis tan específicos quedan casi restringidos a la biotecnología de caracterización terapéutica de fármacos biológicos, como se ha comentado más arriba. Un ejemplo más sencillo y rutinario, que emplea la metodología de electroforesis capilar, es al análisis en el suero del porcentaje de transferrina deficiente en carbohidratos (CDT), también llamada transferrina desialilada, que se utiliza como marcador comercial de abuso de alcohol (Yersin et al., 1995; Salaspuro, 1999; Niemela, 2016).

2. *El análisis de los glicopéptidos producidos tras la proteólisis de la glicoproteína.*

El análisis de glicopéptidos ofrece información sobre los sitios de glicosilación, el grado de ocupación de los mismos y las estructuras de los glicanos. El procedimiento se inicia con la digestión de la glicoproteína de interés en glicopéptidos, mediante el uso de proteasas específicas como tripsina u otras (Kolarich *et al.*, 2012). Posteriormente, la muestra digerida se analiza mediante técnicas de separación cromatográficas como HPLC o UPLC (Lu *et al.*, 2018; Ruhaak *et al.*, 2018). Los glicopéptidos así separados se pueden identificar mediante espectrometría de masas o tras deglicosilación (ver punto siguiente) y posterior identificación de los glicanos. La técnica está sujeta a posibles interferencias que deben ser tenidas en cuenta (Ueda *et al.*, 2010; Shetty *et al.*, 2010; Drake *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Ongay *et al.*, 2012; Gaunitz *et al.*, 2017; Ruhaak *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020). La espectrometría de masas en tándem es más precisa, pero puede ser ineficaz para detectar la sialilación de los glicanos (Alley *et al.*, 2013; Gaunitz *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2020). En resumen, el análisis de los glicopéptidos producidos tras la proteólisis de la glicoproteína es útil no sólo para caracterizar los glicanos, sino también para identificar sus sitios de unión a la proteína. Esta información puede utilizarse como fundamento para entender cómo la composición del glicano afecta la función de la proteína, tanto en las glicoproteínas normales como en las aberrantes.

3. *El análisis de los glicanos liberados tras la digestión del punto de anclaje a la proteína y posterior marcaje fluorescente.*

Este método permite un análisis profundo y detallado de la estructura de los glicanos, independiente de la proteína portadora, pero no ofrece información del lugar de fijación del glicano a la proteína. Puede hacerse con todas las proteínas del suero (glicoma) con proteínas específicas que se han separado previamente. En el caso del suero, la proteína más abundante, muy glicosilada y más estudiada es la IgG. Los *N*-glicanos pueden ser liberados enzimáticamente de sus glicoproteínas mediante el enzima *N*-glicosidasa-F (PNGasa-F) de *Flavobacterium meningosepticum* (Koles *et al.*, 2007; Yang y Bartlett, 2019). La enzima PNGasa-F hidroliza todo tipo de *N*-glicanos en su punto de unión con la proteína (Figura 2). Este método es el que se ha empleado en el estudio de los *N*-glicanos de la presente tesis doctoral (Figura 2) como se explicará en el apartado de Métodos. Existen otras enzimas con acción similar, así como endoglicosidasas, que son útiles en determinadas circunstancias de los estudios (Freeze y Kranz, 2010). Para que la digestión enzimática sea eficaz, los glicanos de las glucoproteínas han de estar accesibles, para lo cual las glicoproteínas han de desnaturalizarse previamente a su análisis

(Merry y Astrautsova, 2003). Una vez hidrolizados, los glicanos deben poder identificarse mediante métodos cromatográficos lo cual es un reto debido a la falta de grupos cromóforos en su estructura natural y a la heterogeneidad causada por los tipos de anómeros, posiciones y configuraciones de enlace. Por esta razón, los glicanos obtenidos mediante esta forma de hidrólisis enzimática han de ser con fluorocromos para hacer más posible su detección (Ruhaak et al., 2010; Zaia, 2008; Gaunitz et al., 2017; Ruhaak et al., 2018), como se explicará en el apartado correspondiente de Métodos. Este tipo de análisis puede realizarse en cualquier líquido orgánico, siendo el más frecuentemente utilizado el suero o el plasma. El estudio del N-glicoma en el suero o en el plasma completo tiene el inconveniente de que no permite conocer a qué proteína o proteínas están unidos los N-glicanos. Sin embargo, el estudio del N-glicoma ofrece una panorámica global y no parcelar del estado de glicosilación de las proteínas circulantes. Aunque se estima que hay más de un millón de proteínas distintas en el suero humano, la mayoría están presentes a muy baja concentración. Un ejemplo de los resultados en forma de cromatograma del N-glicoma sérico suero se representa en la Figura 3.

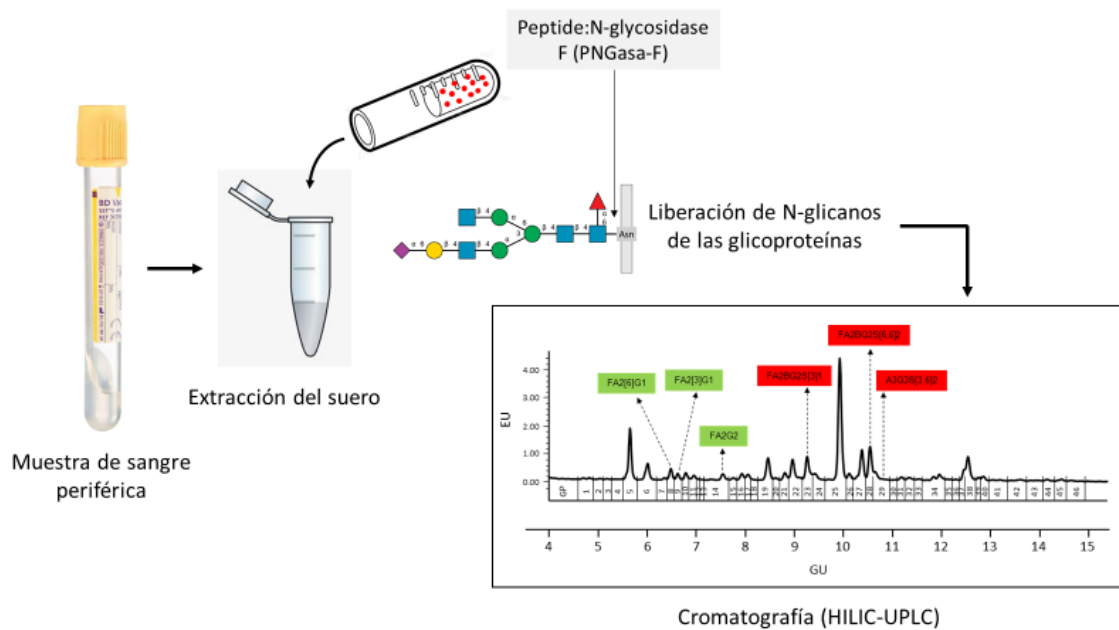


Figura 2. Esquema del análisis del N-glicoma sérico. A la muestra de suero se le añade PNGasa-F, que rompe las uniones de los N-glicanos con las proteínas en su unión con la asparagina (Asn), a continuación, los N-glicanos así liberados y tratados (ver Métodos) se separan para su identificación mediante cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) con cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC). La figura es de elaboración de los autores.

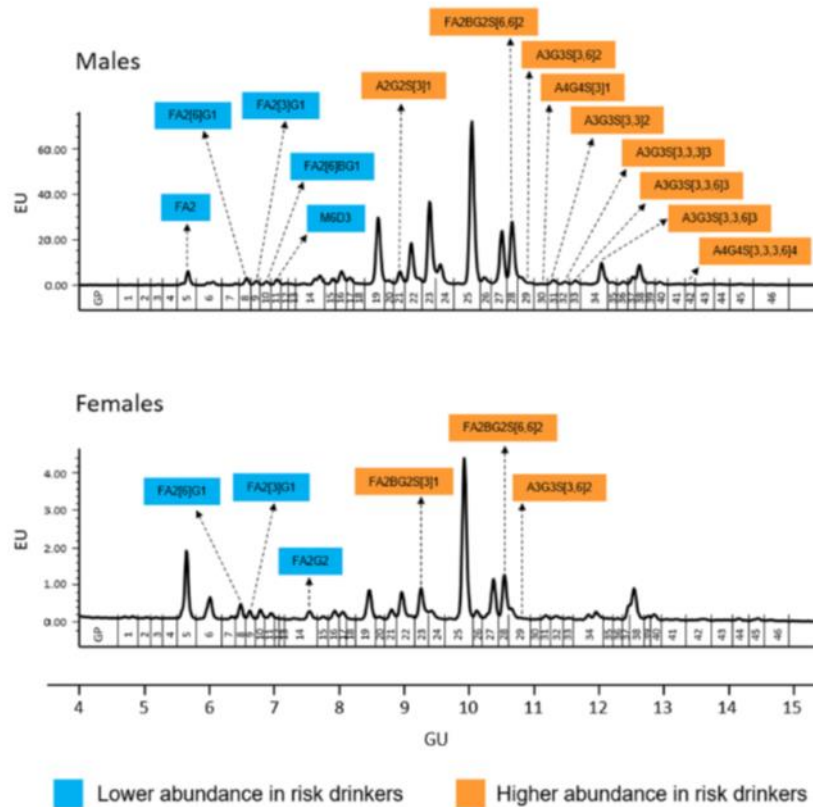


Figura 3. Ejemplo de cromatogramas representativos de *N*-glicoma sérico en hombres y en mujeres, obtenido con el método utilizado en el presente estudio (O'Flaherty et al., 2022), reproducida con permiso. Los picos de glicanos (GPs) están numerados como GP1-GP46, de acuerdo con Saldova et al. (2014), del grupo del NIBRT (*National Institute for Bioprocessing, Research and Training*) de Dublín, en colaboración con la cual se han hechos los estudios glicómicos del presente trabajo. Estructuras abreviadas: todos los *N*-glicanos tienen dos moléculas de acetilglucosamina (GlcNA) como *core*; una F al inicio de la abreviatura indica una fucosa (*core*) α 1,6-unida a la GlcNAc proximal; Mx es el número (x) de manosas en las GlcNAcs del *core*; Ax es el número de antenas (GlcNAc) sobre el *core* de trimanosas; B significa una GlcNAc bisectriz unida β 1,4 a una β 1,3 manosa; Gx es el número (x) de galactosas unidas (β 1,4) en las antenas; Sx,i es el número (x) de ácidos siálicos unidos a galactosa. En la Tabla 2 se representa la estructura de los 46 picos del cromatograma. Datos y figura de los autores, con permiso de la revista (bajo licencia *Creative Commons*).

El número de proteínas realmente abundantes en el suero es relativamente pequeño, y las más abundantes (albúmina, IgG, IgA, transferrina, haptoglobina y alfa-1-antitripsina) representan en conjunto más del 85% del contenido total de proteínas en el mismo. Dado que la glicoproteína principal que diferencia el plasma del suero es el fibrinógeno y que la contribución de éste al *N*-glicoma plasmático total es muy baja, es frecuente hablar de *N*-glicoma plasmático y *N*-glicoma sérico de modo intercambiable (Clerc et al., 2016). La albúmina es la proteína no glicosilada más abundante, aunque sí puede estar glicada. Las proteínas más abundantemente glicosiladas son,

precisamente, las inmunoglobulinas, las apolipoproteínas y las proteínas de fase aguda, como la haptoglobina, el fibrinógeno, la alfa-1-antitripsina y la transferrina (*Clerc et al., 2016*), lo que valida el suero/plasma como el material ideal de partida para el análisis del *N*-glicoma en busca de marcadores biológicos (*Lauc et al., 2016*).

1.2. El *N*-glicoma sérico en el envejecimiento en humanos

La biosíntesis de glicanos está bajo el control de muchos genes y de múltiples factores ambientales (*Knezevic et al., 2009, 1010; Moremen et al., 2012; Lauc et al., 2014; Lauc, 2016*). La secuencia de un glicano y la glicosilación de una proteína muestran el efecto integrado de la composición genética de un individuo y el medio ambiente (*Lauc, 2016*). Por un lado, la composición del *N*-glicoma plasmático humano es altamente heredable, ya que la secuencia genética explica alrededor del 60 % de la variación de la mayoría de los glicanos plasmáticos (*Zaytseva et al., 2020*).

Además del componente genético, un porcentaje significativo de los cambios en la glicosilación está asociado con factores ambientales, que incluyen factores relacionados con el estilo de vida, (como la dieta, el tabaquismo, el consumo de alcohol y el ejercicio), así como algunas alteraciones metabólicas (como niveles altos de glucosa y colesterol, así como la obesidad y la diabetes tipo 2) e inflamatorias (*Knežević et al. 2009, 2010; Menni et al. 2013; Testa et al., 2015; Trbojević Akmačić et al., 2015; Lemmers et al., 2017; Keser et al., 2017; Dotz et al., 2018; Gudelj et al. 2018, 2018b; Tijardović et al. 2019; Zaytseva et al. 2020; Reiding et al., 2017; Dotz y Wuhrer, 2019; O'Flaherty et al., 2022*). Algunas de estas alteraciones están asociadas al envejecimiento o, en cualquier caso, el paso de los años supone un mayor riesgo acumulado de exposición a alguno de esos factores. Por ejemplo, se han encontrado cambios en el *N*-glicoma de la IgG en la enfermedad de Parkinson (*Russell et al., 2017*) y también se han observado cambios en la *N*-glicosilación de las proteínas séricas en la enfermedad de Alzheimer y otras demencias (*Chen et al., 2010; Vanhooren et al., 2010*), en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (*Pavić et al., 2018*) y, especialmente, en varios tipos de cáncer (*Bones et al., 2011; Saldova et al., 2014; de Vroome et al., 2018; Doherty et al., 2018*). Los cambios que se observan en el *N*-glicoma total en plasma o suero han sido la base para que éste se haya propuesto como un biomarcador de uso clínico de enfermedades, como hepatopatías (*Callewaert et al., 2004; Vanderschaeghe et al., 2009, 2010; Capri et al., 2017*) y de riesgo cardiometabólico (*Wittenbecher et al., 2020*). En cuanto a las alteraciones de la glicosilación como marcadores de enfermedades, las más estudiadas han sido las oncológicas (*Kam et al., 2007; Klein, 2007; Royle et al., 2008; Rudd et al., 2009; Wuhrer, 2013*).

Los primeros estudios sobre los cambios en la *N*-glicosilación de las proteínas (concretamente, de la IgG) asociados a la edad datan de 1988 (Parekh et al., 1988). Los cambios con la edad y el envejecimiento en la *N*-glicosilación de la IgG sérica en el *N*-glicoma total se han revisado recientemente (Cindric et al., 2021). Si bien el número de estudios sobre el *N*-glicoma sérico en relación al envejecimiento realizados hasta la fecha no es escaso (Vanhooren et al., 2007, 2009, 2010; Knezevic et al. 2009, 2010; Ding et al., 2011; Lu et al. 2011; Ruhaak et al., 2011; Mehdi et al. 2012; Pucic et al., 2012; Borelli et al., 2015; Miura et al., 2015; Catera et al., 2016; Merleev et al., 2020), siguen existiendo muchos aspectos por aclarar en este proceso. En buena parte, ello es debido a la heterogeneidad de las muestras estudiadas y a la diversidad de las técnicas empleadas, que dificulta la comparación de los diferentes estudios hasta la fecha (Cindric et al., 2021).

Los ya clásicos estudios del grupo de Vanhooren et al. Fueron realizados con *DNA Sequencing equipment-Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis* (DSA-FACE) (Vanhooren et al., 2007, 2009, 2010). El método incluye desialilación previa de los *N*-glicanos, por lo que ésta no puede analizarse. El número de picos de *N*-glicanos (*glycan peaks*, GP) que permite detectar la técnica es así relativamente reducido (10-12). En poblaciones compuestas por muestreo no aleatorio (oportunistas) de varios cientos (de 221 a 435, dependiendo del estudio) de individuos europeos de origen belga o italiano, de varios grupos de edad. El principal hallazgo en estos estudios fue el incremento con la edad de *N*-glicanos biantenarios agalactosilados y core-fucosilados (FA2) y una disminución paralela de las estructuras de *N*-glicanos similares, pero digalactosilados (FA2G2). Hallazgos consistentes se encontraron, con la misma técnica (DSA-FACE), en una nueva muestra oportunista de 265 sujetos de China (Ding et al., 2011) y 144 sujetos de Italia, incluyendo algunos centenarios (Catera et al., 2016). También se encontraron hallazgos similares en casos aislados con síndromes progeroides, como el de Werner y el de Cockayne (Vanhooren et al., 2007, 2010) y en muestras menores (n= 145) de pacientes con síndrome de Down en comparación a sus familiares directos (Borelli et al., 2015). Por todo ello, el logaritmo de la relación FA2/FA2G2 del *N*-glicoma sérico o plasmático obtenido por DSA-FACE (hay que insistir que se analiza después de la desialilación) aumenta gradualmente después de los 40 años de edad y alcanza un máximo en sujetos mayores de 90 años y se ha propuesto como un marcador biológico de envejecimiento denominado *GlycoAge test* (Vanhooren et al., 2010; Catera et al., 2016). Este hallazgo concreto se confirmó en los estudios del *N*-glicoma sérico realizados por el grupo de Lauc en Croacia, probablemente uno de los más activos del mundo en el estudio de estas variaciones de la glicosilación (Knezevic et al. 2009, 2010). Estos estudios son, probablemente, los más similares al que se presenta en esta tesis doctoral, por su diseño

poblacional y por haber utilizado técnicas de HPLC, que permiten una mayor discriminación en la que se obtiene un mayor número de GPs en los que se puede investigar la sialilación. Concretamente, Lauc et al. estudiaron 1914 individuos adultos (742 hombres y 1172 mujeres, de 18-98 años) de las islas croatas de Vis y Korčula (*Knezevic et al. 2009, 2010*). El estudio, sin embargo, no tuvo un muestreo aleatorio, sino oportunista, y tiene la limitación adicional de haber sido diseñado para investigar la variabilidad y la epidemiología genética de comunidades cerradas insulares, lo cual es un inconveniente si se tiene en cuenta el componente genético de la *N*-glicosilación, como se ha comentado más arriba. De todas maneras, nos referiremos a estos estudios frecuentemente por su comparabilidad con el de la presente tesis.

Existen dos estudios que han investigado muy específicamente el efecto de la edad en el *N*-glicoma sérico o plasmático a través de una selección dirigida de individuos muy longevos o sus familiares. El estudio holandés *Dutch Leiden Longevity Study* incluyó 2396 participants (*Ruhaak et al., 2011*). En este estudio se seleccionaron las familias si al menos dos hermanos estaban vivos y tenían 89 años o más (en el caso de los hombres) o 91 años o más (en el caso de las mujeres). Estos criterios los cumplía menos del 0.5% de la población holandesa en 2001. Se incluyeron, en total, 944 hermanos longevos (probandos), 1671 descendientes de ellos con una media de edad de 59 años y 744 parejas de ellos con una media de 58 años (individuos-control). El método de análisis del *N*-glicoma fue HPLC, con una identificación de 26 GPs (*Ruhaak et al., 2011*). En el estudio realizado en Japón por Miura et al. (2015), de tamaño muestral más limitado, se estudiaron 6 mujeres semisupercentenarias (edad media, 107 años), aparentemente sanas, 5 mujeres de edad avanzada (edad media 72 años) y 5 mujeres jóvenes (edad media 30 años). El método de análisis del *N*-glicoma fue *Liquid Chromatography/Multiple Stage Mass Spectrometry* (LC-MSn) (*Miura et al., 2015*). Ya se ha comentado que algunos de los primeros estudios que investigaron el *N*-glicoma sérico/plasmático mediante DSA-FACE incluyeron también submuestras de pacientes centenarios (*Vanhooren et al., 2007, 2009, 2010; Catera et al., 2016*). En el otro extremo, un estudio, también croata, incluyó 170 niños y adolescentes entre 6 y 18 años de edad, estudiando su *N*-glicoma por HPLC (*Pucic et al., 2012*). Los resultados de estos estudios se comentan conjuntamente con los realizados en poblaciones más generales, estructurados por los rasgos de los diferentes GPs encontrados.

La sialilación de las proteínas del suero es un aspecto poco estudiado. El nivel de ácido siálico plasmático total (ligado y libre) aumenta con la edad (*Mehdi et al., 2012*). Sin embargo, la situación no es tan clara con respecto a los *N*-glicanos sialilados unidos a las proteínas plasmáticas, cuya complejidad disminuye con la edad en los niños (hay un aumento en los

glicanos mono- y disialilados, junto con una y una disminución en los glicanos tri- y tetrasialilados) (Pucic et al., 2012) y aumenta en personas de extrema longevidad (Miura et al., 2015). Así, los centenarios japoneses mostraron mayor abundancia de estructuras multiramificadas y altamente sialiladas, en comparación con los ancianos y controles jóvenes (Miura et al., 2015). El mismo grupo observó la abundancia, con la edad, de una glicofoma de haptoglobina triantenaria y sialilada que es característica de las enfermedades inflamatorias (Miura et al., 2015, 2018). Los datos al respecto de la sialilación, sin embargo, no son concluyentes en adultos. La mayoría de los estudios no encontraron cambios significativos en la sialilación durante el envejecimiento, mientras que los N-glicanos monosialilados y trisialilados se han correlacionado positiva y negativamente con la edad en dos estudios diferentes, uno de los cuales solo encontró cambios significativos en los hombres (Knezevic et al., 2010; Lu et al., 2011). Esta aparente contradicción no es sorprendente (Cindric et al., 2021), porque los N-glicanos sialilados del suero se originan a partir de una gran cantidad de diversas proteínas (Clerc et al., 2016), muchas de las cuales pueden variar en su concentración en respuesta al estado fisiológico o patológico, como las proteínas de fase aguda y las inmunoglobulinas (Cindric et al., 2021).

En lo que respecta a la fucosilación, varios estudios, realizados tanto en población adulta como pediátrica, coinciden en que el nivel de fucosilación central (core) disminuye ligeramente con el avance de la edad (Vanhooren et al., 2007; Knezevic et al., 2009, 2010; Lu et al., 2011; Ruhaak et al., 2011; Pucic et al., 2012). En el *Leiden Longevity Study*, dos N-glicanos biantenarios no fucosilados, concretamente uno de ellos biantenario digalactosilado (A2G2) y el otro también biantenaria, pero monosialilado monogalactosilado (A2G1S1), eran más abundantes en la descendencia de nonagenarios (personas de alrededor de 90 años de edad) que en los controles de la misma edad (las parejas de la descendencia) (Ruhaak et al., 2011).

No existen, en nuestro conocimiento, datos sobre los posibles cambios con la edad en la fucosilación periférica o antenaria (*outer-arm*). Tampoco existe, en nuestro conocimiento, información sobre la evolución con la edad de los N-glicanos oligomanosa (también llamados *high-mannose*).

Hay pocos datos sobre la evolución con la edad del grado de ramificación (número de antenas) de los glicanos del N-glicoma sérico. Ya se ha comentado que, en el estudio de centenarios japoneses, de escaso tamaño muestral, se encontró en éstos mayor abundancia de estructuras multiramificadas y altamente sialiladas, así como estructuras agalactosiladas, y niveles más bajos de estructuras biantenarias en comparación con los ancianos y los controles jóvenes

(Miura et al., 2015). Si bien se sabe que el aumento de las estructuras agalactosiladas está asociado con el envejecimiento, como se ha comentado más arriba, el aumento en la complejidad (ramificación múltiple, alta sialilación) no se ha visto, hasta la fecha, asociado en general al envejecimiento en las revisiones del tema (Cindric et al., 2021). Esta complejidad sí se ha visto, sin embargo, asociada a algunas enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Pawłowski et al., 1986; Miyahara et al., 2013; Keser et al., 2017; Adua et al., 2019; Sarrats et al., 2010).

La mayoría de los estudios no han observado cambios significativos relacionados con la edad en la abundancia de *N*-glicanos plasmáticos que contienen acetilglucosamina bisectriz (denominada como B en la nomenclatura habitual simplificada de los glicanos). Un estudio observó un aumento marginal en la abundancia de *N*-glicanos con *N*-acetilglucosamina bisectriz en los hombres adultos, pero no en las mujeres (Ding et al., 2011). Otro estudio observó un ligero aumento en la abundancia de un *N*-glicano con *N*-acetilglucosamina bisectriz (FA2B) (Vanhooren et al., 2007).

El conjunto de los datos del *N*-glicoma asociados con el envejecimiento ha dado lugar a hipótesis intrigantes sobre el *N*-glicoma sérico (y la glicosilación específica de la IgG sérica) como marcadores y, posiblemente como efectores moleculares del envejecimiento biológico (Ruhaak et al., 2011; Cindric et al., 2021; Mijakovac et al., 2022; Shkunnikova et al., 2023). Existe la necesidad de un biomarcador que determine la edad biológica, buscado desde hace muchas décadas. La glicosilación de las proteínas (el *N*-glicoma) podría ser uno de esos marcadores, aunque los estudios en esta línea son aún insuficientes.

La glicosilación y el envejecimiento están intrincadamente entrelazados (Miura y Endo, 2016). Ya se ha comentado que el hallazgo más consistente con el envejecimiento en el *N*-glicoma es un descenso de *N*-glicanos biantenarios digalactosilados y un aumento de los *N*-glicanos biantenarios agalactosilados, que dio lugar a la herramienta *GlycoAge test* (Vanhooren et al., 2010; Catera et al., 2016) y similares herramientas comerciales se han desarrollado con la glicosilación de la IgG (véase <https://glycanage.com/>). Es bien sabido que estos *N*-glicanos agalactosilados, sobre todo en la IgG, tienen poder proinflamatorio. Se ha propuesto que la acumulación gradual de IgG agalactosilada relacionada con la edad no sólo sería uno de los rasgos distintivos del envejecimiento, sino que también contribuiría a su exacerbación (Franceschi et al., 2000; De Martinis et al., 2005; Monti et al., 2017). Así, en un bucle autoamplificador, la IgG agalactosilada actuaría como un subproducto del envejecimiento y como un efector de sus cambios patogénicos (Franceschi et al. 2007; Dall'Olio et al., 2013;

Mijakovac et al., 2022; Shkunnikova et al., 2023). Curiosamente, las personas de países en vías de desarrollo presentan menores concentraciones de IgG agalactosilada, característicos de la inflamación y la edad; ello podría sugerir que algunas exposiciones ambientales asociadas a esos entornos podrían inducir inflamación crónica de bajo grado y un aumento aparente de la edad biológica (*Stambuk et al., 2020*).

En conjunto, los hallazgos serían compatibles con la hipótesis del *inflammaging*, de difícil traducción al español, que se refiere a la remodelación proinflamatoria del sistema inmunitario característica de las personas mayores, en forma de inflamación crónica asintomática sostenida de bajo grado, no saludable (*De Martinis et al., 2005; Pinti et al., 2016; Monti et al., 2017*). Es probable que esta inflamación sea causada por la exposición a largo plazo a diversos estímulos endógenos y exógenos, cuyos orígenes varían desde microorganismos y toxinas hasta las citoquinas inflamatorias secretadas por las células senescentes o hasta la presencia de células necróticas y dañadas (*Dall'Olio, 2013*). La atenuación de la inflamación es, de hecho, un buen predictor del envejecimiento saludable (*Arai et al., 2015*), estableciendo así la asociación del *inflammaging* con el riesgo de enfermedades relacionadas con la edad (*Franceschi, 2007; Franceschi et al., 2000, 2007; Pinti et al., 2016*). En conjunto, estos hallazgos podrían sugerir que la composición del *N*-glicoma total en plasma o suero podría ser un marcador de salud general, potencialmente adecuado para la predicción y el seguimiento de enfermedades de progresión con la edad, así como en la evaluación de la eficacia de las intervenciones anti-envejecimiento. Los estudios hasta la fecha, sin embargo, son insuficientes y no se han investigado apenas las diferencias entre sexos en el *N*-glicoma durante el envejecimiento.

En algunos de los hallazgos mencionados en relación a los cambios en el *N*-glicoma con la edad se ha observado un cierto dimorfismo sexual. En algunos estudios se observó que el descenso de la abundancia de *N*-glicanos biantenarios galactosilados con núcleo fucosilado era más prominente en las mujeres que en los hombres (*Knežević et al., 2010; Ding et al., 2011*). Esta diferencia se atribuyó al efecto conocido de los estrógenos en la glicosilación (*Kristic et al., 2014; Ercan et al., 2017*) y a su descenso a partir de la menopausia (*Cindric et al., 2021*). De modo similar, en el *Leiden Longevity Study* se observó que había interacción entre la edad y el sexo (indicando que el descenso de la abundancia era mayor en mujeres que en hombres) para algunos *N*-glicanos biantenarios digalactosilados (core-fucosilados o no) (*Ruhaak et al., 2011*). En cuanto a la sialilación, algunos de los cambios mencionados fueron más significativos en los hombres (*Knezevic et al., 2010; Lu et al., 2011*). En un estudio, el aumento marginal de la abundancia de *N*-glicanos con *N*-acetilglucosamina bisectriz se observó en hombres, pero no en

mujeres (Ding et al., 2011). En el *Leiden Longevity Study*, también hubo interacción entre sexo y edad (mayor descenso en mujeres) para dos N-glicanos con N-acetilglucosamina bisectriz (Ruhaak et al., 2011). En los estudios ya comentados del grupo de Lauc, los cambios de la abundancia de N-glicanos con la edad fueron, en general, más frecuentes en las mujeres que en los hombres, lo cual se atribuyó, de nuevo, a las posibles variaciones hormonales en las mujeres (Knezevic et al., 2009, 2010). En los niños y adolescentes, las diferencias entre sexos son menores que en los adultos (Pucic et al., 2012).

Por otro lado, todos los estudios se enfrentan a la complejidad de la interpretación de los resultados habituales del N-glicoma, que suelen presentarse como el área bajo la curva (en porcentaje) de cada uno de los hasta 40-46 glicanos-tipo que suelen aportar las técnicas glicómicas (Saldova et al., 2014). De una parte, estos son datos composicionales (es decir, su suma es el 100% [o 1]), lo cual impide el uso de las herramientas estadísticas habituales, por ejemplo, para establecer tests de significación. De otra parte, de cara a la aplicación clínica, para el profesional habitual el resultado del N-glicoma es de una difícil interpretación cuando no se trata de una sola medida, sino de 40-46 simultáneas (ejemplo en la Figura 2). Sería conveniente disponer de medidas-resumen que permitiesen una aproximación simplificada a sus resultados, de cara a la aplicación clínica.

Los estudios basados en población general, seleccionada aleatoriamente, tienen la ventaja de tratar muestras representativas de los fenómenos a estudio y, por otro lado, ofrecen la posibilidad de analizar, de forma no sesgada, la influencia de factores comunes como los demográficos (edad y sexo), de estilo de vida (tabaquismo, consumo de alcohol y actividad física), de trastornos frecuentes (como la obesidad y el síndrome metabólico asociado, con sus componentes) y la asociación con marcadores habituales de inflamación sobre el fenómeno que se considere. Por todo ello, uno de los objetivos generales del presente estudio fue contestar, en la población general adulta, a las preguntas que se han trazado en esta introducción, relacionadas con la relación de envejecimiento y el concepto de *inflammaging*, en ambos sexos, con el N-glicoma sérico.

1.3. El N-glicoma sérico en las enfermedades cardiovasculares en humanos

La edad y la inflamación están estrechamente unidas a la aterosclerosis y las correspondientes enfermedades cardiovasculares. Las muertes por enfermedad cardiovascular varían de país a país y dentro de cada país. Las cifras más altas se dan en Europa del este y en Asia central. En las últimas dos décadas, las muertes por enfermedad vascular han aumentado un 20% aunque, a la

vez, las muertes de causa cardiovascular ajustadas por edad han disminuido un 10% (*Virani et al., 2020*). La aparente paradoja se explica por el aumento global de población y por el envejecimiento en algunas poblaciones, en las que algunas enfermedades asociadas a la edad como la obesidad y la diabetes tipo 2, y otros factores de riesgo, han aumentado (*Virani et al. 2020*). Además de los factores de riesgo bien conocidos para aterosclerosis, existen múltiples pruebas de la relación de ésta con la inflamación crónica y la disregulación inmune en la patogenia de la aterosclerosis (*Fernandez-Ruiz, 2016; Swirski y Nahrendorf, 2018; Moore 2019*). Por todo ello, las enfermedades cardiovasculares arteriales encajan en el concepto de *inflammaging* expresado en párrafos anteriores.

Además, empieza a acumularse una serie de pruebas sustanciales de la implicación de la glicosilación de las proteínas en la enfermedad cardiovascular en revisiones recientes (*Gudelj y Lauc, 2018; Dashti et al., 2021*). En la aterosclerosis, que frecuentemente subyace en la enfermedad cardiovascular, la formación de la placa de ateroma y la obstrucción de la luz vascular resultan de un proceso inflamatorio en el que se acumulan leucocitos, lipoproteínas y otras células en la íntima arterial. Para ello, la transmigración de los leucocitos está mediada por su interacción con moléculas de adhesión altamente glicosiladas en la superficie endotelial (*Scott y Patel, 2013*). Las citocinas proinflamatorias contribuyen a la alteración de la glicosilación de las células endoteliales, lo cual puede favorecer la disregulación de las moléculas de adhesión en la formación precoz de placas de ateroma (*Huo y Xia, 2009; Scott et al., 2012; Pu y Yu, 2014*). Además, la glicosilación de las lipoproteínas es clave en la patogenia de la aterosclerosis (*Krishnan et al., 2015; Sukhorukov et al., 2019*).

Existen estudios, aunque limitados, de asociación de cambios en la *N*-glicosilación con enfermedades cardiovasculares. Un marcador glicómico, denominado funcionalmente GlycA (A, de acetil), combinado de la cuantificación por RMN de los grupos *N*-acetil-metil de los residuos de *N*-acetilglucosamina localizados en ramas específicas de algunas proteínas plasmáticas concretas (sobre todo alfa-1-glicoproteína ácida, haptoglobina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-antiquimiotripsina, y transferrina) (*Otvos et al. 2015*), se asocia con la diversas formas de enfermedad cardiovascular y muerte (*Gruppen et al. 2015; Akinkuolie et al. 2014, 2016, Otvos et al. 2018*). Este mismo marcador glicídico (GlycA) se ha visto asociado con enfermedad arterial subclínica (especialmente en paciente con enfermedades crónicas inflamatorias), presencia de placas de ateroma en territorios periféricos y desarrollo de aneurisma aórtico (*Menni et al. 2018; Joshi et al. 2016; Ormseth et al. 2015; Purmalek et al. 2019; Fashanu et al. 2019*).

También se ha encontrado asociación entre variaciones en la *N*-glicosilación de la IgG y la enfermedad cardiovascular (*Menni et al., 2018; Li et al., 2018; Jandus et al., 2019; Wang et al., 2019; Birukov et al. 2022; Plavsá et al., 2023; Radovani et al., 2023*). En la enfermedad arterial coronaria, las mayores diferencias se observaron en mujeres, destacando la asociación negativa de las estructuras de *N*-glicanos sialilados con dicha enfermedad (*Radovani et al., 2023*).

Hay muy pocos estudios que hayan investigado la relación del *N*-glicoma sérico con la enfermedad cardiovascular. En un estudio centrado en la enfermedad cerebrovascular silente de pequeño vaso demostrada por RMN, se observó que la menor abundancia de *N*-glicanos core-fucosilados biantenarios digalactosilados y la mayor abundancia de *N*-glicanos triantenarios fucosilados eran predictores independientes de esta forma de enfermedad cerebrovascular, tras ajustar por factores de confusión (*Vilar-Bergua et al., 2015*). En un estudio de mayor amplitud y prospectivo sobre el valor predictivo del *N*-glicoma sérico en la incidencia de diabetes tipo 2 y de enfermedades cardiovasculares, se observó que la información proporcionada por el *N*-glicoma fue moderadamente predictiva sobre la incidencia de este grupo de enfermedades y que puede mejorar la predicción basada en los indicadores de riesgo habituales, ajustados por edad (*Wittenbecher et al., 2020*). Concretamente, la abundancia de *N*-glicanos core-fucosilados biantenarios monogalactosilados no sialilados se asoció significativamente con el mayor riesgo cardiovascular en mujeres (*Wittenbecher et al., 2020*). Algunos otros *N*-glicanos asociados con la incidencia de enfermedad cardiovascular lo estuvieron también con la incidencia de diabetes tipo 2 (*Wittenbecher et al., 2020*). Es sabido que algunos factores de riesgo vascular se asocian con cambios en el *N*-glicoma o en la glicosilación de la IgG, como ocurre en la diabetes mellitus (*Testa et al., 2015; Lemmers et al., 2017; Rudman et al., 2022; Cvetko et al., 2021*) y en la hipertensión arterial (*Kifer et al., 2021*). Por todo ello, resulta difícil desentrañar si determinadas asociaciones son debidas a la propia enfermedad cardiovascular o a sus factores de riesgo. En el ya mencionado Leiden Longevity Study, un *N*-glicano cuya abundancia se asoció positivamente con la longevidad (más abundante en descendientes de longevos que en los controles constituidos por sus parejas), la estructura A2G1S1 también se asoció con la enfermedad cardiovascular cuando su abundancia era baja (*Ruhaak et al., 2011*). En nuestro conocimiento, estos hallazgos no han sido confirmados en estudios ulteriores. Por todo ello, otro de los objetivos generales del presente estudio fue investigar, en la población general adulta la posible relación de las enfermedades cardiovasculares con los cambios en el *N*-glicoma sérico.

2. OBJETIVOS

En línea con lo expresado en párrafos anteriores, los objetivos del presente estudio fueron los siguientes:

1. Describir los cambios del *N*-glicoma sérico con la edad, comparando la posible diferente evolución de hombres y mujeres.
2. Diseñar, mediante técnicas estadísticas apropiadas, los resultados del *N*-glicoma en patrones simplificados que permitan su comparación.
3. Investigar la posible asociación de patrones del *N*-glicoma asociados con el envejecimiento con enfermedades frecuentes, especialmente metabólicas, marcadores de inflamación e índices de comorbilidad. Además, específicamente:
4. Investigar la posible asociación de las enfermedades cardiovasculares arteriales (enfermedad cerebrovascular, cardiopatía isquémica y arteriopatía periférica) con cambios en el *N*-glicoma sérico.

3. MÉTODOS

3.1. Diseño, ámbito y población del estudio

El estudio se llevó a cabo en el municipio de A Estrada (España, ubicación: 42°41'21"N, 8°29'14"W). Un esquema del estudio AEGIS (*A-Estrada Glycation and Inflammation Study*), en el que se enmarca el presente trabajo, está disponible en www.clinicaltrials.gov y se ha descrito previamente con mayor extensión (*Alende Castro et al., 2019, 2021*).

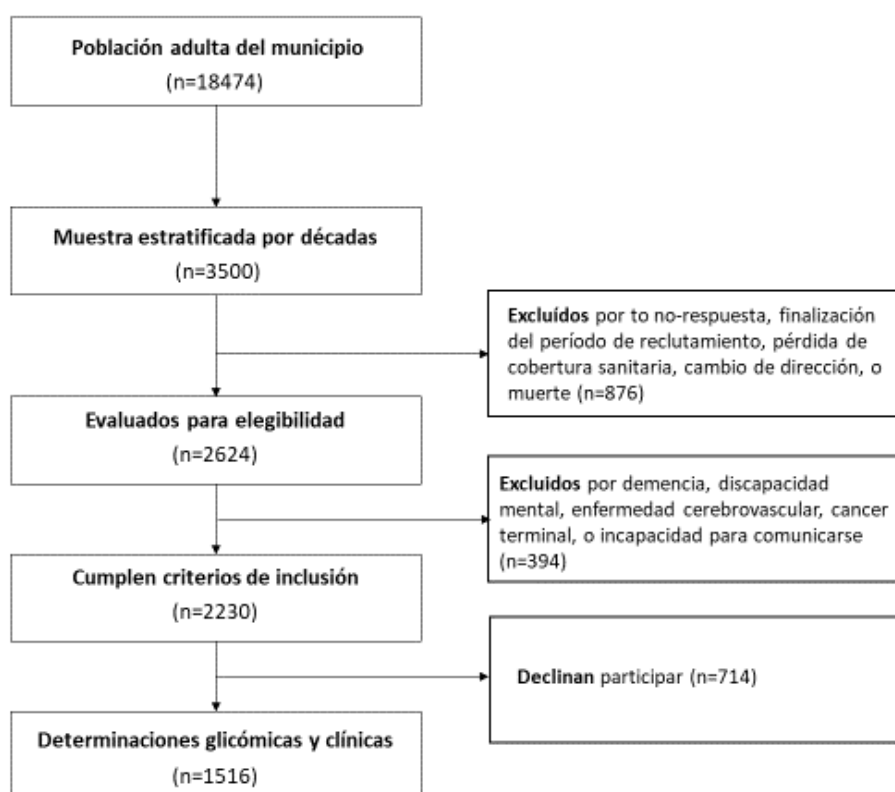


Figura 4. Esquema-perfil del estudio. Fuente, elaboración propia.

El municipio tenía una población adulta (edad mayor o igual a 18 años) de 18.474 personas cuando empezó el estudio en 2012 (Figura 4). Se extrajo una muestra aleatoria de la población adulta, estratificada en los siguientes grupos de edad: 18 a 29 años; 30 a 39 años; 40 a 49 años; 50 a 59 años; 60 a 69 años; 70 a 79 años; y 80 años en adelante. Un programa informático generó una muestra aleatoria de 500 sujetos en cada grupo de edad. De la muestra inicial de 3500 personas, 2230 pudieron ser evaluadas para determinar su elegibilidad y de ellas, 1516 aceptaron participar en el estudio (tasa de participación: 68%; 55.3% mujeres; mediana de edad: 52 años (rango: 18-91 años); caucásicos: 100%). Los participantes fueron convocados al centro de salud, donde se les realizó un cuestionario estructurado realizado por un médico (Anexo I), un examen físico y una muestra de sangre venosa en ayunas.

3.2. Aspectos éticos

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes. El estudio-fuente de prevalencia y los estudios glicémicos específicos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación de Galicia (códigos 2010-315 y 2016-464, respectivamente) y estuvieron de acuerdo con la Declaración de Helsinki vigente. Las respectivas autorizaciones del Comité Ético de Investigación se encuentran en el Anexo II de la presente tesis.

3.3. Determinaciones principales

3.3.1. Historial de tabaquismo

Los consumidores de al menos un cigarrillo al día se consideraron fumadores. Los individuos que habían dejado de fumar durante el año precedente también se consideraron fumadores. Los restantes sujetos fueron clasificados bien como ex-fumadores o bien como nunca fumadores.

3.3.2. Historial de consumo de alcohol

El consumo habitual de alcohol se evaluó en unidades de bebida estándar, sumando el número de vasos de vino (aproximadamente, 10g de etanol), unidades de cerveza (aproximadamente, 10g), y unidades de licor (aproximadamente, 20g) consumidos habitualmente por semana (*Gual et al., 1999*). Los individuos abstemios y los consumidores de menos de una unidad por semana se unieron en el mismo grupo. Los restantes se clasificaron como bebedores ligeros (10-139 g/semana), moderados (140-279 g/semana) y excesivos (≥ 280 g/semana).

3.3.3. Historial de actividad física habitual

Los participantes completaron el *Physical Activity Questionnaire* (versión corta, disponible en <https://sites.google.com/site/theipaq/home>) (*Craig et al., 2003*), validada en España (*Román-Viñas et al., 2013*). El cuestionario permite la cuantificación de los METs (*metabolic equivalents of task*) y la estratificación de la actividad física habitual en baja, moderada y alta.

3.3.4. Definición de alteraciones metabólicas

Síndrome metabólico. Se consideró la presencia de síndrome metabólico cuando se cumplían al menos 3 criterios del *Adult Treatment Panel III* (ATP-III) (2001): (1) obesidad abdominal (perímetro de cintura >102 cm en hombres y >88 cm en mujeres); (2) hipertrigliceridemia (triglicéridos séricos ≥ 150 mg/dL); (3) niveles bajos de HDL-colesterol (<40 mg/dL en hombres

and <50 mg/dL en mujeres); (4) presión arterial elevada ($\geq 130/\geq 85$ mmHg o tratamiento antihipertensivo actual); y (5) hiperglucemia (≥ 110 mg/dL o tratamiento antidiabético actual).

Obesidad. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) con el peso (en kg) dividido por el cuadrado de la estatura (en metros). De acuerdo, se clasificaron a los participantes como con normopeso (IMC <25 kg/m²), con sobrepeso (IMC 25-30 kg/m²), u obesos (IMC >30 kg/m²).

Diabetes mellitus. Se definió la presencia de diabetes de acuerdo con los criterios de la *American Diabetes Association* (ADA) cuando la HbA1c era mayor del 6.5% y/o la glucosa plasmática en ayunas mayor de 126 mg/dL o cuando el sujeto estaba en tratamiento con algún antidiabético (*American Diabetes Association, 2019*).

3.3.5. Cuantificación general de comorbilidad

De modo análogo a índices bien establecidos de comorbilidad como el de Charlson et al. (1987), modificado, se consideraron comorbilidades la diabetes mellitus, enfermedad cerebrovascular, cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal crónica, enfermedad hepática, cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad reumatológica y enfermedad inflamatoria intestinal. A la presencia de cada una de ellas se les otorgó 1 punto a efectos de suma para cuantificación de la comorbilidad.

3.3.6. Cuantificación del riesgo cardiovascular

Para cuantificar el riesgo cardiovascular global a los 5 y 10 años se aplicaron los índices SCORE2 y SCORE2-OP (versión del anterior para personas mayores [*Older People*, mayores de 70 años]) (*SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration, 2021; SCORE2-OP working group and ESC Cardiovascular risk collaboration, 2021*).

3.3.7. Definición de enfermedad cardiovascular arterial

Los datos se recogieron de las historias clínicas electrónicas de los individuos, codificadas en Atención Primaria en el modo habitual. Se consideró enfermedad cardiovascular arterial la presencia (casos prevalentes) de cualquiera de los siguientes diagnósticos: cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular o enfermedad arterial periférica. También se incluyó como enfermedad cardiovascular arterial el resultado patológico de dos técnicas realizadas a los 1516 sujetos de estudio: presencia de ondas Q patológicas en el ECG de 12 derivaciones (analizado por un mismo cardiólogo experto) o la presencia de índice tobillo-brazo menor de 0.9, obtenido según las técnicas habituales (*Sánchez-Ruiz et al., 2005; Guindo et al., 2009*).

3.3.8. Determinaciones analíticas de rutina clínica

Las concentraciones en suero de colesterol y sus fracciones, triglicéridos, glucosa, gammaglutamil transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (AST) y creatinina se determinaron en muestras de suero frescas tras extracción de sangre en ayunas de toda la noche, por la mañana, en un analizador automático ADVIA 2400 (Siemens Healthcare Diagnostics, Barcelona) por el método estándar recomendado por la *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC). Para el cálculo de la tasa de filtración glomerular se utilizó la fórmula MDRD-4. La hormona T3 determinó por un ensayo inmunoquimiométrico en un aparato Siemens Advia Centaur (Siemens Healthcare Diagnostics).

3.3.9. Determinación de marcadores de inflamación

Proteína C reactiva (PCR). La PCR de amplio rango (wide-range, wrPCR) se midió en muestras de suero frescas por un método comercial de inmunoturbidimetría latex-enhanced en un Advia 2400 Clinical Chemistry System (Siemens). Los valores de referencia con el método son 0-0.5 mg/dL. La medición estuvo disponible en 1499 individuos (*Alende-Castro et al., 2021*).

Velocidad de sedimentación globular (VSG). La VSG se midió en muestras de sangre en tubos con K3EDTA (Becton Dickinson, USA) con un aparato automático TEST-1 (Alifax, Italy). El aparato TEST-1 se ha validado en relación al método de referencia Westergren de acuerdo con los criterios del *International Council for Standardization in Hematology* (Ajubi et al., 2006). Los valores de referencia son 0-20 mm/h para hombres y 0-30 mm/h para mujeres. La determinación de VSG estuvo disponible en 1472 participantes (*Alende-Castro et al., 2019*).

Citocinas proinflamatorias séricas. Las concentraciones séricas de interleucina (IL)-6, IL-8, TNF-alfa y del receptor soluble de la IL-2 (sIL-2R) se determinaron en muestras de suero frescas por medio de un inmunoensayo quimioluminiscente (IMMULITE 2000 System, Siemens). Los resultados estuvieron disponibles en 1499 individuos (*Alende-Castro et al., 2021b; 2023*).

3.3.10. Determinación de marcadores de glicación y control glucémico

La **hemoglobina glicada (HbA1c)** se determinó mediante cromatografía líquida (*high-performance liquid chromatography*) en un analizador Menarini Diagnostics Arkray Adams HA-8180 T; los valores de HbA1c se convirtieron a unidades alineadas con el *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT), de acuerdo con el *US National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) (*Hoelzel et al., 2004*).

Los niveles de fructosamina se determinaron mediante el método enzimático *Diazyme Glycated Serum Protein* (GSP, Diazyme, Kent, UK) en un analizador Advia 2400 (Siemens). El ensayo utiliza la proteína K para digerir las proteínas séricas en pequeños fragmentos y fructosaminasa para catalizar la oxidación específica de la unión de cetoamina de los fragmentos glicosados. La liberación de peróxido de hidrógeno, medida colorimétricamente a 550 nm, es proporcional a la concentración de proteínas séricas glicosadas (fructosamina). Para calcular el porcentaje de albúmina glicosada (GA), los valores de fructosamina (proteínas séricas glicosadas) se determinaron con el método arriba mencionado y los de albúmina mediante el método del verde bromocresol. El porcentaje de GA se calculó con la ecuación recomendada por el fabricante (*Wu et al., 2016*).

3.3.11. Determinaciones de marcadores de glicosilación: análisis del N-glicoma sérico

Los estudios glicómicos fueron realizados en el *National Institute for Bioprocessing, Research and Training* (NIBRT) de Dublín (Irlanda; Dra. Radka Saldova). Tal como descrito previamente (*O'Flaherty et al., 2022*), los *N*-glicanos se liberaron de una muestra de 5 µL de suero previamente descongelado, mediante un método automatizado *high-throughput* (*Stockman et al., 2015*). Las muestras fueron desnaturalizadas con ditiotreitól, alquiladas con iodoacetamida, y los *N*-glicanos fueron liberados enzimáticamente de su estructura proteica mediante PNGasa-F (NEB Recombinant, código P0709L, 10 µL por pocillo, 5000 U en 1 M bicarbonato amónico, pH 8.0). Los glicanos se inmovilizaron en soportes sólidos y se eliminó el exceso de reactivos mediante filtrado con centrífuga. Se liberaron los glicanos de su soporte sólido y se marcaron con el fluoróforo 2-aminobenzamida (2-AB). Los glicanos se lavaron en una placa químicamente inerte de 96 pocillos (Millipore Solvintert, membrana de politetrafluoroetileno hidrofóbica, tamaño del poro 0.45 µm) utilizando cartuchos HyperSep Diol SPE (Thermo Scientific). Para la cromatografía de interacción hidrofílica con cromatografía líquida de ultra rendimiento (*hydrophilic interaction liquid chromatography* [HILIC] *ultra-performance liquid chromatography* [UPLC]), los *N*-glicanos marcados con fluorescencia se separaron en un aparato Waters Acquity H-Class UPLC (Milford, MA, USA), que consiste en un administrador de solventes cuaternarios, un administrador de muestras-FTN, administrador de columnas y un detector de fluorescencia FLR con longitudes de onda de excitación y emisión de 245 y 395 nm, respectivamente. El instrumento estuvo bajo el control del software Empower 3, compilación 3471 (Waters, Milford, MA, EEUU). Los *N*-glicanos marcados se separaron en una columna de cromatografía Waters Ethylene Bridged Hybrid BEH Glycan, 150 × 2.1 mm de d.i., 1.7 µm de partículas BEH, con formiato de amonio 50 mM, pH 4,4, como disolvente A y MeCN como disolvente B. La columna se ajustó con un filtro ACQUITY en línea de 0.2 µm. El método de separación utilizó un gradiente

lineal de 70–30 % de acetonitrilo (v/v) a un caudal de 0.56 ml/min en un ciclo analítico de 30 min. Las muestras se mantuvieron a 4°C antes de la inyección. Se utilizó un volumen de inyección de 25 µl de muestra preparada en MeCN al 70 % v/v. Las muestras se mantuvieron a 5°C antes de la inyección y la temperatura de separación fue de 40°C. El sistema se calibró usando un estándar externo de oligómeros de glucosa hidrolizados y marcados con 2-AB para crear una escala de dextrano, como se ha descrito anteriormente (Royle *et al.*, 2008). Se ajustó una curva de distribución polinomial de quinto orden a la escala de dextrano para asignar valores de unidad de glucosa (GU) a partir de los tiempos de retención (usando el *software* Empower de Waters).

Todos los cromatogramas se separaron de la misma manera en 46 picos (*glycan peaks*, GPs) según Saldoval *et al.* (2014); la cantidad de glicano en cada pico se expresó como % del área total integrada. Las estructuras de glicanos se denotaron utilizando la nomenclatura SNFG (*Symbol Nomenclature for Glycans*) y el software DrawGlycan-SNFG (Cheng *et al.*, 2016; Neelamegham *et al.*, 2019) con la ayuda de GlycoStore.org (Zhao *et al.*, 2018). En la Figura 5 se representa un ejemplo de cromatograma, con *N*-glicanos destacables por su abundancia.

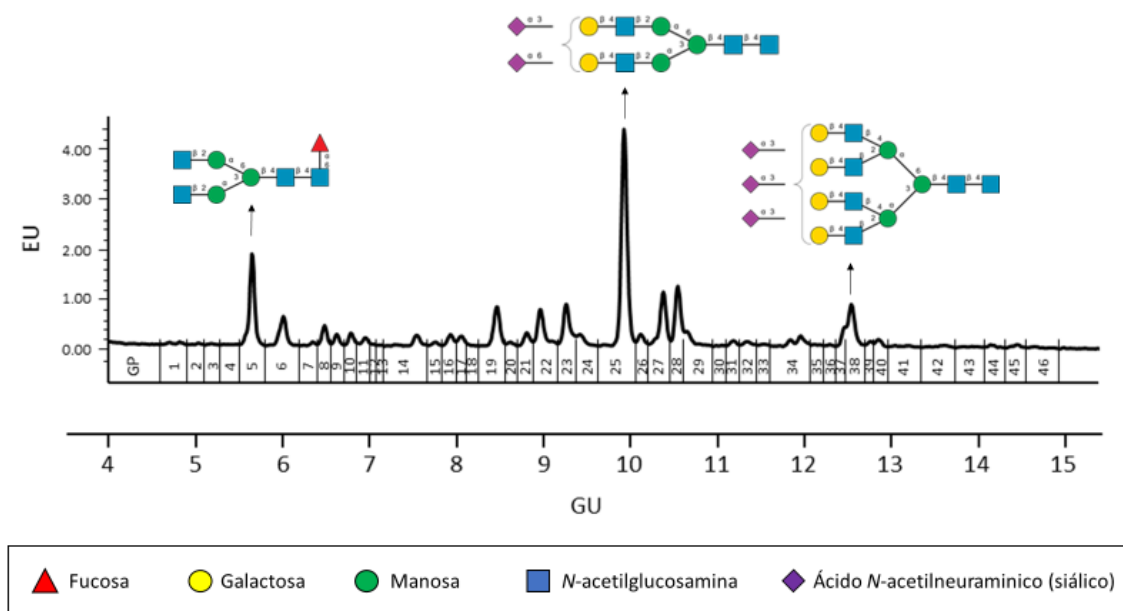


Figura 5. Ejemplo de cromatograma en el que se representan ejemplos de la estructura de *N*-glicano más importante en tres de los picos más abundantes. En general, la complejidad de los *N*-glicanos aumenta de izquierda a derecha en el cromatograma y, por ende, con la numeración del correspondiente GP. Elaboración de los autores.

Tabla 2. Estructuras principales de cada uno de los 46 *glycan peaks* (GP) en el cromatograma.

| Pico | Nomenclatura | Estructura | GU | Pico | Nomenclatura | Estructura | GU |
|------|--------------|------------|------|------|----------------|------------|-------|
| GP1 | A1 | | 4.87 | GP16 | A2[3]BG1S[3]1 | | 7.90 |
| GP2 | FA1 | | 5.16 | GP17 | FA2[3]G1S[6]1 | | 7.99 |
| GP3 | A1[6]G1 | | 5.41 | GP18 | FA2[3]BG1S[3]1 | | 8.1 |
| GP4 | A2B | | 5.53 | GP19 | A2G2S[6]1 | | 8.33 |
| GP5 | FA2 | | 5.87 | GP20 | A2BG2S[6]1 | | 8.45 |
| GP6 | M5 | | 6.25 | GP21 | M5A1G1S[3]1 | | 8.61 |
| | | | | GP21 | A2G2S[3]1 | | |
| GP7 | A2[6]BG1 | | 6.57 | GP22 | FA2G2S[6]1 | | 8.74 |
| GP8 | FA2[6]G1 | | 6.7 | GP23 | FA2BG2S[3]1 | | 9.00 |
| GP9 | FA2[3]G1 | | 6.82 | GP24 | A2G2S[3,6]2 | | 9.14 |
| GP10 | FA2[6]BG1 | | 6.97 | GP25 | A2G2S[3,6]2 | | 9.57 |
| GP11 | M6 D3 | | 7.11 | GP26 | A2BG2S[3,6]2 | | 9.74 |
| GP12 | A1[3]G1S[3]1 | | 7.19 | GP27 | FA2G2S[3,6]2 | | 9.99 |
| | A2G2 | | | GP28 | FA2BG2S[6,6]2 | | |
| GP13 | A2BG2 | | 7.24 | GP29 | A3G3S[3,6]2 | | 10.28 |
| GP14 | FA2G2 | | 7.60 | GP30 | A4G4S[3]1 | | 10.56 |
| GP15 | FA2BG2 | | 7.77 | GP31 | A3G3S[3,3]2 | | 10.75 |

| Pico | Nomenclatura | Estructura | GU | Pico | Nomenclatura | Estructura | GU |
|-------------|-----------------|------------|-------|-------------|-------------------|------------|-------|
| GP32 | A3G3S[3,3,3]3 | | 10.92 | GP40 | A4F1G3S[3,3,3]3 | | 12.39 |
| GP33 | A3G3S[3,3,6]3 | | 11.09 | GP41 | A4G4S[3,3,3,3]4 | | 12.72 |
| GP34 | A3G3S[3,3,6]3 | | 11.51 | GP42 | A4G4S[3,3,3,6]4 | | 12.91 |
| GP35 | A3BG3S[3,3,3]3 | | 11.64 | GP43 | A4G4S[3,3,3,6]4 | | 13.23 |
| GP36 | FA3G3S[3,6,6]3 | | 11.84 | GP44 | A4G4S[3,3,3,3]4 | | 13.37 |
| GP37 | A3F1G3S[3,3,3]3 | | 12.01 | GP45 | A4F1G4S[3,3,3,6]4 | | 13.74 |

En la Tabla 2 previa se describen y representan las estructuras principales de cada uno de los 46 GPs en el cromatograma (elaboración de los autores, previamente publicada en *O’Flaherty et al., 2022*, en abierto bajo licencia *Creative Commons*).

Además, se definieron grupos de GPs por sus características comunes, del modo expresado en la siguiente Tabla 3 (*Saldiva et al., 2014*). Los *N*-glicanos así clasificados por esos rasgos no son excluyentes. Para cada *N*-glicano se aplica un rasgo de sialilación, galactosilación, ramificación y fucosilación. Así, por ejemplo, el *N*-glicano predominante en el GP3 es monoantenario, monogalactosilado, asialilado y no fucosilado (Tablas 2 y 3). En general, los *N*-glicanos más sencillos (con menos ramificaciones, menor galactosilación y sialilación) están a la izquierda del cromatograma (son los GP con los números más bajos), y, viceversa, los más complejos están situados a la derecha del cromatograma (en los números más altos) (Tablas 2 y 3; Figuras 6, 7 y 8).

Tabla 3. Agrupaciones de los 46 *N*-glicanos basadas en sus características bioquímicas comunes

| Bioquímica | Rasgo | Código | Picos de <i>N</i> -glicano (<i>glycan peaks</i> , GP) |
|------------------------|-----------------------------|-----------|--|
| Sialilación | Asialilados (neutros) | S0 | GP1-15 |
| | Monosialilados | S1 | GP16-23 + GP30 |
| | Disialilados | S2 | GP24-29 + GP31 |
| | Trisialilados | S3 | GP32-40 |
| | Tetrasialilados | S4 | GP41-46 |
| Galactosilación | Agalactosilados | G0 | GP1-2 + GP4-5 + [GP6/2] + [GP12/2] |
| | Monogalactosilados | G1 | GP3+GP7-10 + [GP12/2] + GP16-18 + [GP21/2] |
| | Digalactosilados | G2 | GP13-15 + GP19 + GP20 + [GP21/2] + GP22-28 |
| | Trigalactosilados | G3 | GP29 + GP31-37 |
| | Tetragalactosilados | G4 | GP30 + GP38-46 |
| Ramificación | Monoantennarios | A1 | GP1-3 + [GP12/2] + [GP21/2] |
| | Biantennarios | A2 | GP4-5 + [GP6/2] + GP7-10 + [GP12/2] + GP13-20 + [GP21/2] + GP22-28 |
| | Triantennarios | A3 | GP29 + GP31-37 |
| | Tetraantennarios | A4 | GP30 + GP38-46 |
| Fucosilación | Central (<i>core</i>) | CF | GP2 + GP5 + [GP6/2] + GP8-10 + GP14-15 + GP17-18 + GP22-23 + GP27-28 + GP36 + [GP44/2] |
| | Periférica (<i>outer</i>) | OF | GP37 + GP40 + [GP41/3] + GP45 + [GP46/3] |
| Oligomanosa | Oligomanosa | OM | [GP6/2] + GP11 |

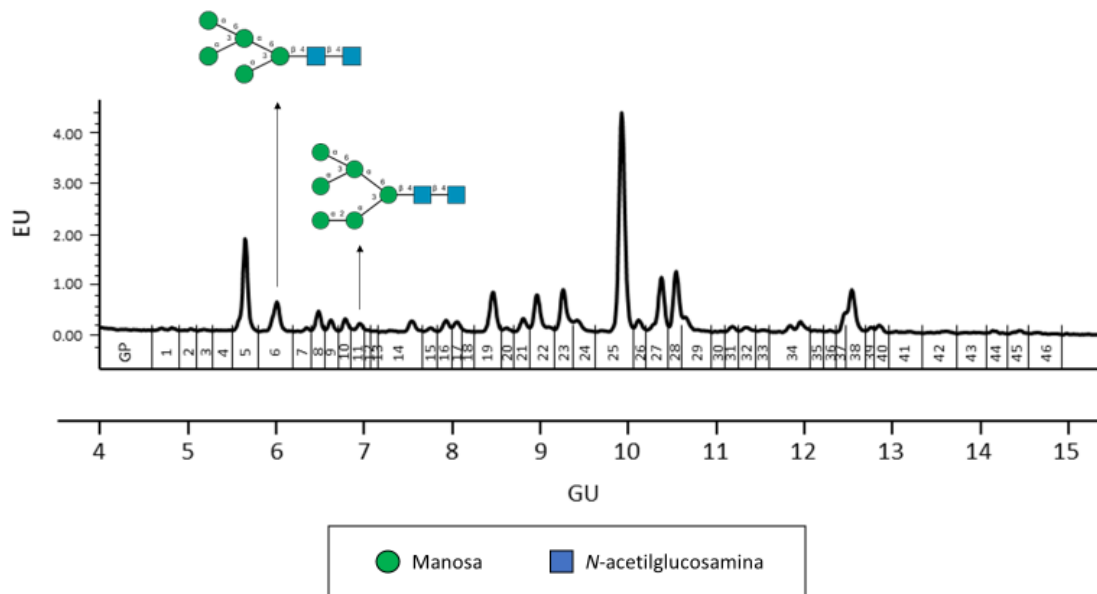


Figura 6. Localización en el cromatograma de los *N*-glicanos clasificados como oligomanosa (también denominados en la literatura como *high-mannose*). Son *N*-glicanos sencillos, situados a la izquierda del cromatograma. Sólo tienen residuos de manosa unidos al esqueleto (*backbone*) común de todos los *N*-glicanos, representado en la Figura 1, sin ramificaciones de *N*-acetilglucosamina. Elaboración de los autores.

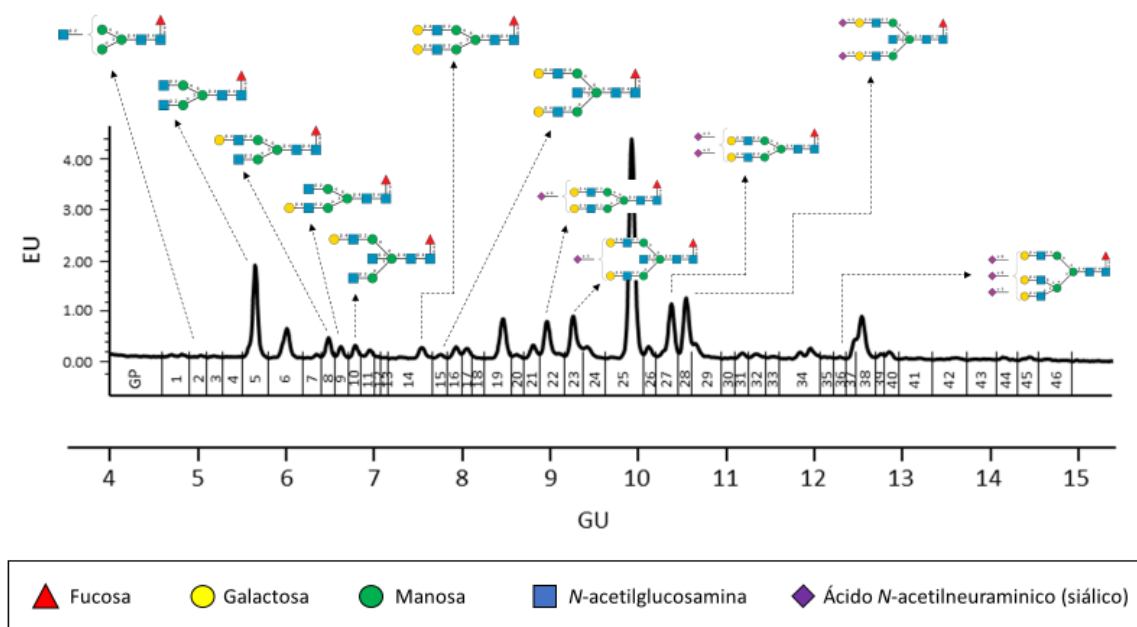


Figura 7. Localización en el cromatograma de los *N*-glicanos clasificados como core-fucosilados (también denominados como *inner-fucose*). La fucosilación está en la parte central, en la primera molécula de *N*-acetilglucosamina unida a la proteína. Los *N*-glicanos core-fucosilados están dispersos en el cromatograma, pero la mayoría están a la izquierda del mismo (*N*-glicanos sencillos, poco ramificados). Elaboración de los autores.

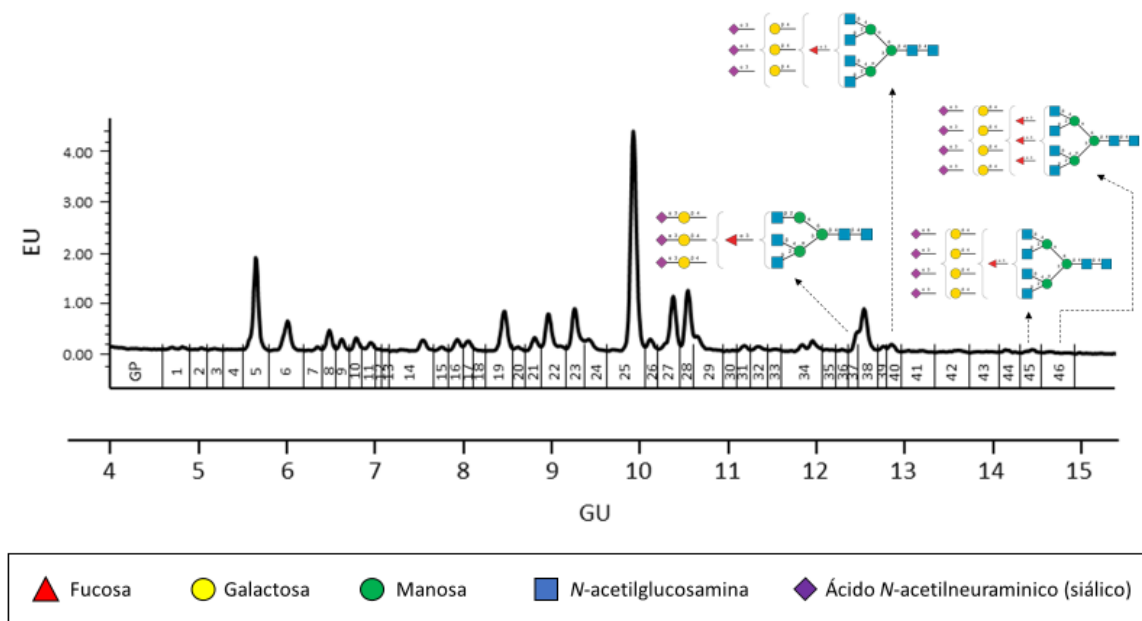


Figura 8. Localización en el cromatograma de los *N*-glicanos clasificados con fucosilación periférica (en las antenas; también denominados como *outer-arm-fucose* o *antennary fucose*). La fucosilación está en la parte más externa de la molécula. Los *N*-glicanos fucosilados están *a la derecha* del cromatograma (*N*-glicanos complejos, ramificados y sislilados). Elaboración de los autores.

3.4. Análisis estadísticos

3.4.1. Aspectos generales: el problema de los datos *composicionales*

Dado que los 46 picos (GPs) del *N*-glicoma así obtenido suman 100% (o '1', Figura 9) el cambio de un pico influye necesariamente en los valores de los demás. Los datos con esta inherente dependencia se denominan datos *constreñidos* o *composicionales*. Por ello, los datos fueron estudiados mediante técnicas de *Compositional Data Analysis* (CODA). Los CODA se basan en la transformación de estos datos en un conjunto de log-ratios isométricas (*isometric log-ratios*, *ilr*). Los datos así transformados pueden tomar cualquier valor en la línea real y, por lo tanto, se les pueden aplicar técnicas estadísticas estándar, lo cual sería incorrecto con los datos crudos.

3.4.2. Aspectos específicos: Estudio 1 (objetivos 1-3)

La correlación entre los *N*-glicanos se estimó mediante el test de Spearman utilizando los datos *ilr*-transformados (Kynclova et al., 2017). Las diferencias entre hombres y mujeres se testaron de modo global mediante la aplicación de un test de dos muestras para datos composicionales de alta dimensionalidad (Cao et al., 2018). A continuación, para completar el resultado de este

test multivariante, se aplicó el test de Mann-Whitney con los valores \ln -transformados para explorar las diferencias entre hombres y mujeres en los picos individuales. De modo adicional, se aplicaron modelos aditivos generalizados (*Generalized Additive Models*, GAM) para estudiar el efecto de la edad, estratificado por sexo, sobre los valores medios de *N*-glicanos.

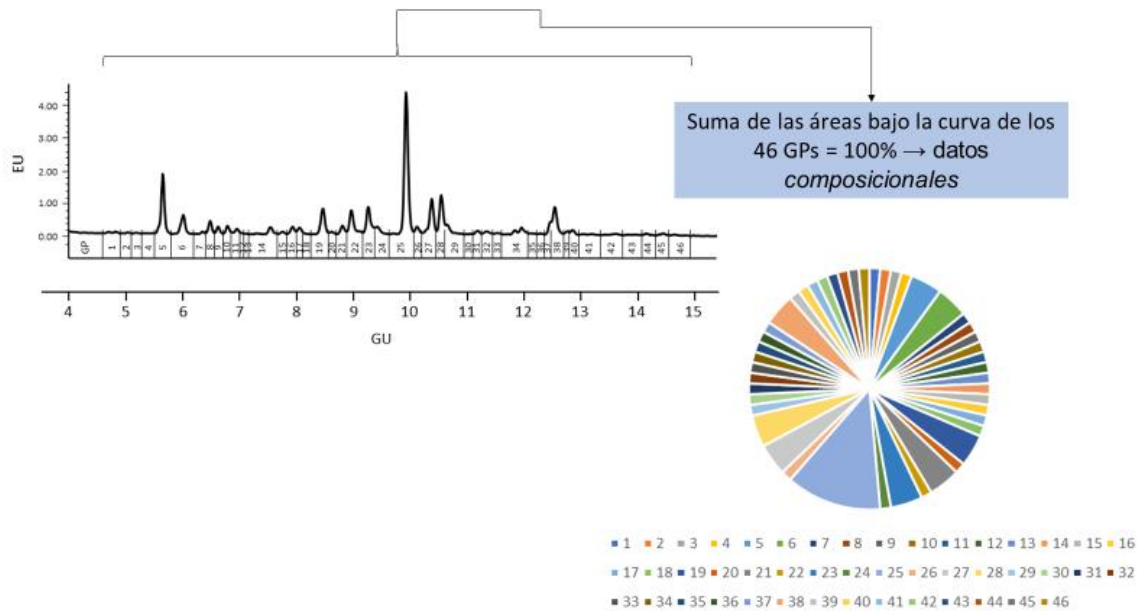


Figura 9. Distribución de los datos de los cromatogramas del *N*-glicoma sérico a efectos estadísticos: el problema de los datos *composicionales* o constreñidos. Elaboración por los autores

En cuanto a las agrupaciones de glicanos por sus características (véase tabla-esquema de la página anterior), la galactosilación (con valores G0, G1, G2, G3, o G4), la sialilación (con valores S0, S1, S2, S3, o S4), y la ramificación (con valores A1, A2, A3, o A4), fueron tratados como grupos independientes de datos composicionales y se aplicaron en ellos las técnicas CODA como en el análisis de glicanos individuales. Las agrupaciones de fucosilación y oligomanosa no se trataron de datos composicionales (su suma no es 100%) y fueron tratados como variables aleatorias con dominio restringido (0,1). Su comparación se realizó con los mismos tests no paramétricos que en el caso anterior y un modelo GAM para una respuesta de distribución beta.

Se hizo un análisis robusto de componentes principales (*robust principal component analysis*, PCA) (Filzmoser *et al.*, 2009) para explorar la interdependencia entre los GPs y para expresar su información de una manera más manejable. Se utilizaron aportes de PCA para entender la correlación entre cada GP y la dimensión correspondiente. Además, se definieron grupos o

patrones (*clusters*) de sujetos, basados en perfiles de N-glicanos mediante puntuaciones de PCA, aplicando un algoritmo (*k-means clustering algorithm*) a los datos ilr-transformados. El número óptimo de clusters se definió gráficamente, basándose en la suma (*within sum*) de cuadrados (método del acodamiento, *elbow method*) (Charrad et al., 2014). Los grupos así definidos fueron comparados en sus características demográficas y clínicas mediante pruebas no paramétricas (test de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis para variables continuas y test Chi-cuadrado para variables categóricas). La probabilidad de pertenecer a los grupos (*clusters*) definidos a partir del N-glicoma sérico se estudió mediante una regresión logística multivariante donde la edad, sexo, marcadores de glicación, marcadores de inflamación y comorbilidades fueron consideradas como variables predictoras.

Todos los valores de P fueron corregidos mediante el método de Benjamini (Benjamini y Hochberg, 1995) para reducir la tasa de falsos hallazgos significativos en múltiples comparaciones (*false discovery rate*).

Los análisis estadísticos fueron realizados en R (R core team, 2021), usando los recursos (*packages*) *compositional* (Tsagris y Athineou, 2022), *compositions* (van den Boogaart et al., 2022), *robCompositions* (Filzmoser et al., 2018), *mvoutlier* (Filzmoser y Gschwandtner, 2021), and *mgcv* (Wood, 2017). Las representaciones gráficas se realizaron con el paquete *ggplot2* (Wickham, 2016).

3.4.3. Aspectos específicos: Estudio 2 (objetivo 4)

Son de aplicación los aspectos generales sobre los datos composicionales y sobre el análisis de componentes principales mencionados en el apartado anterior. Específicamente, se aplicaron las transformaciones en *isometric log-ratios* (ilr) antes de realizar el análisis de componentes principales o los modelos de regresión que se mencionan más adelante.

Para investigar los GPs que estuvieron más fuertemente asociados con la prevalencia de enfermedad cardiovascular arterial ante datos composicionales, se utilizó el paquete estadístico *selbal* de R (Rivera-Pinto et al., 2018). Este método fue desarrollado para el análisis de microbiota intestinal, en la cual que obtienen datos de proporciones de microorganismos cuya suma es 100 (datos composicionales), y fue aplicado por nuestro grupo en publicaciones previas (O'Flaherty et al., 2022). El método realiza múltiples regresiones un número de veces, añadiendo cada vez un nuevo GP al modelo. A diferencia de la regresión lineal, no se añaden las variables crudas a una ecuación lineal en espacio real, sino que se añaden como parte de lo que se llama un "balance" entre diferentes GPs, es decir, como parte de un tipo particular de *log-contrast*. A

continuación, se realiza una regresión de Lasso con estos balances para buscar las variables más informativas que predigan la prevalencia de enfermedad cardiovascular arterial. Las interacciones no lineales entre los GPs y su asociación con la prevalencia de enfermedad cardiovascular se estimaron mediante *thin plate splines* bivariados (Wood, 2017). Este método puede ofrecer mayor flexibilidad que los balances mencionados, pero no puede emplearse para balances que incluyan más de dos GPs. La asociación entre GPs y la prevalencia en enfermedad cardiovascular se expresó como *odds ratios* con su correspondiente intervalo de confianza al 95%.

Para valorar la capacidad predictiva de los GPs o sus balances se calculó el área bajo la curva (AUC) de *receiver operating characteristics* (ROC). Las curvas ROC y su AUC, con sus intervalos de confianza al 95%, se calcularon con el paquete estadístico pROC de R. El resto de análisis estadísticos de este apartado se realizaron también en R (R core team, 2021), mediante los recursos (*packages*) *compositional* (Tsagris and Athineou, 2022), *compositions* (van den Boogaart et al., 2022), *robCompositions* (Filzmoser et al., 2018), y *mgcv* (Wood, 2017).

4. RESULTADOS

4.1. Correlación entre los diferentes *N*-glicanos

La correlación entre los 46 GPs del cromatograma en la muestra estudiada se representa en la Figura 10. Visualmente se observa cómo la abundancia de los GPs tendió a asociarse directamente con la de los GPs más próximos entre sí en el cromatograma.

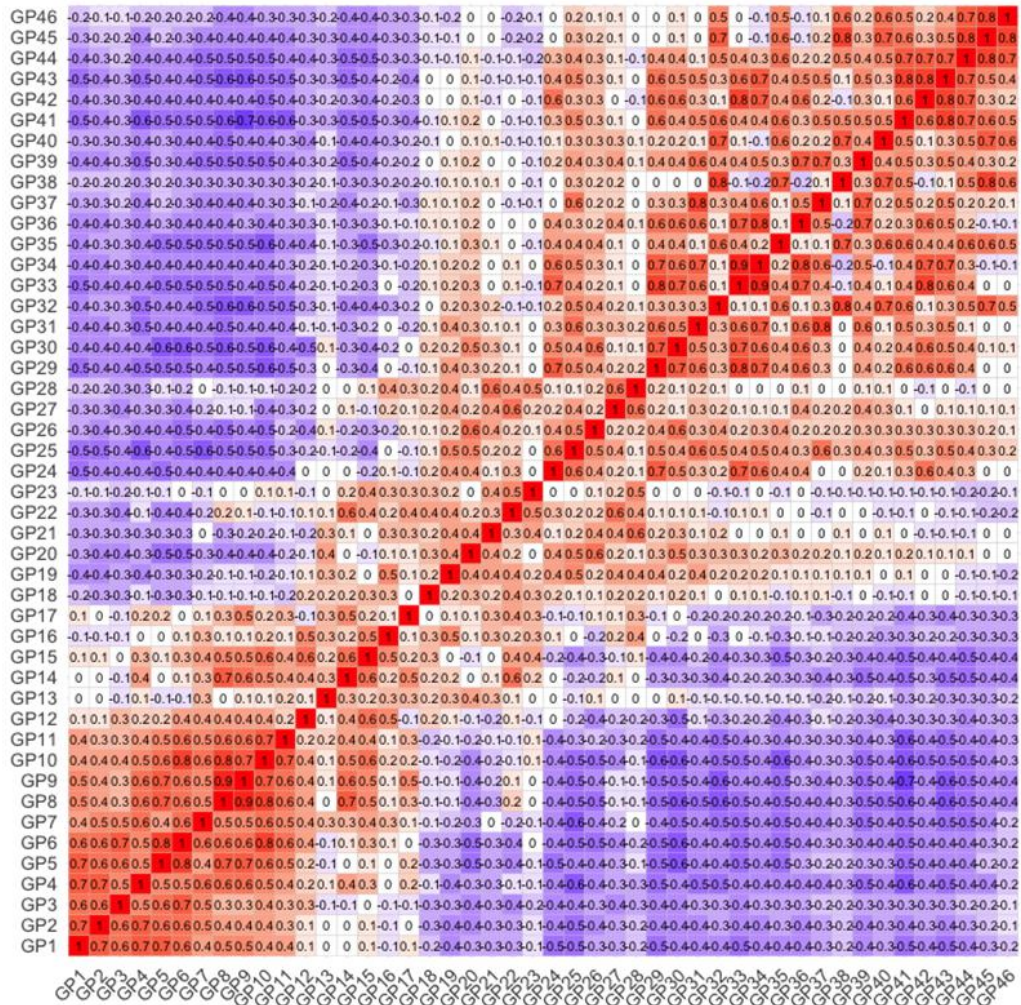


Figura 10. Matriz de correlaciones de la abundancia de los 46 GPs (en porcentaje). Los coeficientes de correlación han sido calculados con el test de rangos de Spearman, tras la transformación de los datos en coordenadas *ilr* (*isometric log-ratios*).

La correlación entre los *N*-glicanos, agrupados por sus datos morfológicos comunes (sialilación, galactosilación, ramificación, fucosilación, oligomanosa) se representa en forma de matriz en la Figura 11.

La ramificación escasa se asoció con baja sialilación, baja galactosilación y core-fucosilación. Viceversa, la elevada ramificación se asoció con alta galactosilación, sialilación y fucosilación externa, propia de estructuras complejas, en consonancia con la estructura general de los *N*-glicanos, representada en la Figura 1. De modo similar, las formas oligomanosa estuvieron asociadas con las formas de *N*-glicano más sencillas (Figura 11).

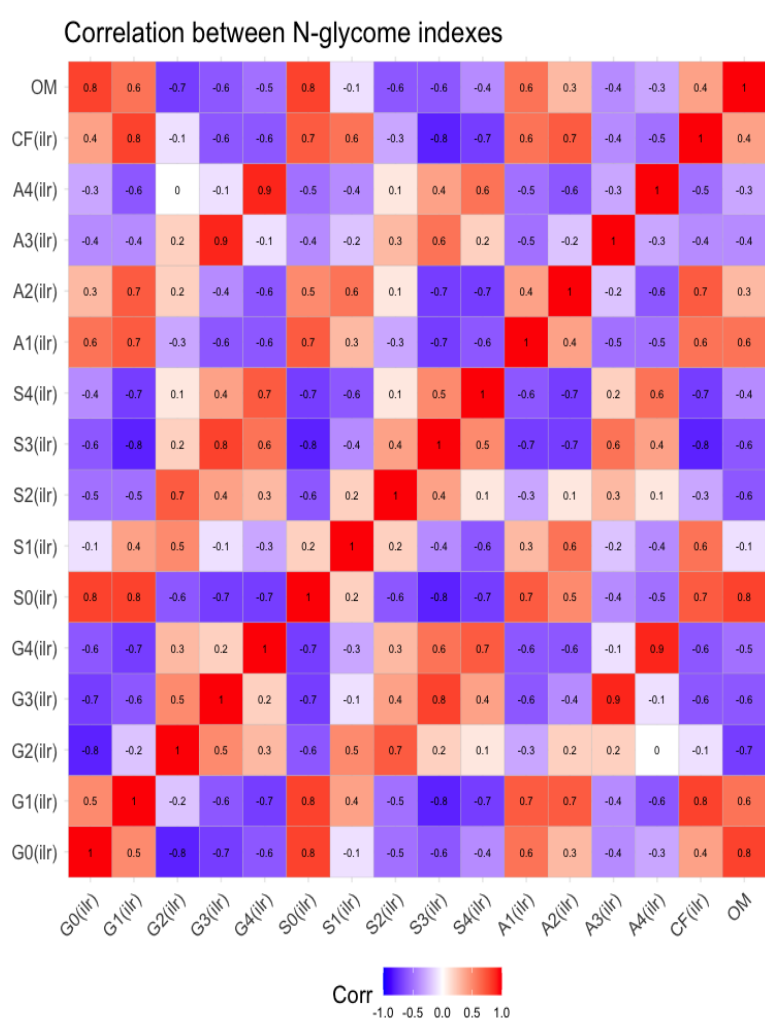


Figura 11. Matriz de correlaciones entre las diferentes agrupaciones de *N*-glicanos. Los coeficientes de correlación han sido calculados con el test de rangos de Spearman, tras la transformación de los datos en coordenadas *ilr* (*isometric log-ratios*), apropiadas para poder utilizar datos composicionales. G, galactosilación (G0 a-, G1 mono-, G2 di-, G3 tri-, G4 tetra-galactosilados); S, sialilación (S0 a-, S1 mono-, S2 di-, S3 tri-, S4 tetra-sialilados); A, antenas (ramificación: A1 mono-, A2 di-, A3 tri-, A4 tetra-antenas); F, fucosilación; CF, core-fucosilación; OM, oligomanosa.

Tabla 4. Picos de glicanos (*glycan peaks*, GP) en hombres y mujeres

| Pico de glicano (%) | Muestra total (n=1516) | Mujeres (n=838) | Hombres (n=678) | p-valor |
|---------------------|------------------------|----------------------|----------------------|---------|
| GP1 | 0.12 [0.08, 0.17] | 0.11 [0.08, 0.16] | 0.12 [0.09, 0.17] | 0.017 |
| GP2 | 0.04 [0.03, 0.06] | 0.04 [0.03, 0.06] | 0.04 [0.03, 0.06] | <0.001 |
| GP3 | 0.08 [0.05, 0.13] | 0.08 [0.05, 0.13] | 0.08 [0.05, 0.13] | 0.503 |
| GP4 | 0.07 [0.05, 0.10] | 0.07 [0.05, 0.10] | 0.07 [0.05, 0.10] | 0.503 |
| GP5 | 2.30 [1.63, 3.36] | 2.24 [1.58, 3.36] | 2.39 [1.72, 3.33] | 0.029 |
| GP6 | 1.03 [0.82, 1.41] | 1.03 [0.82, 1.40] | 1.02 [0.81, 1.42] | 0.619 |
| GP7 | 0.10 [0.07, 0.13] | 0.10 [0.07, 0.13] | 0.09 [0.07, 0.13] | 0.052 |
| GP8 | 1.91 [1.53, 2.51] | 1.91 [1.55, 2.50] | 1.92 [1.49, 2.53] | 0.946 |
| GP9 | 1.05 [0.82, 1.37] | 1.05 [0.82, 1.35] | 1.04 [0.81, 1.39] | 0.909 |
| GP10 | 0.67 [0.54, 0.87] | 0.68 [0.55, 0.86] | 0.66 [0.52, 0.89] | 0.078 |
| GP11 | 0.58 [0.48, 0.71] | 0.58 [0.48, 0.71] | 0.58 [0.47, 0.71] | 0.574 |
| GP12 | 0.32 [0.24, 0.41] | 0.32 [0.24, 0.42] | 0.31 [0.24, 0.41] | 0.091 |
| GP13 | 0.08 [0.06, 0.10] | 0.08 [0.06, 0.10] | 0.08 [0.06, 0.10] | 0.646 |
| GP14 | 2.74 [2.23, 3.41] | 2.78 [2.25, 3.48] | 2.68 [2.21, 3.29] | 0.037 |
| GP15 | 0.50 [0.40, 0.63] | 0.51 [0.41, 0.64] | 0.49 [0.40, 0.61] | 0.017 |
| GP16 | 1.03 [0.90, 1.19] | 1.05 [0.91, 1.21] | 1.01 [0.88, 1.16] | 0.002 |
| GP17 | 1.05 [0.88, 1.21] | 1.04 [0.88, 1.20] | 1.07 [0.88, 1.23] | 0.104 |
| GP18 | 0.18 [0.14, 0.22] | 0.18 [0.14, 0.22] | 0.18 [0.13, 0.21] | 0.054 |
| GP19 | 7.52 [6.91, 8.15] | 7.56 [6.93, 8.17] | 7.46 [6.88, 8.13] | 0.664 |
| GP20 | 0.65 [0.58, 0.71] | 0.65 [0.58, 0.71] | 0.65 [0.58, 0.71] | 0.579 |
| GP21 | 1.29 [1.12, 1.46] | 1.27 [1.10, 1.43] | 1.30 [1.13, 1.49] | 0.024 |
| GP22 | 5.97 [5.24, 6.96] | 5.97 [5.20, 7.17] | 5.97 [5.26, 6.83] | 0.336 |
| GP23 | 2.75 [2.27, 3.45] | 2.85 [2.34, 3.57] | 2.66 [2.18, 3.31] | <0.001 |
| GP24 | 4.48 [3.99, 4.97] | 4.50 [4.03, 5.00] | 4.42 [3.95, 4.93] | 0.066 |
| GP25 | 31.52 [29.24, 33.59] | 31.31 [29.20, 33.23] | 31.76 [29.27, 33.83] | 0.244 |
| GP26 | 1.41 [1.23, 1.60] | 1.42 [1.23, 1.59] | 1.40 [1.24, 1.60] | 0.946 |
| GP27 | 5.40 [4.65, 6.15] | 5.29 [4.61, 5.96] | 5.53 [4.74, 6.35] | 0.001 |
| GP28 | 3.16 [2.67, 3.77] | 3.12 [2.66, 3.67] | 3.20 [2.71, 3.87] | 0.037 |
| GP29 | 1.81 [1.54, 2.07] | 1.88 [1.63, 2.10] | 1.71 [1.45, 1.99] | <0.001 |
| GP30 | 0.30 [0.24, 0.36] | 0.31 [0.25, 0.37] | 0.28 [0.23, 0.35] | <0.001 |
| GP31 | 1.06 [0.89, 1.23] | 1.11 [0.94, 1.27] | 0.98 [0.84, 1.16] | <0.001 |
| GP32 | 0.62 [0.51, 0.74] | 0.59 [0.48, 0.70] | 0.66 [0.55, 0.78] | <0.001 |
| GP33 | 0.96 [0.81, 1.12] | 0.98 [0.85, 1.15] | 0.91 [0.76, 1.08] | <0.001 |
| GP34 | 6.11 [5.02, 7.29] | 6.54 [5.45, 7.58] | 5.49 [4.45, 6.65] | <0.001 |
| GP35 | 0.44 [0.36, 0.54] | 0.42 [0.35, 0.52] | 0.47 [0.38, 0.56] | <0.001 |
| GP36 | 0.57 [0.46, 0.72] | 0.63 [0.51, 0.78] | 0.51 [0.41, 0.62] | <0.001 |
| GP37 | 1.76 [1.44, 2.15] | 1.81 [1.49, 2.19] | 1.69 [1.39, 2.05] | <0.001 |
| GP38 | 3.24 [2.32, 4.21] | 2.73 [1.97, 3.72] | 3.79 [2.94, 4.79] | <0.001 |
| GP39 | 0.45 [0.38, 0.54] | 0.46 [0.39, 0.55] | 0.45 [0.38, 0.52] | 0.054 |
| GP40 | 0.41 [0.32, 0.53] | 0.39 [0.30, 0.50] | 0.44 [0.34, 0.57] | <0.001 |
| GP41 | 0.45 [0.38, 0.53] | 0.46 [0.38, 0.54] | 0.45 [0.38, 0.52] | 0.263 |
| GP42 | 0.28 [0.22, 0.36] | 0.30 [0.24, 0.38] | 0.27 [0.21, 0.34] | <0.001 |
| GP43 | 0.42 [0.35, 0.49] | 0.43 [0.37, 0.51] | 0.40 [0.34, 0.47] | <0.001 |
| GP44 | 0.22 [0.18, 0.27] | 0.22 [0.17, 0.27] | 0.23 [0.18, 0.28] | 0.034 |
| GP45 | 0.25 [0.19, 0.32] | 0.23 [0.17, 0.29] | 0.28 [0.22, 0.34] | <0.001 |
| GP46 | 0.16 [0.12, 0.22] | 0.15 [0.11, 0.20] | 0.18 [0.13, 0.24] | <0.001 |

Pie de la tabla en la página anterior (Tabla 4): Los datos son medianas e intervalos intercuartil (entre corchetes). Se representan los datos crudos (en porcentaje de abundancia), aunque para las comparaciones estadísticas fueron transformados en *isometric log-ratios* (ilr). Los valores de P se obtuvieron con el test de Mann-Whitney con la corrección de Benjamini. Los GPs destacados en verde reflejan una significativa mayor abundancia en hombres. Los GPs destacados en rojo-anaranjado reflejan una significativa mayor abundancia en mujeres.

4.2. Comparación del N-glicoma entre hombres y mujeres

El test multivariante composicional de equivalencia mostró que, en conjunto, los hombres y las mujeres no tienen el mismo perfil de N-glicanos (estadístico Mn =195.1, P<0.001). La comparación de los 46 picos de N-glicanos individuales (GPs) entre hombres y mujeres, una vez transformados los datos en coordenadas ilr, mostró diferencias significativas entre hombres y mujeres (Tabla 4). La mayor parte de las diferencias, en un sentido o en el otro, se observaron en los N-glicanos de alta complejidad (a la derecha del cromatograma, Tabla 4).

La comparación de las agrupaciones de GPs por su morfología (galactosilación, sialilación, ramificación, fucosilación, oligomanosa) entre hombres y mujeres se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Agrupaciones-tipo de N-glicanos en hombres y mujeres.

| Tipo de glicano (%) | Muestra total (n=1516) | Mujeres (n=838) | Hombres (n=678) | P-valor |
|---------------------|------------------------|----------------------|----------------------|---------|
| G0 | 3.19 [2.40, 4.53] | 3.14 [2.37, 4.50] | 3.25 [2.47, 4.55] | 0.262 |
| G1 | 6.95 [6.05, 8.26] | 6.97 [6.12, 8.10] | 6.95 [6.01, 8.39] | 0.088 |
| G2 | 67.98 [65.43, 69.98] | 67.79 [65.20, 69.91] | 68.22 [65.75, 70.05] | 0.112 |
| G3 | 13.48 [11.54, 15.41] | 14.14 [12.36, 15.89] | 12.58 [10.70, 14.47] | <0.001 |
| G4 | 6.22 [5.09, 7.58] | 5.84 [4.72, 6.95] | 6.78 [5.68, 8.17] | <0.001 |
| A1 | 1.08 [0.95, 1.22] | 1.07 [0.95, 1.21] | 1.09 [0.96, 1.24] | 0.878 |
| A2 | 77.76 [75.70, 79.82] | 77.59 [75.59, 79.58] | 78.02 [75.87, 79.94] | 0.033 |
| A3 | 13.48 [11.54, 15.41] | 14.14 [12.36, 15.89] | 12.58 [10.70, 14.47] | <0.001 |
| A4 | 6.22 [5.09, 7.58] | 5.84 [4.72, 6.95] | 6.78 [5.68, 8.17] | <0.001 |
| S0 | 11.83 [9.82, 14.69] | 11.86 [9.95, 14.58] | 11.64 [9.64, 14.89] | 0.461 |
| S1 | 21.15 [19.48, 22.85] | 21.25 [19.62, 23.02] | 20.99 [19.27, 22.55] | 0.134 |
| S2 | 49.50 [47.16, 51.29] | 49.28 [47.09, 51.02] | 49.81 [47.49, 51.79] | 0.024 |
| S3 | 14.87 [13.06, 16.59] | 14.94 [13.29, 16.65] | 14.75 [12.87, 16.49] | 0.461 |
| S4 | 1.82 [1.50, 2.13] | 1.82 [1.49, 2.13] | 1.82 [1.54, 2.14] | 0.461 |
| CF | 30.44 [27.23, 33.93] | 30.40 [27.27, 33.77] | 30.47 [27.08, 34.19] | 1.000 |
| OF | 2.67 [2.28, 3.12] | 2.67 [2.28, 3.14] | 2.66 [2.28, 3.11] | 1.000 |
| OM | 1.10 [0.91, 1.40] | 1.09 [0.92, 1.40] | 1.10 [0.91, 1.40] | 1.000 |

Los datos son medianas e intervalos intercuartil (entre corchetes). G, galactosilación (G0 a-, G1 mono-, G2 di-, G3 tri-, G4 tetra-galactosilados). A, antenas (ramificación: A1 mono-, A2 di-, A3 tri-, A4 tetra-*antenas*). S, sialilación (S0 a-, S1 mono-, S2 di-, S3 tri-, S4 tetra-sialilados). F, fucosilación (CF, *core*-fucosilación; OF [*outer arm*], fucosilación externa). OM, oligomanosa. Se representan los datos crudos (en porcentaje de abundancia), aunque para las comparaciones estadísticas fueron transformados en *isometric log-ratios* (ilr). Las agrupaciones de fucosilación y oligomanosa fueron tratados como variables aleatorias con dominio restringido (0,1). Los valores de P se obtuvieron con el test de Mann-Whitney con la corrección de Benjamini. Los GPs destacados en verde reflejan una significativa mayor abundancia en hombres. Los GPs destacados en rojo-anaranjado reflejan una significativa mayor abundancia en mujeres.

En cuanto a la galactosilación, hubo diferencias entre hombres y mujeres en la tasa de *N*-glicanos trigalactosilados (G3, mayor en mujeres) y tetragalactosilados (G4, mayor en hombres) (Tabla 5). De modo similar en la ramificación, las mujeres mostraron una mayor proporción de *N*-glicanos triantenados (A3), mientras que los hombres mostraron mayor proporción de *N*-glicanos bi- y tetraantenados (A2 y A4; Tabla 5). En cuanto a la sialilación, la tasa de *N*-glicanos disialilados (S2) fue mayor en hombres que en mujeres, sin observarse diferencias significativas en el resto de perfiles (Tabla 5). No se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres en la proporción de las diferentes formas de fucosilación o de oligomanosa (Tabla 5).

4.3. Efecto de la edad en el *N*-glicoma en hombres y mujeres

La evolución de los 46 picos de *N*-glicanos individuales (GPs) con la edad en hombres y en mujeres se representa en la Figura 12 y en la Figura 13. La evolución y las diferencias entre sexos en el tiempo en los 46 GPs puede resumirse como sigue, en seis patrones o grupos:

Grupo 1: GPs de inicio más bajos en mujeres pero que aumentan su abundancia con el paso de los años a más ritmo en este sexo, de modo que en edades avanzadas o bien se igualan a los hombres o acaban teniendo mayores concentraciones que éstos. Son los GP1, GP2, GP3, GP5, GP32, GP40, GP41, GP44, GP45 y GP46.

Grupo 2: GPs que comienzan con mayor abundancia en mujeres, pero que con el paso de los años los hombres acaban teniendo igual o mayor abundancia que las mujeres. Puede ser porque aumentan más rápido en los hombres con el paso de los años, o bien porque disminuyan más rápido en las mujeres con los años. En algunos casos, aumentan en los hombres con el paso de los años (GP7, GP10, GP15, GP16 y GP23) y los que bajan (GP14, GP22 y GP24).

Grupo 3: GPs que son similares en ambos sexos en edades jóvenes, pero que aumentan más en mujeres con el paso de los años (GP39 y GP43).

Grupo 4: GPs que son más abundantes en uno de los sexos, independientemente de la edad. Son los GP29, GP30, GP31, GP33, GP34, GP36 y GP42 (mayores en mujeres), y GP35 y GP38 (mayores en hombres).

Grupo 5: GPs cuya abundancia aumenta o desciende con el paso de los años, pero sin claras diferencias entre hombres y mujeres. Son los GP6, GP11, GP26, GP28 y GP37 (aumentan con los años) y los GP8, GP9, GP18 y GP13 (descienden con los años).

Grupo 6: GPs cuyo perfil no encaja en ninguno de los grupos anteriores (GP4, GP12, GP17, GP19, GP20, GP21, GP25 y GP27).

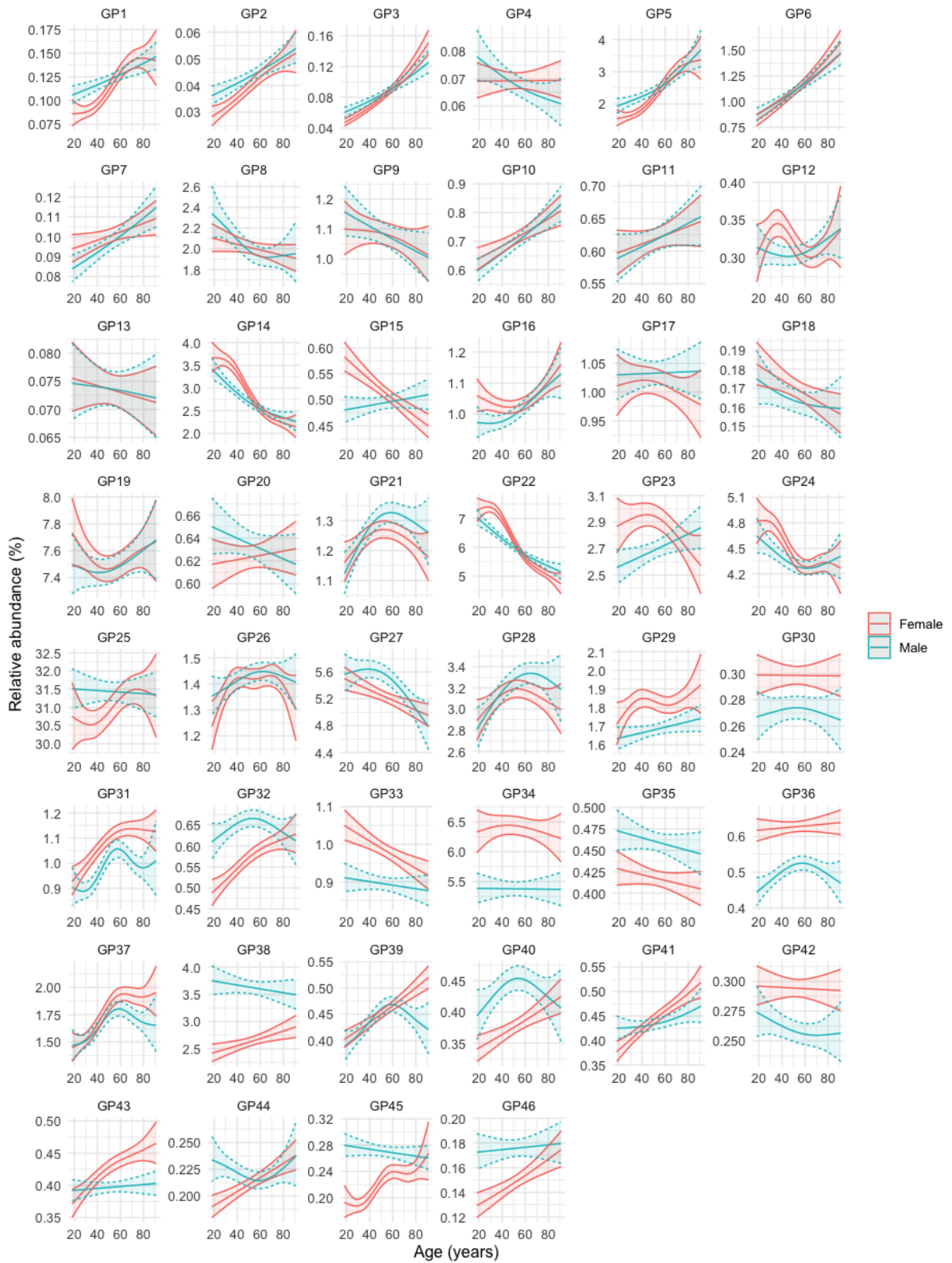


Figura 12. Abundancia de los picos de glicanos (GP) en relación a la edad y sexo. Para cada GP se representa la abundancia relativa media en hombres y mujeres tras la transformación de los datos en *ilr* (*isometric log-ratios*), con su intervalo de confianza al 95%. Las curvas se obtuvieron mediante modelos de regresión aditiva generalizada con un predictor factor por curva, estimando un efecto suave de la edad (mediante funciones *spline*) para hombres y mujeres. Los ajustes se obtuvieron en la escala *ilr* y los resultados fueron expresados en la escala real tras aplicar su función inversa.

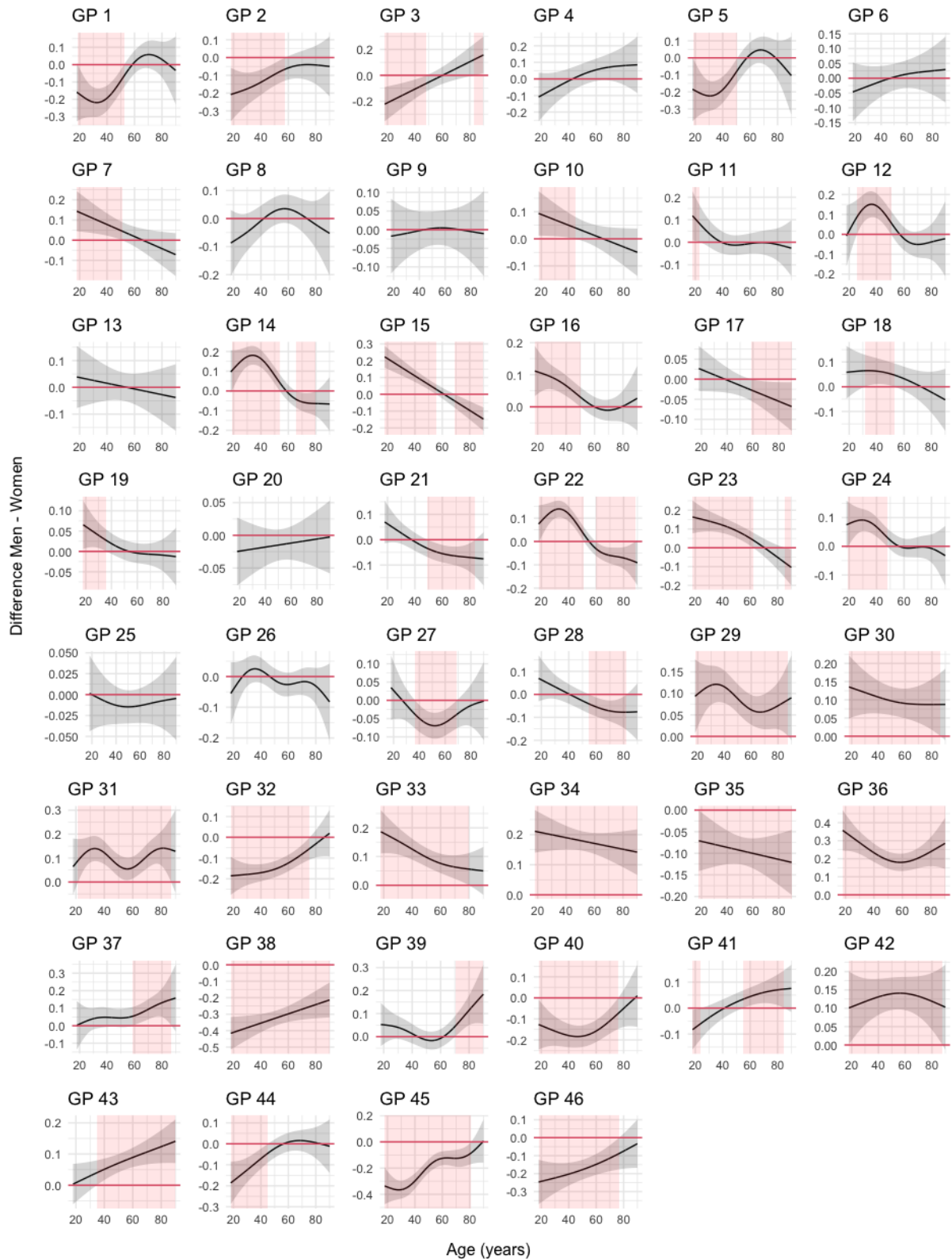


Figura 13. Abundancia de 46 picos de glicanos (GP) en relación a edad y sexo. Para cada GP se representa la diferencia entre hombres y mujeres tras la transformación de los datos en *ilr* (*isometric log-ratios*), con su intervalo de confianza al 95%. Los segmentos sombreados en rosa corresponden a las edades con diferencia significativa entre hombres y mujeres. Las curvas se obtuvieron mediante modelos de regresión aditiva generalizada con un predictor factor por curva, estimando un efecto suave de la edad (mediante funciones *spline*) para hombres y mujeres. Los ajustes se obtuvieron en la escala *ilr* y los resultados fueron expresados en la escala real tras aplicar su función inversa.

Tabla 6. Agrupaciones-tipo de N-glicanos en hombres y mujeres, estratificados en grupos de edad

| Grupo (%) | | 18-40 años | 41-60 años | 61-90 años | p-valor |
|-----------|---------|---------------------|---------------------|---------------------|---------|
| G0 | Mujeres | 2.45 [1.88,3.25] | 2.99 [2.34,4.17] | 3.98 [3.04,5.47] | <0.001 |
| | Hombres | 2.90 [2.22,4.08] | 3.06 [2.41,4.15] | 3.90 [2.95,5.30] | <0.001 |
| G1 | Mujeres | 6.95 [6.05,7.84] | 7.04 [6.22,8.10] | 6.95 [6.05,8.29] | <0.001 |
| | Hombres | 7.01 [6.09,8.54] | 6.72 [5.80,8.27] | 7.03 [6.10,8.35] | <0.001 |
| G2 | Mujeres | 69.52 [67.24,71.24] | 67.88 [65.34,70.05] | 66.70 [64.19,68.49] | <0.001 |
| | Hombres | 69.53 [66.98,70.98] | 67.99 [65.60,69.64] | 67.61 [65.52,69.36] | <0.001 |
| G3 | Mujeres | 13.84 [12.15,15.76] | 14.12 [12.46,15.75] | 14.25 [12.41,16.13] | <0.001 |
| | Hombres | 12.20 [10.39,13.88] | 13.14 [11.19,14.99] | 12.63 [10.83,14.48] | 0.035 |
| G4 | Mujeres | 5.48 [4.42,6.57] | 5.74 [4.71,6.96] | 6.10 [5.04,7.27] | 0.945 |
| | Hombres | 6.61 [5.71,7.80] | 7.10 [5.79,8.39] | 6.69 [5.60,8.02] | 0.052 |
| A1 | Mujeres | 1.00 [0.89,1.14] | 1.09 [0.96,1.24] | 1.12 [0.99,1.30] | 0.006 |
| | Hombres | 1.04 [0.93,1.17] | 1.09 [0.97,1.23] | 1.17 [1.03,1.35] | <0.001 |
| A2 | Mujeres | 79.36 [77.16,81.48] | 78.45 [76.37,80.52] | 78.13 [76.18,79.99] | <0.001 |
| | Hombres | 79.76 [77.37,81.75] | 78.38 [75.96,80.80] | 79.03 [76.86,81.11] | <0.001 |
| A3 | Mujeres | 13.97 [12.26,15.91] | 14.25 [12.67,16.02] | 14.45 [12.59,16.32] | 0.240 |
| | Hombres | 12.34 [10.56,14.03] | 13.23 [11.32,15.17] | 12.83 [11.02,14.68] | 0.308 |
| A4 | Mujeres | 5.56 [4.49,6.63] | 5.82 [4.76,7.05] | 6.17 [5.12,7.35] | 0.093 |
| | Hombres | 6.68 [5.78,7.90] | 7.16 [5.85,8.47] | 6.76 [5.67,8.12] | 0.180 |
| S0 | Mujeres | 11.66 [9.88,13.68] | 11.75 [9.82,14.48] | 12.10 [10.10,15.07] | 0.760 |
| | Hombres | 11.86 [9.92,15.07] | 11.17 [9.30,13.99] | 12.08 [9.89,15.03] | 0.074 |
| S1 | Mujeres | 22.28 [20.80,24.17] | 21.25 [19.75,23.06] | 20.40 [18.97,22.08] | <0.001 |
| | Hombres | 21.42 [19.95,22.90] | 20.60 [18.99,22.35] | 20.66 [19.13,22.48] | 0.011 |
| S2 | Mujeres | 49.00 [46.69,50.56] | 49.17 [47.09,50.96] | 49.65 [47.14,51.43] | 0.196 |
| | Hombres | 49.53 [47.28,51.62] | 50.00 [48.05,52.01] | 49.58 [47.32,51.75] | 0.323 |
| S3 | Mujeres | 14.55 [12.82,16.27] | 15.02 [13.41,16.65] | 15.21 [13.64,16.78] | 0.433 |
| | Hombres | 14.27 [12.75,16.10] | 15.20 [13.38,17.26] | 14.69 [12.96,16.21] | 0.001 |
| S4 | Mujeres | 1.73 [1.40,2.01] | 1.84 [1.47,2.11] | 1.91 [1.57,2.24] | <0.001 |
| | Hombres | 1.78 [1.57,2.13] | 1.85 [1.54,2.15] | 1.81 [1.49,2.14] | 0.786 |
| CF | Mujeres | 31.59 [28.82,34.93] | 30.44 [27.90,33.55] | 29.04 [26.07,33.13] | <0.001 |
| | Hombres | 31.26 [27.85,35.13] | 29.56 [26.71,33.87] | 30.43 [27.05,33.58] | 0.067 |
| OF | Mujeres | 2.33 [1.98,2.75] | 2.69 [2.33,3.15] | 2.85 [2.46,3.31] | <0.001 |
| | Hombres | 2.48 [2.14,2.92] | 2.77 [2.39,3.22] | 2.72 [2.33,3.16] | <0.001 |
| OM | Mujeres | 1.01 [0.84,1.20] | 1.07 [0.90,1.34] | 1.19 [1.01,1.52] | <0.001 |
| | Hombres | 1.02 [0.83,1.31] | 1.05 [0.88,1.31] | 1.20 [1.00,1.53] | <0.001 |

Los datos son medianas e intervalos intercuartil (entre corchetes). G, galactosilación (G0 a-, G1 mono-, G2 di-, G3 tri-, G4 tetra-galactosilados). S, sialilación (S0 a-, S1 mono-, S2 di-, S3 tri-, S4 tetra-sialilados). A, antenas (ramificación: A1 mono-, A2 di-, A3 tri-, A4 tetra-*antenas*). F, fucosilación (CF, *core*; OF [*outer*], externa). OM, oligomanosa. Se representan los datos crudos (en porcentaje de abundancia), aunque para las comparaciones estadísticas fueron transformados en *isometric log-ratios* (ilr). Las agrupaciones de fucosilación y oligomanosa no se trataron de datos composicionales y fueron tratados como variables aleatorias con dominio restringido (0,1). Los valores de P se han obtenido con el test de Kruskal-Wallis con la corrección de Benjamini.

En lo concerniente a las agrupaciones de N-glicanos por su morfología común, destaca:

En lo que respecta a la galactosilación, la abundancia de formas agalactosiladas (G0) aumentó claramente con la edad, en ambos sexos (Tabla 6). En las edades más jóvenes fueron ligeramente

mayores en hombres que en mujeres, para igualarse posteriormente hasta edades avanzadas (Figura 6). Estas formas G0 son las minoritarias, sin embargo, en todos los segmentos de edad y sexo (Tabla 6).

Las formas monogalactosiladas (G1) se comportaron de modo similar en hombres y en mujeres, permaneciendo estables o con un ligero aumento con la edad en ambos sexos (Tabla 6, Figura 14).

Las formas digalactosiladas (G2) siguieron un curso inverso a las G0, con un claro descenso con la edad en ambos sexos, siendo ligeramente mayores en mujeres que en hombres en las edades más jóvenes, para igualarse posteriormente y siendo ligeramente más abundantes en los hombres en edad avanzadas (Figura 14). Estas formas G2 son las mayoritarias en todos los segmentos de edad y sexo (Tabla 6).

Las formas trigalactosiladas (G3) aumentaron ligeramente con la edad en ambos sexos (Tabla 6), de forma paralela, pero siempre en mayor abundancia en mujeres que en hombres (Figura 6) de ahí que, en conjunto, sean más abundantes en mujeres que en hombres (Tabla 5).

Las formas tetragalactosiladas (G4), relativamente infrecuentes, tendieron a aumentar con el paso de los años en las mujeres, pero no en los hombres (Tabla 6, Figura 14). La abundancia en hombres se mantuvo estable a lo largo de los años, pero siempre a un nivel superior a la de las mujeres, salvo en edades avanzadas, en las que tienden a igualarse (Tabla 6, Figura 14), de ahí que, en conjunto, sean más abundantes en hombres que en mujeres (Tabla 5).

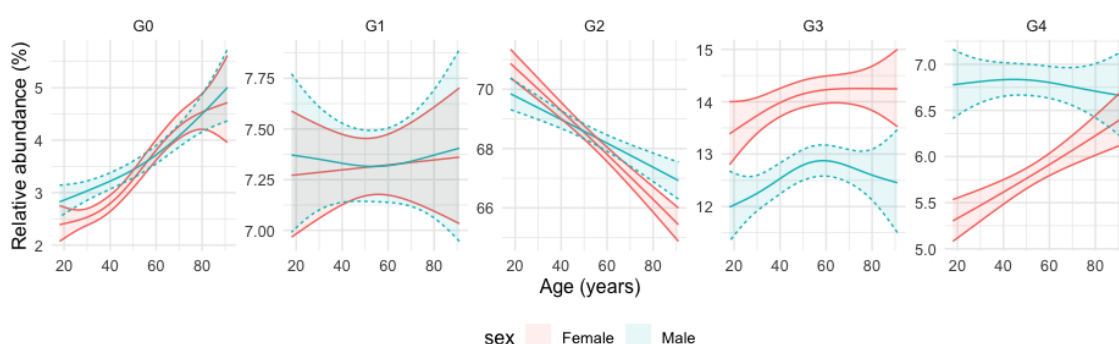


Figura 14. Abundancia de *N*-glicanos según su galactosilación (G0 a-, G1 mono-, G2 di-, G3 tri-, G4 tetra-galactosilados) en relación a la edad en los hombres y mujeres del estudio. Se representa la abundancia relativa media (en porcentaje), con su intervalo de confianza al 95%. Las curvas se obtuvieron mediante modelos de regresión aditiva generalizada con un predictor factor por curva, estimando un efecto suave de la edad (mediante funciones *spline*) para hombres y mujeres. Los ajustes se obtuvieron en la escala *ilr* y los resultados fueron expresados en la escala real tras aplicar su función inversa.

La ramificación fue bastante paralela a la glicosilación, como era esperable dada la estructura general de los *N*-glicanos. Las formas monoanténarias (A1) aumentaron progresivamente con la edad en hombres y en mujeres (Tabla 6), sin diferencias entre ambos (Figura 15). Estas formas A1 son las minoritarias, sin embargo, en todos los segmentos de edad y sexo (Tabla 6).

Las formas bianténarias (A2), las más abundantes, tendieron a disminuir con el paso de los años, tanto en hombres como en mujeres, aunque en estas últimas de modo más lineal y progresivo, mientras que en los hombres tendieron a estabilizarse desde edades medias (Tabla 6, Figura 15), de ahí que, en conjunto, sean más abundantes en hombres que en mujeres (Tabla 5).

Las formas trianténarias (A3) no se modificaron significativamente con la edad (Tabla 6), con una tendencia paralela al aumento en ambos sexos, pero siempre se mostraron en mayor abundancia en mujeres que en hombres (Figura 15) de ahí que, en conjunto, sean más abundantes en mujeres que en hombres (Tabla 5).

Las formas tetraanténarias (A4), relativamente infrecuentes, tendieron a aumentar con el paso de los años en las mujeres, pero no en los hombres (Tabla 6, Figura 15). La abundancia en hombres se mantuvo estable a lo largo de los años, pero siempre a un nivel superior a la de las mujeres, salvo en edades avanzadas, en las que tendieron a igualarse (Tabla 6, Figura 15), de ahí que, en conjunto, sean más abundantes en hombres que en mujeres (Tabla 5).

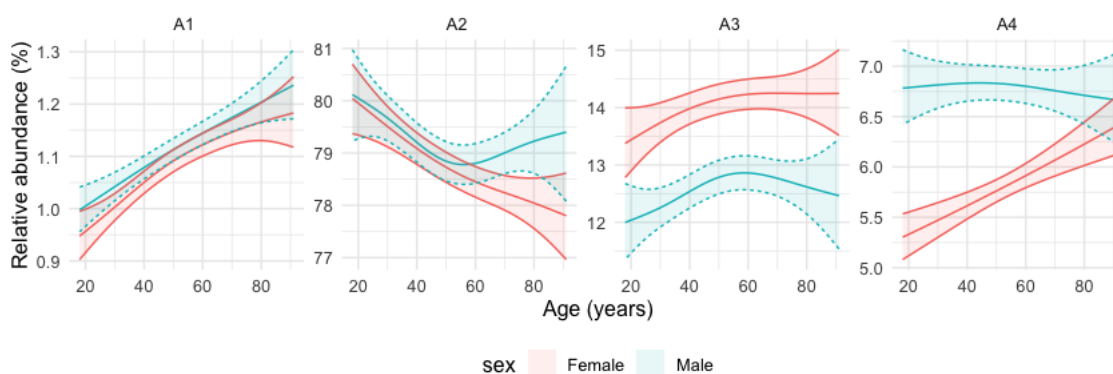


Figura 15. Abundancia de *N*-glicanos según su ramificación (A1 mono-, A2 di-, A3 tri-, A4 tetra-anténarios) en relación a la edad en los hombres y mujeres del estudio. Se representa la abundancia relativa media (en porcentaje), con su intervalo de confianza al 95%. Las curvas se obtuvieron mediante modelos de regresión aditiva generalizada con un predictor factor por curva, estimando un efecto suave de la edad (mediante funciones *spline*) para hombres y mujeres. Los ajustes se obtuvieron en la escala *ilr* y los resultados fueron expresados en la escala real tras aplicar su función inversa.

En lo que respecta a la sialilación, las formas asialiladas (S0) no se modificaron significativamente con el paso de los años, de modo similar en hombres y en mujeres (Tabla 6, Figura 16).

Las formas monosialiladas (S1) tendieron a disminuir con el paso de los años, aunque el cambio fue más significativo en mujeres (Tabla 6, Figura 16). En conjunto, no hubo diferencias significativas entre hombres y mujeres, aunque tendieron a ser mayores en mujeres en las primeras décadas y mayores en varones en las edades más avanzadas de la edad adulta (Figura 16).

Las formas disialiladas (S2), las más abundantes, fueron ligeramente mayores en los hombres que en las mujeres en el conjunto de edades (Tabla 5). No se observaron cambios significativos a lo largo de los años (Tabla 6, Figura 16).

En las formas trisialiladas (S3) se observó un incremento paralelo en hombres y en mujeres, que en éstas continuó hasta edad avanzadas, mientras que en los hombres se observó un descenso a partir de los 60 años, momento a partir del cual se observó un predominio en mujeres (Tabla 6, Figura 16).

Las formas tetrasialiladas (S4), las menos abundantes, tendieron a aumentar con el paso de los años en las mujeres y se mantuvieron estables en los hombres (Tabla 6, Figura 16). En conjunto, no hubo diferencias significativas entre hombres y mujeres, aunque tendieron a ser mayores en hombres en las primeras décadas y mayores en mujeres en las edades más avanzadas de la edad adulta (Figura 16).

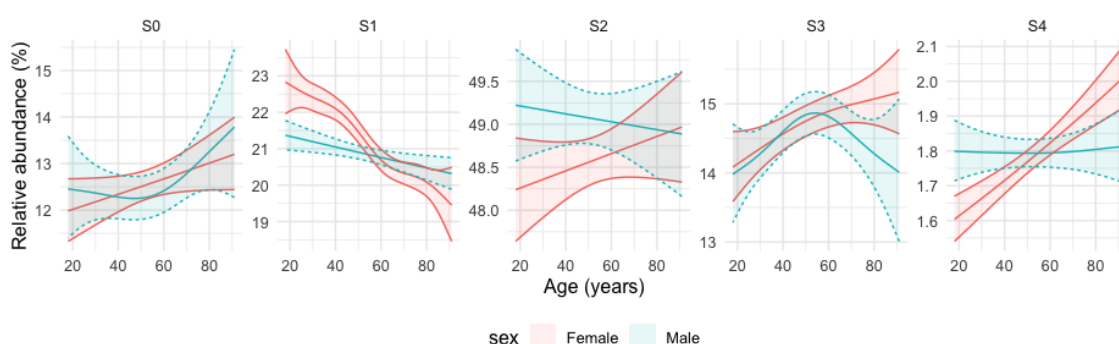


Figura 16. Abundancia de *N*-glicanos según su sialilación (S0 a-, S1 mono-, S2 di-, S3 tri-, S4 tetrasialilados), en relación a la edad en los hombres y mujeres del estudio. Se representa la abundancia relativa media (en porcentaje), con su intervalo de confianza al 95%. Las curvas se obtuvieron mediante modelos de regresión aditiva generalizada con un predictor factor por curva, estimando un efecto suave de la edad (mediante funciones *spline*) para hombres y mujeres. Los ajustes se obtuvieron en la escala ilr y los resultados fueron expresados en la escala real tras aplicar su función inversa.

En lo que respecta a la fucosilación, la forma central (core-fucosilación, la más abundante), disminuyó linealmente con la edad en ambos sexos, especialmente en las mujeres, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos (Tabla 3, Figura 9). La fucosilación periférica (*outer-arm*) se incrementó también de forma paralela en ambos sexos hasta edades intermedias en adultos, para después estabilizarse hasta edades avanzadas (Tabla 3, Figura 9).

Por último, las formas oligomanosa (también conocidas como *high-mannose*, de abundancia escasa, en conjunto) aumentaron de forma lineal en ambos sexos, de forma muy paralela entre ambos, sin diferencias significativas entre sexos (Tabla 3, Figura 9).

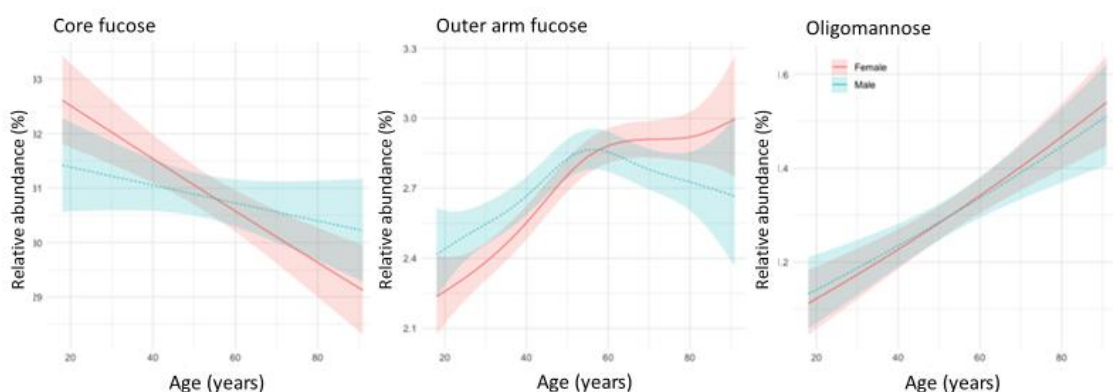


Figura 17. Abundancia de *N*-glicanos según su fucosilación (core-fucosa [CF] y fucosilación periférica [*outer-arm*, OF]) y según estructura de oligomanosa (*high mannose*, OM) en los hombres y mujeres del estudio. Para cada asociación se representa la abundancia relativa (en porcentaje) a lo largo de los años de edad en varones y en mujeres, con su intervalo de confianza al 95%. Las curvas se obtuvieron mediante regresión aditiva generalizada con un predictor factor por curva, estimando un efecto suave de la edad (mediante funciones *spline*) para hombres y mujeres. La respuesta de la regresión se modelizó como una variable de distribución beta (acotada entre 0 y 1).

En conjunto, los cambios en estas agrupaciones de *N*-glicanos por sus características comunes y las diferencias entre sexos en el tiempo pueden resumirse como sigue, en patrones o grupos:

Patrón de aumento con la edad en hombres y mujeres: ocurre con los *N*-glicanos sencillos como los agalactosilados (G0), mono-antenarios (A1), no-sialilados (S0, aunque no estadísticamente significativo en este caso), y oligomanosa (OM). También aumentan significativamente los *N*-glicanos con fucosilación periférica (*outer-arm*, OF), aunque éstos se estabilizan a partir de los 50 años.

Patrón de descenso con la edad en hombres y mujeres: ocurre con los *N*-glicanos digalactosilados (G2), biantenarios (A2, aunque se estabiliza en hombres desde edades medias), monosialilados (S1, aunque más significativo en mujeres) y core-fucosilados (CF).

Patrón de aumento con la edad en mujeres, mientras que en los hombres la abundancia permanece estable a un nivel superior, que tiende a igualarse con las mujeres en edades avanzadas: ocurre con los tetragalactosilados (G4) y tetra-antenarios (A4).

Patrón de aumento en ambos sexos con la edad, aunque siempre a un mayor nivel de abundancia en mujeres: ocurre con los trigalactosilados (G3) y triantenarios (A3, en este caso sin aumento significativo con la edad).

Patrón que incluye un cambio diferente entre los hombres y mujeres a partir de edades medias (posiblemente coincidente con la menopausia en la mujer): ocurre con trisialilados (S3, descenso en los hombres, ascenso continuo en las mujeres), y biantenarios (A2, estabilización a esa edad en los hombres, continuo descenso en las mujeres).

Por último, hay tipos de *N*-glicanos en los que hay diferencias entre hombres y mujeres hasta edades medias: incluye los G0 y S4 (mayores en hombres), y los G2 y S1 (mayores en mujeres).

4.4. Análisis de componentes principales y definición de *clusters*

En el análisis de componentes principales (PCA), la variabilidad de los *N*-glicanos (GPs) se describió adecuadamente mediante tres componentes (dimensiones) que contienen más del 60% de la varianza de las variables originales. Las dimensiones 1 y 2 explican por sí mismas más del 50% de esa varianza. El gráfico correspondiente se representa en la Figura 18.

La contribución de las variables (GPs) a las dos primeras dimensiones del PCA se representa, en porcentaje, en la Figura 19. El biplot correspondiente se representa en la Figura 20. La primera dimensión de la PCA contiene, fundamentalmente, información sobre *N*-glicanos sencillos (en su gran mayoría, mono- o biantenarios, no sialilados y agalactosilados o monogalactosilados). Estos *N*-glicanos, que representan la mayor contribución a esta dimensión, son los 11 primeros GPs del espectro cromatográfico (GP1 al 11, Figuras 19 y 20). Una alta proporción de esos 11 primeros GPs está asociada con un bajo valor en esta dimensión. Por otro lado, otros *N*-glicanos más complejos (GP 38, GP 40, GP 44 al 46, los últimos del espectro cromatográfico) se asociaron un alto valor en esta dimensión (Figura 20). Así pues, esta dimensión contiene información de los *N*-glicanos más simples y los más complejos. Específicamente, los valores altos en esta

La interpretación de las restantes dimensiones es más compleja. Por ejemplo, la dimensión 2 contiene información de los últimos GPS del espectro cromatográfico, más complejos, pero también información de GP2, GP3, GP13, GP14, GP15 y GP 18 (Figuras 19 y 20).

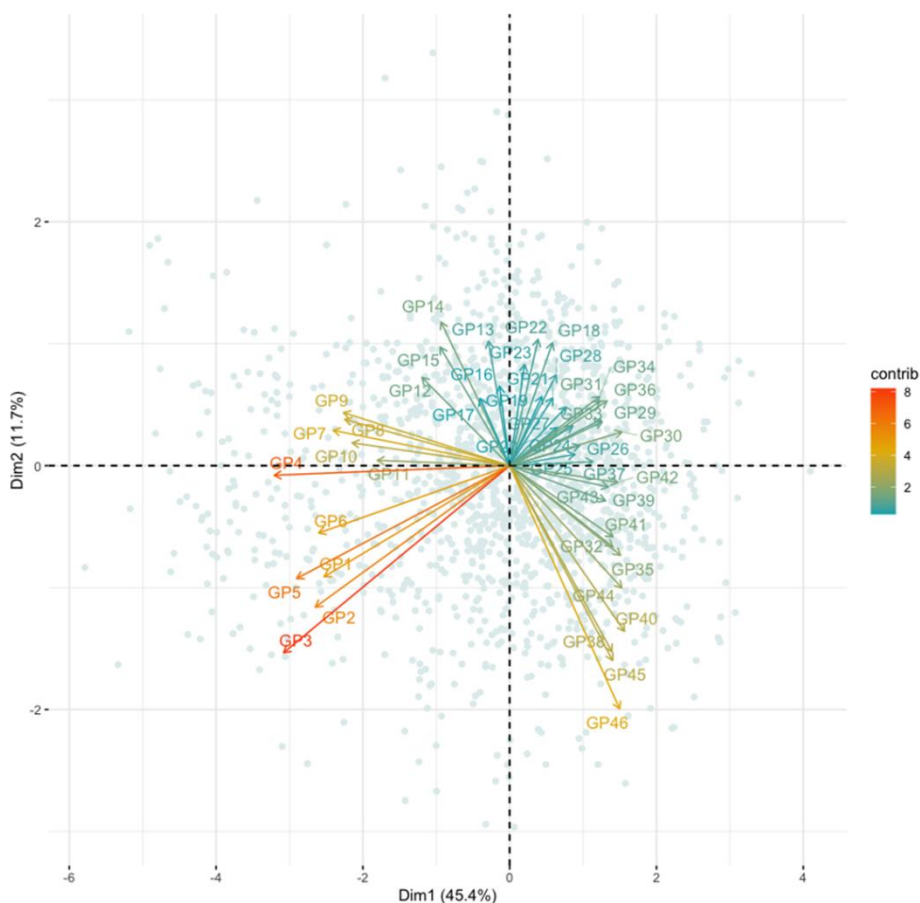


Figura 20. Biplot del análisis de componentes principales que representa las dos dimensiones (Dim) principales (1 y 2), con la representación de los vectores de cada uno de los picos de glicanos (GP).

Para la definición de grupos (*clusters*) y su análisis se estableció un algoritmo basado en Kmedias (*Kmeans*) aplicado a los valores de GPS transformados en *ilr*. El número óptimo de *clusters* (dos, para el presente trabajo) se estableció gráficamente, basado en la suma de cuadrados (Figura 21A). Los dos grupos de individuos así definidos se representan gráficamente en la Figura 21C, en relación a las dos dimensiones mencionadas del análisis por componentes principales. El primer grupo se compuso de 431 individuos y el segundo de 1085 individuos.

Las características de los dos grupos (*clusters*) en lo que respecta a su composición de *N*-glicanos, agrupados por sus características comunes, se representa en la Tabla 7, en la que se muestra cómo ambos grupos de sujetos de estudio son muy distintos. Los sujetos del *cluster*-1 presentaban una mayor abundancia de *N*-glicanos sencillos. Concretamente, presentaban una mayor abundancia de *N*-glicanos poco ramificados (A1 y A2), poco galactosilados (G0 y G1), poco

sialilados (S0 y S1) y formas oligomanosa (OM). Los sujetos del *cluster-1* también presentaban una mayor abundancia de *N*-glicanos core-fucosilados (Tabla 7). Por el contrario, los sujetos del *cluster-2* presentaban una mayor abundancia de *N*-glicanos complejos. Concretamente, presentaban una mayor abundancia de *N*-glicanos altamente ramificados (A3 y A4), muy galactosilados (G2, G3 y G4), altamente sialilados (S2, S3 y S4) y con mayor fucosilación periférica (*outer-arm*, OF) (Tabla 7).

Tabla 7. Agrupaciones de *N*-glicanos en los grupos definidos por análisis de componentes principales

| Tipo de glicano (%) | Muestra total (n=1516) | Grupo (<i>cluster</i>) 1 (n=431) | Grupo (<i>cluster</i>) 2 (n=1085) | P-valor |
|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------|
| G0 | 3.19 [2.40, 4.53] | 5.75 [4.47, 7.92] | 2.76 [2.20, 3.41] | <0.001 |
| G1 | 6.95 [6.05, 8.26] | 9.59 [8.44, 11.60] | 6.41 [5.72, 7.14] | <0.001 |
| G2 | 67.98 [65.43, 69.98] | 64.98 [61.46, 68.21] | 68.57 [66.82, 70.45] | <0.001 |
| G3 | 13.48 [11.54, 15.41] | 11.28 [9.83, 12.95] | 14.30 [12.52, 15.92] | <0.001 |
| G4 | 6.22 [5.09, 7.58] | 5.22 [4.29, 6.23] | 6.66 [5.62, 7.89] | <0.001 |
| A1 | 1.08 [0.95, 1.22] | 1.30 [1.16, 1.49] | 1.01 [0.91, 1.12] | <0.001 |
| A2 | 77.76 [75.70, 79.82] | 80.05 [78.34, 81.48] | 76.92 [75.07, 78.63] | <0.001 |
| A3 | 13.48 [11.54, 15.41] | 11.28 [9.83, 12.95] | 14.30 [12.52, 15.92] | <0.001 |
| A4 | 6.22 [5.09, 7.58] | 5.22 [4.29, 6.23] | 6.66 [5.62, 7.89] | <0.001 |
| S0 | 11.83 [9.82, 14.69] | 17.92 [15.23, 23.93] | 10.66 [9.26, 12.08] | <0.001 |
| S1 | 21.15 [19.48, 22.85] | 21.37 [19.59, 23.27] | 21.08 [19.45, 22.63] | 0.085 |
| S2 | 49.50 [47.16, 51.29] | 45.02 [42.05, 47.60] | 50.39 [49.00, 52.03] | <0.001 |
| S3 | 14.87 [13.06, 16.59] | 12.57 [11.17, 13.96] | 15.68 [14.35, 17.15] | <0.001 |
| S4 | 1.82 [1.50, 2.13] | 1.48 [1.26, 1.76] | 1.93 [1.68, 2.23] | <0.001 |
| CF | 30.44 [27.23, 33.93] | 35.68 [32.65, 39.53] | 28.76 [26.09, 31.45] | <0.001 |
| OF | 2.67 [2.28, 3.12] | 2.30 [1.96, 2.61] | 2.83 [2.45, 3.25] | <0.001 |
| OM | 1.10 [0.91, 1.40] | 1.76 [1.40, 2.65] | 0.99 [0.86, 1.15] | <0.001 |

Los datos son medianas e intervalos intercuartil (entre corchetes). G, galactosilación (G0 a-, G1 mono-, G2 di-, G3 tri-, G4 tetra-galactosilados). S, sialilación (S0 a-, S1 mono-, S2 di-, S3 tri-, S4 tetra-sialilados). A, antenas (ramificación: A1 mono-, A2 di-, A3 tri-, A4 tetra-*antenas*). F, fucosilación (CF, *core*-fucosilación; OF [*outer arm*], fucosilación externa). OM, oligomanosa. Se representan los datos crudos (en porcentaje de abundancia), aunque para las comparaciones estadísticas fueron transformados en *isometric log-ratios* (ilr), excepto fucosilación y oligomanosa (no composicionales), que fueron tratadas como variables aleatorias con dominio restringido (0,1). Los valores de P se obtuvieron con el test de Mann-Whitney con la corrección de Benjamini.

Una comparación similar en cuanto a la composición de *N*-glicanos en los dos grupos se representa en la Figura 21B y 21D, con los *N*-glicanos no agrupados por sus características comunes, sino los 46 GPs individuales. En 21B se representan individualmente los 1516 cromatogramas con sus 46 GPs, separados en color diferente según pertenezcan al *cluster-1* o 2. Se observa cómo los sujetos del *cluster-1* presentan mayores niveles de los *N*-glicanos correspondientes a los GPs 1 al 17, los menos complejos. Los sujetos del *cluster-2* presentan, por el contrario, niveles más altos de los glicanos correspondientes a los GPs superiores, más complejos. Lo mismo se puede observar en la Figura 21D, en la que se representan las medias

(en escala logarítmica) de la abundancia de estos GPs. Estos grupos estarían en los extremos izquierdo y derecho, respectivamente, en la primera dimensión del análisis de componentes principales (Figuras 12 y 14).

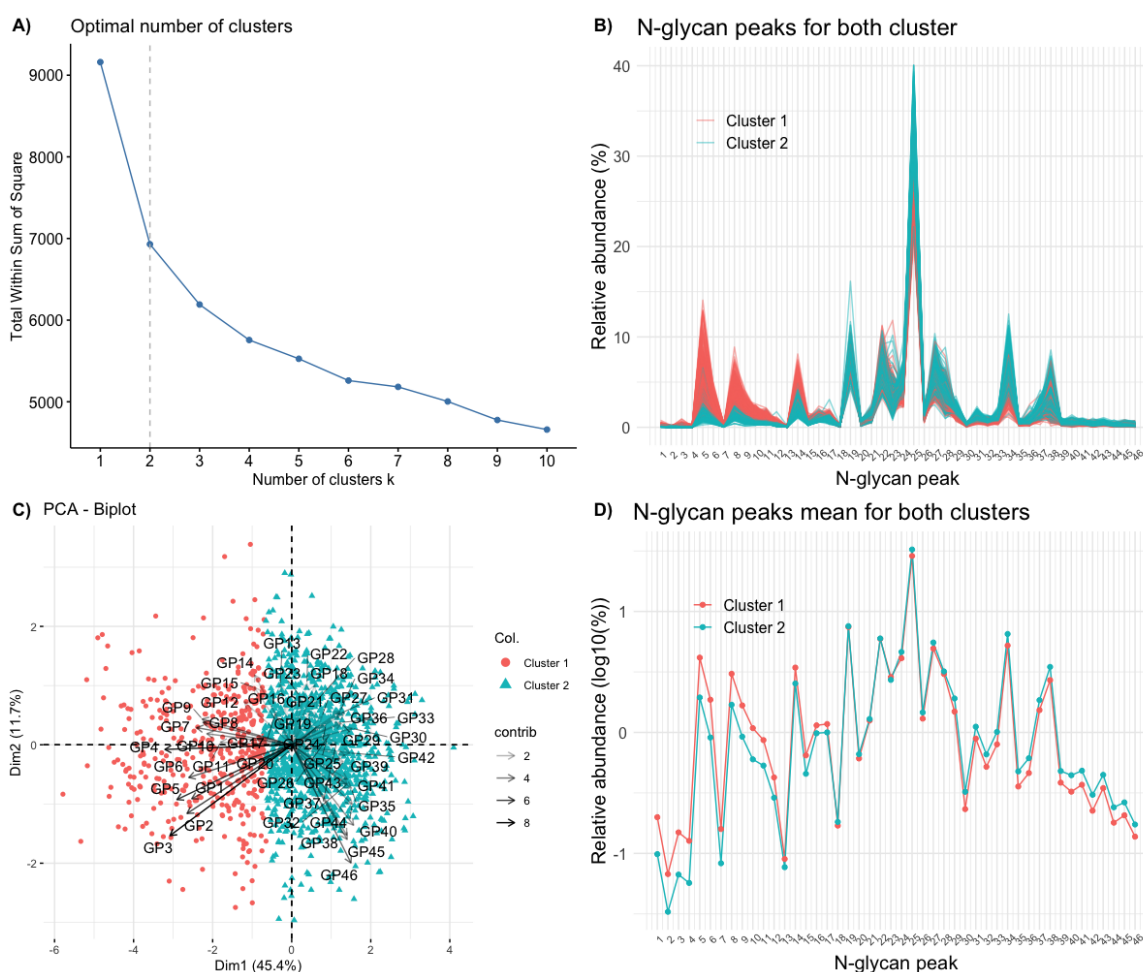


Figura 21. (A) Gráfico de *acodaciones (elbows)* para determinar el número óptimo de grupos (*clusters*). Se observan *codos* cuando el número de grupos es 2 y 4. Para el presente trabajo se han definido dos grupos (*clusters*). (C) *Biplot* con los grupos (*clusters*) definidos por Kmedias tras el análisis de componentes principales del conjunto de los picos de glicano (GPs). (B) Representación de los 46 picos de *N*-glicanos (GPs) en los dos grupos (*clusters*) definidos tras el análisis de componentes principales, se representan individualmente los 1516 cromatogramas con sus 46 GPs, separados en color rojo o verde según pertenezcan al *cluster* 1 o 2, respectivamente. (D) Se representan las medias de los 46 GPs (en escala logarítmica) en esta población de estudio, separados en color rojo o verde según pertenezcan al *cluster* 1 o 2, respectivamente.

En la Tabla 8 se presenta una comparación de las características demográficas, de estilo de vida, metabólicas, inflamatorias y de comorbilidad en los grupos (*clusters*) definidos por el análisis de componentes principales de los *N*-glicanos. No se observaron diferencias significativas en la distribución por sexos entre el *cluster*-1 y el *cluster*-2, aunque los sujetos del *cluster*-1, de menor complejidad en su composición de *N*-glicanos, presentaban una edad significativamente mayor que la de los sujetos del *cluster*-2 (Tabla 5).

Tabla 8. Comparación de datos demográficos, de estilo de vida, metabólicos, inflamatorios y de comorbilidad en los grupos definidos por análisis de componentes principales de los N-glicanos en el suero

| | Grupo (<i>cluster</i>) 1 (n=431) | Grupo (<i>cluster</i>) 2 (n=1085) | P-valor |
|---|---------------------------------------|--|---------|
| Edad, años | 56 [40, 70] | 51 [38.00, 65] | 0.002 |
| Mujeres, n (%) | 232 (53.8) | 606 (55.8) | 0.608 |
| Hombres, n (%) | 199 (46.2) | 479 (44.2) | |
| Status de fumador | | | |
| Nunca fumador, n (%) | 237 (55.0) | 588 (54.2%) | 0.031 |
| Ex-fumador, n (%) | 128 (29.7) | 267 (24.6) | |
| Fumador, n (%) | 66 (15.3) | 230 (21.2) | |
| Actividad física | | | |
| Baja, n (%) | 165 (38.3) | 431 (39.7) | 0.891 |
| Media, n (%) | 161 (37.3) | 391 (36.0) | |
| Alta, n (%) | 105 (24.4) | 263 (24.2) | |
| Consumo de alcohol (g/día) | | | |
| 0-9, n (%) | 159 (36.9) | 387 (35.7) | 0.468 |
| 10-139, n (%) | 162 (37.6) | 436 (40.2) | |
| 140-279, n (%) | 78 (18.1) | 163 (15.0%) | |
| ≥280, n (%) | 32 (7.4) | 99 (9.1) | |
| Índice de masa corporal, kg/m² | 27.76 [24.52, 31.50] | 27.78 [24.65, 31.30] | 0.726 |
| Diabetes mellitus, n (%) | 61 (14.2) | 126 (11.6) | 0.358 |
| Síndrome metabólico, n (%) | 95 (22.0) | 219 (20.2) | 0.608 |
| Glucosa, mg/dL | 91 [83, 102] | 88 [81, 98] | 0.006 |
| Hemoglobina glicada (HbA1c), % | 5.4 [5.2, 5.8] | 5.4 [5.2, 5.7] | 0.752 |
| Albúmina glicada, % | 14.15 [13.09, 15.53] | 13.61 [12.45, 14.85] | <0.001 |
| Fructosamina, μmol/L | 262 [237, 292] | 251 [220, 279] | <0.001 |
| HDL-colesterol, mg/dL | 59 [49, 71] | 57 [46, 68] | 0.006 |
| LDL-colesterol, mg/dL | 114 [93, 137] | 113 [94, 134] | 0.905 |
| Velocidad de sedimentación (VSG), mm/h | 9 [5,17] | 9 [5,16] | 0.326 |
| Proteína C reactiva, mg/dL | 0.13 [0.04,0.33] | 0.14 [0.05,0.41] | 0.358 |
| Factor de necrosis tumoral-α (TNF α), pg/mL | 7.6 [6.4,9.6] | 7.4 [6.0,8.8] | 0.001 |
| Interleucina-8 (IL-8), pg/mL | 7.0 [5.0,10.0] | 7.0 [5.0,11.0] | 0.608 |
| Interleucina-6 (IL-6), pg/mL | 2.10 [2.0,3.2] | 2.20 [2.0,3.6] | 0.358 |
| Receptor soluble de interleucina 2, U/mL | 414 [321, 527] | 411 [313, 530] | 0.608 |
| Aspartato aminotransferasa (AST), UI/L | 23 [20,28] | 22 [19,27] | 0.002 |
| Ganma-glutamil transferasa (GGT), UI/L | 21 [14, 34] | 19 [13, 33] | 0.069 |
| Triyodotironina (T3), pg/mL | 3.30 [3.05,3.56] | 3.39 [3.15,3.67] | 0.001 |
| Tasa de filtrado glomerular, (mL/min/1.7 m2) | 96.8 [84.5,111.8] | 101.9 [88.3,117.2] | 0.001 |
| Índice de comorbilidad | | | |
| 0 puntos | 296 (68.7) | 789 (72.7) | 0.015 |
| 1 punto | 84 (19.5) | 222 (20.5) | |
| ≥ 2 puntos | 51 (11.8) | 74 (6.8) | |

Los datos son medianas e intervalos intercuartil (entre corchetes) o números absolutos y porcentajes (entre paréntesis). Los valores de P se obtuvieron con el test de Mann-Whitney o con el test chi-cuadrado, respectivamente, con la corrección de Benjamini. LDL, *low-density lipoprotein*; HDL, *high-density lipoprotein*.

No se observaron diferencias significativas en las variables relacionadas con los estilos de vida (consumo de alcohol y de tabaco, y actividad física) entre los sujetos de los *clusters* 1 y 2, salvo en la proporción de fumadores, que tendió a ser mayor en el *cluster* -2 (Tabla 8).

Los individuos del *cluster*-1 presentaron algunos datos de trastorno metabólico con mayor frecuencia o cantidad que los del *cluster*-2. El índice de masa corporal fue similar en ambos *clusters*. La prevalencia de diabetes mellitus y de síndrome metabólico fue ligeramente superior en el *cluster*-1 (sin diferencia estadísticamente significativa respecto al *cluster*-2), pero la glucemia basal fue mayor en los individuos del *cluster*-1, al igual que algunos marcadores de glicación como la fructosamina y la albúmina glicada, relacionada con ella (Tabla 8).

No se observaron diferencias significativas en los marcadores de inflamación entre los *clusters* 1 y 2, salvo en el TNF-alfa, cuyos niveles fueron significativamente mayores en los sujetos del *cluster*-1 (Tabla 8).

Algunos marcadores de daño hepático, como la AST sérica fueron mayores en los sujetos del *cluster*-1 (Tabla 8). De modo análogo, los sujetos del *cluster*-1 presentaron menor tasa de filtrado glomerular estimado que los sujetos del *cluster*-2 (Tabla 8). En línea con lo anterior, los sujetos del *cluster*-1 presentaron una mayor tasa de comorbilidad asociada que los sujetos del *cluster*-2 (Tabla 8).

Ajustando por edad y sexo, los individuos pertenecientes al *cluster*-1 mostraron 13.8 $\mu\text{mol/L}$ más de fructosamina que los pertenecientes al *cluster*-2. Además, mostraron una tasa de filtrado glomerular 3.1 mL/min menor, tras ajustar por el efecto de edad y sexo. En cuanto al *score* de comorbilidades, la probabilidad de sufrir dos o más, es un 52.2% mayor en los individuos pertenecientes al *cluster*-1, tras ajustar por edad y sexo (odds ratio 1.52; IC 95% 1.01, 2.27). El TNF-alfa fue mayor en hombres y aumentó linealmente con la edad; sin embargo, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los *clusters* definidos a partir del *N*-glicoma, una vez ajustado por el efecto de edad y sexo.

4.5. Asociación específica del *N*-glicoma sérico con enfermedad cardiovascular arterial

Un total de 262 de los sujetos del estudio (17.2%) presentaba datos de enfermedad cardiovascular arterial. De ellos, 65 presentaban cardiopatía isquémica, 91 presentaban ondas Q patológicas en el ECG, 35 presentaban enfermedad cerebrovascular, 114 presentaban un índice tobillo-brazo patológico y 27 presentaban enfermedad arterial periférica.

En la Figura 22 se representan los valores del PCA de los individuos con y sin enfermedad cardiovascular arterial, separados en los 5 tipos principales que se han mencionado en el párrafo anterior. En todos estos tipos principales, excepto la enfermedad cerebrovascular, se observaron valores altos de los primeros y de los últimos GPs (*N*-glicanos de baja y alta complejidad), mientras que los *N*-glicanos de complejidad intermedia mostraron valores menores en relación a la presencia de enfermedad cardiovascular arterial (Figura 22). Claramente, la enfermedad cerebrovascular mostró un patrón diferente en el análisis de componentes principales (Figura 22). Por este motivo, la enfermedad cerebrovascular se consideró aparte en algunos de los siguientes análisis.

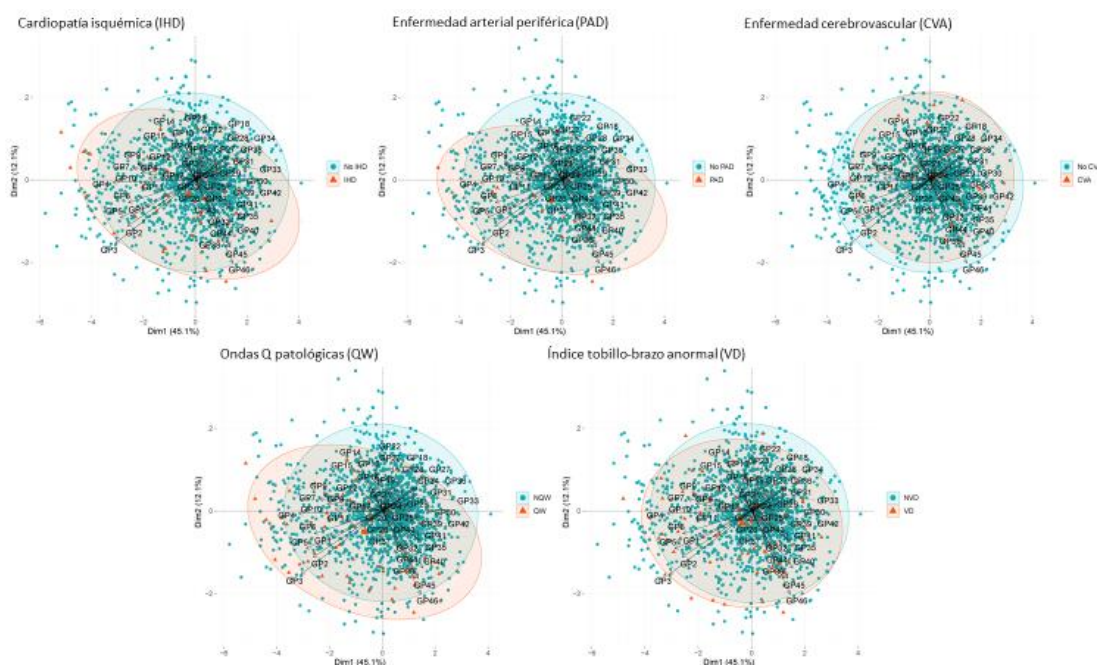
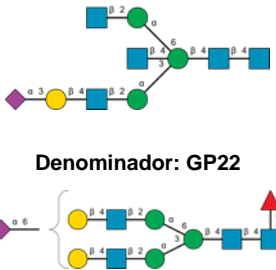
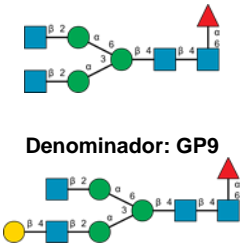
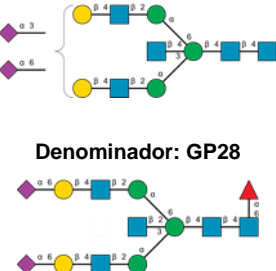
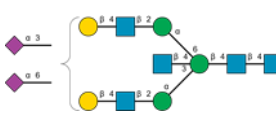


Figura 22. Biplot con los grupos (*clusters*) definidos por Kmedias tras el análisis de componentes principales del conjunto de los picos de glicano (GPs). En la cardiopatía isquémica (*ischemic heart disease*, IHD), en la onda Q patológica en el ECG rutinario (*pathological Q wave*, QW), en la enfermedad cerebrovascular (*cerebrovascular accident*, CVA), en la enfermedad arterial periférica (*peripheral artery disease*, PCA) y en el índice tobillo-brazo anormal (*vascular disease*, VD). Dim, dimensión.

En la Tabla 9 se representan los resultados del análisis *selbal* en la búsqueda de los mejores balances de *N*-glicanos que reflejen asociación con las enfermedades cardiovasculares arteriales. Entre los balances encontrados, destacan los que incluyen el GP26, que mostró una robusta asociación negativa con la presencia de enfermedad cardiovascular arterial tras ajustar por edad, sexo, factores de riesgo vascular o sus combinaciones (SCORE). Esta asociación negativa del GP26 se mantuvo también cuando se introdujo aisladamente (tras la

transformación en *ilr*) en el modelo de regresión, lo cual equivale a incluir la media geométrica del resto de GPs en el denominador (Tabla 9).

Tabla 9. Balances de *glycan peaks* (GPs) asociados con enfermedad cardiovascular arterial (cardiopatía isquémica, ondas Q patológicas, enfermedad cerebrovascular, enfermedad arterial periférica clínica o índice tobillo-brazo patológico)

| Balances de GPs | OR no ajustada (IC 95%) | OR ajustada por edad y sexo (IC 95%) | OR ajustada por SCORE ¹ (IC 95%) | OR multiajustada ² (IC 95%) |
|---|-------------------------|--------------------------------------|---|--|
| <p>Numerador: GP16</p>  <p>Denominador: GP22</p> | 5.32 (3.23, 8.77) * | 1.52 (0.84, 2.76) | 1.26 (0.71, 2.26) | 1.50 (0.82, 2.75) |
| <p>Numerador: GP5</p>  <p>Denominador: GP9</p> | 5.20 (3.57, 7.58) * | 1.74 (1.07, 2.82) * | 1.71 (1.07, 3.32) * | 1.64 (1.01, 2.66) * |
| <p>Numerador: GP26</p>  <p>Denominador: GP28</p> | 0.68 (0.46, 1.00) | 0.7 (0.47, 1.04) * | 0.63 (0.42, 0.95) * | 0.63 (0.42, 0.95) * |
| <p><i>ilr</i> (GP26)</p>  | 0.38 (0.22, 0.66) * | 0.39 (0.22, 0.69) * | 0.37 (0.21, 0.66) * | 0.30 (0.16, 0.54) * |

OR, *odds ratio*. IC, intervalo de confianza ¹SCORE, calculo de riesgo habitual (SCORE2 Working Group, 2021; SCORE-OP Working Group, 2021). ²Ajustada por edad, sexo, presencia de diabetes mellitus, tabaquismo, presión arterial sistólica, colesterol total y colesterol-HDL. *ilr*, *isometric log-ratio*. Las imágenes de los balances representan el *N*-glicano predominante para cada GP. *P<0.05.

Tabla 10. Balances de *glycan peaks* (GPs) asociados con enfermedad cardiovascular arterial no cerebral (cardiopatía isquémica, ondas Q patológicas, enfermedad arterial periférica o índice tobillo-brazo patológico)

| Balances de GPs | OR no ajustada (IC 95%) | OR ajustada por edad y sexo (IC 95%) | OR ajustada por SCORE ¹ (IC 95%) | OR multiajustada ² (IC 95%) |
|--|-------------------------|--------------------------------------|---|--|
| <p>Numerador: GP10 y GP5</p> <p>Denominador: GP8 y GP9</p> | 9.02 (5.55, 14.64) * | 2.47 (1.29, 4.73) * | 2.58 (1.40, 4.75) * | 2.39 (1.24, 4.62) * |
| <p>Numerador: GP26</p> <p>Denominador: GP32</p> | 0.36 (0.23, 0.56) * | 0.43 (0.27, 0.70) * | 0.42 (0.26, 0.68) * | 0.41 (0.25, 0.67) * |
| <p>Numerador: GP26</p> <p>Denominador: GP28</p> | 0.58 (0.35, 0.94) * | 0.61 (0.37, 1.00) | 0.54 (0.32, 0.89) * | 0.52 (0.31, 0.87) * |
| <p>ilr (GP26)</p> | 0.32 (0.18, 0.55) * | 0.31 (0.17, 0.57) * | 0.30 (0.17, 0.54) * | 0.25 (0.13, 0.46) * |

OR, odds ratio. IC, intervalo de confianza ¹SCORE, calculo de riesgo habitual (SCORE² Working Group, 2021; SCORE-OP Working Group, 2021). ²Ajustada por edad, sexo, presencia de diabetes mellitus, tabaquismo, presión arterial sistólica, colesterol total y colesterol-HDL. ilr, isometric log-ratio. Las imágenes de los balances representan el N-glicano predominante para cada GP. *P<0.05.

Es pertinente hacer constar cómo los dos de los *N*-glicanos incluidos en el balance *selbal* que se asocian de forma más consistente con la enfermedad cardiovascular arterial (tras ajustar por múltiples factores de confusión) que son GP26 (en el numerador) y GP28 (en el denominador) son muy similares (bianterarios, digalactosilados, disialilados, con N-acetilglucosamina bisectriz), estando su única diferencia principal en la presencia (GP28) o ausencia (GP26) de core-fucosilación (Tabla 9).

El área bajo la curva ROC de un modelo de predicción de enfermedad cardiovascular arterial (en sus 4 formas) que incluyó edad, sexo, presencia de diabetes mellitus, tabaquismo, presión arterial sistólica, colesterol total y colesterol-HDL fue 0.74 (intervalo de confianza al 95%: 0.71-0.78). En el mismo modelo, pero añadiendo el GP26 previa transformación en *ilr*, el área bajo la curva fue 0.75 (intervalo de confianza al 95%: 0.72-0.79). Ambas curvas ROC presentaron similar capacidad de discriminación ($P=0.101$).

En la Tabla 10 se representan los resultados del análisis *selbal* en la búsqueda de los mejores balances de *N*-glicanos que reflejen asociación con las enfermedades cardiovasculares arteriales, excluyendo la enfermedad cerebrovascular. Entre los balances encontrados, destaca de nuevo el GP 26, que mantuvo la robusta asociación negativa con la presencia de enfermedad cardiovascular arterial tras ajustar por múltiples factores de confusión (Tabla 10). Este es un *N*-glicano, como ya se ha comentado, biantenario, digalactosilado, disialilado, con una N-acetilglucosamina bisectriz (Tabla 9 y Tabla 10). Su notación científica es A2BG2S[3,6]2 (A2 por biantenario, B por la bisectriz, G2 por digalactosilado, y S2 por disialilado, señalando entre conchetes los lugares de sialilación).

El área bajo la curva ROC de un modelo de predicción de enfermedad cardiovascular arterial (excluyendo la enfermedad cerebrovascular) que incluyó edad, sexo, presencia de diabetes mellitus, tabaquismo, presión arterial sistólica, colesterol total y colesterol-HDL fue 0.74 (intervalo de confianza al 95%: 0.70-0.77). En el mismo modelo, pero añadiendo el balance GP26/GP32, por ejemplo, el área bajo la curva fue 0.75 (intervalo de confianza al 95%: 0.72-0.78). Estos dos modelos presentaron una diferencia estadísticamente significativa en su capacidad de discriminación ($P=0.040$).

5. DISCUSIÓN

5.1. Justificación general de los trabajos

La investigación de la edad en las determinaciones de laboratorio tiene sentido, como lo tiene una derivada de la misma, que es la búsqueda de marcadores de envejecimiento (*Titorenko, 2018*). La esperanza de vida ha aumentado en el mundo aproximadamente 27 años en los últimos 70 años; en países como el nuestro y los de nuestro entorno se ha doblado en los últimos 200 años y en países como la India se ha cuadruplicado (*Our World in Data 2020*). La esperanza de vida depende de factores ambientales y factores genéticos, siendo la contribución de estos últimos para la esperanza de vida de aproximadamente un 10-30% (*Herskind et al. 1996; Graham Ruby et al. 2018*). El envejecimiento no siempre ocurre de forma saludable. El aumento de la esperanza de vida va unido a una mayor prevalencia de síndromes geriátricos y de enfermedades relacionadas con la edad (*Hajat y Stein, 2018*). De hecho, la esperanza de vida en los USA ha caído ligeramente en los últimos años (*Kochanek et al. 2017; Murphy et al. 2018*). Los mecanismos de estos síndromes, enfermedades y del propio envejecimiento son probablemente similares (*Franceschi et al. 2018*). Las personas que alcanzan edades avanzadas evitan o posponen estos síndromes y enfermedades, que frecuentemente se desarrollan de modo gradual por períodos prolongados, por lo que en sus inicios suelen estar asintomáticos e infradiagnosticados (*Franceschi et al. 2018*).

La edad cronológica no sirve como marcador único de envejecimiento. En línea con el párrafo anterior, serían necesarios marcadores de la edad biológica, funcional o fisiológica (*Hamczyk et al. 2020*). El marcador ideal debería reflejar el envejecimiento sin estar influido por enfermedades específicas, debería ser repetible, no invasivo, sensible, reproducible, y aplicable en animales de experimentación (*Butler et al. 2004*). Se ha especulado que el *N*-glicoma sérico, que tiene una significativa estabilidad intraindividual, podría ser uno de esos marcadores (*Cindric et al., 2021*). Si bien se han publicado diversas series en las que se estudia el efecto del envejecimiento en el *N*-glicoma sérico (*Vanhooren et al., 2007, 2009, 2010; Knezevic et al. 2009, 2010; Ding et al., 2011; Lu et al. 2011; Ruhaak et al., 2011; Mehdi et al. 2012; Pucic et al., 2012; Borelli et al., 2015; Miura et al., 2015; Catera et al., 2016; Merleev et al., 2020*), como bien revisan Cindric et al. (2021) los estudios son todavía insuficientes, ya que algunas series son de pequeño tamaño muestral, con escasos márgenes de edad, por técnicas no adecuadas o con insuficiente información clínico-epidemiológica y de otros marcadores de enfermedad orgánica y de inflamación. Además, si bien también hay estudios sobre las diferencias en cuanto al sexo en el *N*-glicoma (*Knežević et al., 2010; Ding et al., 2011; Krištić et al., 2014; Ercan et al., 2017*),

son necesarios estudios que analicen simultáneamente ambas cosas (el posible dimorfismo sexual en el *N*-glicoma a lo largo de las edades).

Una dificultad del análisis de los resultados del *N*-glicoma, que ya se ha comentado es, por un lado, el carácter composicional de los los datos obtenidos. Esto es, se trata de áreas bajo una curva (cromatograma) cuya suma es 100%. En este tipo de datos, el uso de las técnicas estadísticas habituales es incorrecto. Por otro lado, los resultados obtenidos en el *N*-glicoma tienen la complejidad de incluir más de 40 picos (*glycan peaks*, GPs) de difícil interpretación clínica tomados uno a uno. Esto es un problema común hoy en día para todas las técnicas -*ómicas* que se encuentran en desarrollo. Por todo ello, es de gran importancia el desarrollo de la aplicación de técnicas estadísticas que, por un lado, sean correctas para datos composicionales y, por otro lado, permitan una valoración conjunta de todos los GPs que pueda simplificar la interpretación de los resultados del *N*-glicoma de cara a su interpretación clínica. De ahí que los presentes estudios fueran dirigidos a describir los cambios del *N*-glicoma sérico con la edad, comparando la posible diferente evolución de hombres y mujeres, diseñar (mediante técnicas estadísticas apropiadas) los resultados del *N*-glicoma en patrones simplificados que permitan su comparación, investigar la posible asociación de patrones del *N*-glicoma asociados con el envejecimiento con enfermedades frecuentes, especialmente metabólicas y marcadores de inflamación e índices de comorbilidad, con un apartado específico para investigar, dada su frecuencia y relevancia, la posible asociación de las enfermedades cardiovasculares arteriales.

5.2. Fortalezas y limitaciones de los estudios

5.2.1. Fortalezas de los estudios

Una fortaleza de los estudios es su diseño, basado en el muestreo aleatorio de una población general adulta. Este tipo de diseño (con muestreo aleatorio y basado en población general) es básico para poder investigar, con validez interna, la distribución de las determinaciones de laboratorio en la población y su relación con factores comunes (demográficos, de estilo de vida, metabólicos y relacionados con otras enfermedades frecuentes). En este aspecto, las muestras de voluntarios sanos o de donantes de sangre, tan habituales, contienen frecuentes sesgos de selección. Otra fortaleza del presente estudio es la adecuada caracterización, mediante cuestionarios validados, examen físico y determinaciones de laboratorio, estructurados y validadas. Otro aspecto positivo de los trabajos es su amplio tamaño muestral, que le confiere suficiente potencia para los estudios planteados. Además, el muestreo contiene adultos de

todas las edades y de ambos sexos, lo cual es clave para los objetivos principales planteados. Por último, los estudios tienen la fortaleza de la aplicación de técnicas estadísticas novedosas que permiten simplificar la interpretación de unos resultados de investigación complejos, de forma robusta y técnicamente adecuada para datos composicionales.

5.2.2. Limitaciones de los estudios

Todos los estudios tienen ciertas limitaciones a su validez interna y a su validez externa (*generalizabilidad* de los resultados), que es preciso reconocer. Las limitaciones a la validez interna (sesgos) comprenden las de confusión, selección, medición (clasificación) y análisis (especificación).

Limitaciones inherentes al diseño

Algunas limitaciones son inherentes al diseño observacional y transversal, importantes en la inferencia de causalidad, como la ambigüedad temporal es una limitación inherente al diseño transversal cuando se investiga causalidad. Esta ambigüedad es especialmente importante en la parte de investigación del *N*-glicoma con enfermedades cardiovasculares. Su influencia en el estudio descriptivo y analítico de la evolución del *N*-glicoma con la edad y el sexo es menor. El estudio del valor pronóstico del *N*-glicoma, que no se encontraba entre los objetivos de este estudio, requeriría otro tipo de diseño.

Problemas de confusión

La confusión es siempre un sesgo potencial en los estudios observacionales que investigan causalidad. La existencia de terceras variables que distorsionen la asociación entre exposición y efecto porque esas terceras variables se asocian con la exposición y causalmente con el efecto es un problema en todos los estudios, especialmente los experimentales. La confusión puede controlarse en el análisis, siempre que las potenciales variables confusoras hayan sido adecuadamente recogidas. Los patrones observados en la evolución de los diferentes GPs y sus asociaciones, en relación a la edad y el sexo, podrían haber estado condicionados por otras variables asociadas con el envejecimiento, con el sexo masculino o femenino. Una de las fortalezas del presente estudio es la adecuada fenotipación de la población de estudio en lo que respecta a factores de estilo de vida (alcohol, tabaco, ejercicio físico), alteraciones metabólicas frecuentes (obesidad, síndrome metabólico y sus componentes) y otras alteraciones patológicas frecuentes en la población. Los modelos multivariados ajustados por esas variables permiten minimizar el problema de la confusión.

Problemas de selección

Los sesgos de selección pueden aparecer durante la etapa del muestreo o bien pueden aparecer por pérdidas selectivas de información una vez realizado el muestreo. Como se ha comentado en las fortalezas del estudio, el muestreo aleatorio y la base en la población general son elementos positivos para minimizar los potenciales sesgos de selección en los presentes estudios. La cobertura del *Servizo Galego de Saúde*, de cuya población se obtuvo la base para el muestreo, es casi universal en nuestro entorno. La participación en el estudio, cercana a los dos tercios de los sujetos seleccionados y elegibles, es adecuada para los estándares de este tipo de estudios observacionales basados en el muestreo aleatorio de la población. Además, las características básicas de las personas que no participaron en el estudio (edad, sexo, hábitat por dirección) fueron similares a las de los participantes (datos no mostrados), lo cual es indicativo de que, posiblemente, no hubo en este momento tampoco pérdidas selectivas de información. Los datos de las variables a estudio, tanto los relacionados con exposiciones como con efectos, estuvieron disponibles en todos los sujetos a estudio. Por todo lo comentado, parece poco probable que algún sesgo de selección haya distorsionado los hallazgos. Otra cosa es que la población estudiada sea representativa, lo cual enlaza con la generalizabilidad de los resultados y la validez externa que se discute más adelante.

Problemas de medición (clasificación)

El método glicómico empleado para la principal variable de efecto (el *N*-glicoma, *hydrophilic interaction chromatography* [HILIC]) permite alto rendimiento (*high-throughput*), tiene elevada sensibilidad y permite analizar los compuestos sialilados. Como inconveniente, su interpretación puede ser dificultosa porque algunos picos pueden representar mezclas de compuestos (glicanos) diferentes. En muchos de los estudios hasta aquí mencionados es el método de referencia (*Ruhaak et al., 2011; Knezevic et al., 2010; Pucic et al., 2011*). También lo es en el centro experto en el que se han realizado las determinaciones del presente trabajo (NIBRT de Dublín). Otros métodos como la electroforesis asistida por fluoróforos en un secuenciador de ADN adaptado (*DNA-sequencer-adapted fluorophore-assisted electrophoresis* [DSA-FACE]), utilizada en otros trabajos (*Callewaert et al., 2004; Laroy et al., 2006; Vanhooren et al., 2007, 2008, 2009*) puede permitir una interpretación más fácil de los patrones de glicanos, pero suele requerir la eliminación de los residuos de ácido siálico (*Dall'olio et al., 2013*). El análisis por MALDI-TOF ha sido menos utilizado (*Ruhaak et al., 2010*). Todos estos métodos son relativamente caros, hoy en día. El análisis de lectinas es un método clásico de los primeros tiempos de la glicómica (*Parekh et al., 1985*). Es más barato, pero aporta información sólo de la

presencia de ciertos componentes estructurales y no da información de la estructura general de los glicanos (Dall'olio et al., 2013). En conjunto, el método utilizado es robusto, repetible, y tiene la garantía de haber sido ejecutado en un centro de referencia internacional. Como ya se ha comentado en la Introducción, este tipo de aproximación glicómica tiene ventajas e inconvenientes. Por un lado, permite la visualización global de todo el abanico de *N*-glicanos presentes en el suero. Por otro lado, no permite discernir a qué proteína o proteínas está unido determinado *N*-glicano que se encuentra en la circulación. En este aspecto, muchos estudios se han centrado en la glicosilación de la IgG, por estar bien estudiada, por participar en la inmunidad y por ser la molécula glicosilada que se encuentra a mayor concentración en la circulación (Cindric et al., 2021; Shkunnikova et al., 2023). Un último inconveniente es que casi todos los estudios, como los presentes, se han centrado en los *N*-glicanos, por ser los mejor conocidos y los más abundantes. La glicómica centrada en los *O*-glicanos es un terreno bastante inexplorado.

La información de las variables de exposición (demográficas, metabólicas, de estilo de vida y de enfermedades frecuentes) se recogió mediante medidas objetivas, de laboratorios de referencia clínicos, de cuestionarios validados o de la historia clínica electrónica, en el caso de las enfermedades. En el caso de estas últimas, la información tiene un componente retrospectivo, con sus limitaciones habituales (Talari y Goyal, 2020). En conjunto, con las limitaciones mencionadas, pensamos que puede afirmarse que el estudio tiene una calidad de los datos adecuada.

Problemas de especificación (análisis estadísticos)

El uso de métodos estadísticos inadecuados es frecuente en estudios de esta naturaleza, en los que el carácter composicional (constreñido) de los datos invalida, en parte, el uso de las técnicas habituales con los datos crudos (en porcentaje de área bajo la curva). De hecho, la aplicabilidad de herramientas estadísticas fue, en si mismo, uno de los objetivos del estudio. En la sección de Métodos se describe pormenorizadamente la forma de transformación de los datos previa a su utilización. El análisis de componentes principales (PCA) permite establecer *clusters* o agupaciones de individuos que facillita la comprensión de datos numerosos y complejos. El análisis *selbal*, diseñado para el estudio de datos composicionales en otros ámbitos y basado en balances de los componentes (Rivera-Pinto et al., 2018) ha sido aplicado por nuestro grupo en trabajos glicómicos previos (O'Flaherty et al., 2022).

Un aspecto importante de este tipo de estudios -*ómicos* es la multiplicidad de resultados y de comparaciones que se establecen. Esto aumenta claramente el riesgo de falsos hallazgos (sesgo de significación de masas o por múltiples comparaciones) y la necesidad de corregir los valores de P en los tests de significación. Este sesgo puede ser parte de la causa de la heterogeneidad de resultados que se comenta más adelante. En nuestros trabajos, se empleó en todos los casos la corrección de Benjamini (*Benjamini y Hochberg, 1995*).

Limitaciones a la validez externa

La población de estudio de los presentes trabajos incluyó exclusivamente individuos adultos, de etnia blanca y de un área geográfica determinada (un municipio de Galicia, España). Aunque no es un aspecto muy estudiado, la etnia puede modificar el N-glicoma sérico (*de Jong et al., 2016*). Obviamente, la generalización de los resultados sólo puede hacerse, en estricto, a poblaciones similares.

5.3. Contextualización de los resultados

En la Tabla 11 se enumeran y sintetizan los resultados principales de los presentes de cara a su contextualización, alineados por los objetivos planteados. De entrada, es preciso hacer constar la escasez de estudios con resultados consistentes en la literatura sobre el efecto de la edad en el N-glicoma sérico, a pesar de que un cierto número de artículos lo han abordado desde diferentes puntos de vista en cuanto al origen de la población de estudio, tamaño muestral y técnica de medida (*Vanhooren et al., 2007, 2009, 2010; Knezevic et al. 2009, 2010; Ding et al., 2011; Lu et al. 2011; Ruhaak et al., 2011; Mehdi et al. 2012; Pucic et al., 2012; Borelli et al., 2015; Miura et al., 2015; Catera et al., 2016; Merleev et al., 2020*), tal como han revisado recientemente Cindric et al. (2021). En bastantes de esas series, el número de sujetos incluidos fue relativamente escaso. Sólo en tres de esas series (*Knezevic et al. 2009, 2010; Ruhaak et al., 2011*), dos de las cuales son la misma serie extendida (*Knezevic et al. 2009, 2010*), el tamaño muestral superó los 1000 individuos, cifra arbitraria, pero de dimensión posiblemente necesaria para las múltiples comparaciones que han de establecerse y para las correcciones consiguientes de la “P” en los tests de significación. En algunos de esos estudios, el número de individuos no llegó al centenar (*Mehdi et al. 2012; Borelli et al., 2015; Miura et al., 2015; Merleev et al., 2020*) o sólo lo superó ligeramente (*Vanhooren et al., 2007; Lu et al. 2011; Pucic et al., 2012; Catera et al., 2016*). En esas circunstancias, la probabilidad de *false discovery rate* por múltiples comparaciones es alta. La comparación de los resultados entre estudios, en esas condiciones, es difícil y puede explicar parte de la falta de consistencia en los resultados.

Algunos de los estudios previos han incluido muestras muy seleccionadas de sujetos, como personas con síndrome de Down (*Borelli et al., 2015*), niños y adolescentes (*Pucic et al., 2012*), sujetos con elevada longevidad (*Miura et al., 2015*) o familiares de sujetos con elevada longevidad, en relación a sujetos control (*Ruhaak et al., 2010; Catera et al., 2016*). El muestreo en la mayoría de los estudios, además, fue oportunista (no aleatorio y basado en población general), en base a voluntarios (*Vanhooren et al. 2007, 2009, 2010; Ding et al., 2011; Mehdi et al., 2012; Merleev et al.; 2020*). El único grupo de estudios de muestreo de características similares al nuestro, basado en población (aunque no aleatorio) fueron los realizados por el grupo de Lauc en dos islas de la costa croata (Vis y Korcula) como parte de un programa cuya intención inicial era describir la variabilidad y la epidemiología genética de comunidades insulares cerradas (*Knezevic et al., 2009, 2010*), lo cual también confiere ciertas limitaciones de generalizabilidad al diseño. En nuestro conocimiento, el nuestro es el primer estudio del N-glicoma tras el muestreo aleatorio en una población general adulta.

Por otro lado, la heterogeneidad de las técnicas utilizadas para el análisis del N-glicoma hace que la comparación de los resultados entre los estudios sea difícil. Aunque son muchas las técnicas posibles de análisis glicómico, los centrados en el análisis de la relación de la edad y el sexo con el N-glicoma sérico responden a dos patrones principales: por un lado, los que usan DSA-FACE (*DNA sequencing equipment-Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis*) (*Vanhooren et al. 2007, 2009, 2010; Ding et al., 2011; Borelli et al., 2016; Catera et al., 2016*) y los que usan, como el nuestro, variantes de HPLC (*high performance liquid chromatography*) (*Knezevic et al., 2009; 2010; Ruhaak et al., 2010; Pucic et al., 2012; Miura et al., 2015*). En los primeros (DSA-FACE), el número de picos de glicano (GP) que se detectan es menor (10-11) y, como ya se ha comentado, no detectan sialilación. Los segundos pueden analizar la sialilación y detectan mayor número de GPs, entre 18 (*Miura et al. 2015*), 26 (*Ruhaak et al., 2010*), 33 (*Knezevic et al., 2009; 2010*) o 46, como el nuestro, que aporta, por lo tanto, mayor sensibilidad e información.

Otros estudios se han basado en métodos más específicos que estudian aspectos parcelares de la glicosilación (*Mehdi et al., 2012*) o glucopéptidos unidos a lugares específicos de proteínas (*Merleev et al., 2020*).

Tabla 11. Esquema de los hallazgos principales del estudio, alineados con los objetivos

| |
|--|
| <p>Objetivo 1. Describir la evolución del N-glicoma sérico con la edad, en hombres y en mujeres.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Los N-glicanos sencillos como los mono-antenarios (A1), agalactosilados (G0), no-sialilados (S0) y oligomanosa (OM) aumentan con el envejecimiento en ambos sexos. - Los N-glicanos complejos, como los tetra-antenarios (A4) y tetragalactosilados (G4), son más abundantes en los hombres, pero aumentan con la edad en las mujeres hasta igualarse en edades avanzadas. Por contra, los N-glicanos trigalactosilados (G3) y triantenarios (A3) se encuentran a un mayor nivel de abundancia en las mujeres en todas las edades. - La fucosilación central (core) disminuye con la edad en ambos sexos. La fucosilación periférica (<i>outer-arm</i>) aumenta hasta edades medias de la vida y se estabiliza a partir de ahí, en ambos sexos. - La sialilación es el fenómeno más irregular en su comportamiento con la edad, con diferencias entre hombres y mujeres a partir de edades medias, coincidentes con la menopausia en la mujer. Este dimorfismo afecta especialmente a los N-glicanos trisialilados (S3, descenso en los hombres, ascenso continuo en las mujeres) y tetrasialilados (S4, con aumento progresivo con la edad en las mujeres frente a niveles estables con la edad en hombres), así como a los biantenarios (A2, estabilización a esa edad en los hombres, continuo descenso en las mujeres). |
| <p>Objetivo 2. Resumir, mediante técnicas estadísticas apropiadas, los resultados del N-glicoma en patrones simplificados que permitan su comparación.</p> <ul style="list-style-type: none"> - El análisis de componentes principales es una herramienta que permite reducir la complejidad en la interpretación de los datos composicionales del N-glicoma sérico. - El análisis de balances de N-glicanos (<i>selbal</i>) es otra herramienta que permite reducir la complejidad en la interpretación de los datos composicionales del N-glicoma sérico y definir N-glicanos asociados con efectos, como enfermedad. |
| <p>Objetivo 3. Investigar la posible asociación de patrones del N-glicoma asociados con el envejecimiento con enfermedades frecuentes, especialmente metabólicas, con marcadores de inflamación e índices de comorbilidad.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mediante análisis de componentes principales de los 46 picos de N-glicanos del cromatograma, los individuos pueden agruparse en dos <i>clusters</i> principales, el primero de los cuales está definido por los N-glicanos más sencillos y el segundo por los más complejos. - Los individuos del <i>cluster</i> asociado a los N-glicanos más sencillos presentan una mayor edad, mayores niveles de glucemia y de marcadores de glicación, mayores niveles de algunos marcadores de inflamación, menor tasa de filtrado glomerular y mayor comorbilidad. |
| <p>Objetivo 4. Investigar la posible asociación de las enfermedades cardiovasculares arteriales (enfermedad cerebrovascular, cardiopatía isquémica y arteriopatía periférica) con cambios en el N-glicoma sérico.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Los individuos con enfermedad cardiovascular arterial presentan, en el análisis de componentes principales, mayor abundancia de N-glicanos de menor y mayor complejidad, con menor abundancia de N-glicanos de complejidad intermedia. La enfermedad cerebrovascular es una excepción. - De modo particular, un N-glicano biantenariario, digalactosilado y disialilado, con N-acetilglucosamina bisectriz, no fucosilado, se asocia independiente y negativamente (efecto protector) con la enfermedad cardiovascular arterial. |

El presente estudio ha analizado los cambios en el *N*-glicoma sérico con la edad, en hombres y en mujeres. La primera parte, descriptiva y analítica de los cambios en los 46 picos de *N*-glicanos (*glycan peaks*, GPs) ilustra la complejidad de la interpretación de los resultados del *N*-glicoma. La segunda parte contiene un intento de síntesis de los resultados con una herramienta de más fácil interpretación clínica al reducir su dimensionalidad. Los resultados, muestran que el *N*-glicoma sérico se modifica significativamente con la edad y que sus variaciones son distintas en hombres y en mujeres. Además, determinados patrones de *N*-glicoma se asocian a una mayor edad, a cambios patológicos y a comorbilidad, así como algunos *N*-glicanos o sus balances se asocian, concretamente, con enfermedad cardiovascular arterial. Los hallazgos más importantes de nuestros estudios se enumeran en la Tabla 11.

En nuestro estudio hemos observado que los *N*-glicanos sencillos como los mono-antenarios (A1), agalactosilados (G0) y oligomanosa (OM) aumentan con el envejecimiento en ambos sexos. La misma tendencia se observa con los no-sialilados (S0). La disminución de la galactosilación con el envejecimiento había sido publicado y revisado previamente (*Dall'Olio et al., 2013; Cindric et al., 2021*), no así los otros hallazgos. En una buena parte de los estudios mencionados realizados con DSA-FACE, los resultados principales consistieron en el hallazgo del ascenso, con el paso de los años, de *N*-glicanos agalactosilados (biantenarios y core-fucosilados, FA2), junto con el descenso con la edad, también en ambos sexos, de *N*-glicanos digalactosilados (biantenarios y core-fucosilados, FA2G2). Dichos hallazgos se confirmaron en grupos de sujetos europeos (*Vanhooren et al., 2007, 2009, 2010; Catera et al., 2016*) y chinos (*Ding et al., 2011*). Los hallazgos se encontraron también, específicamente y de modo precoz, en síndromes progeroides como el síndrome de Werner (*Vanhooren et al. 2007*), el síndrome de Cockayne (*Vanhooren et al., 2010*) y el síndrome de Down (*Borelli et al., 2016*). De hecho, la ratio entre ambos *N*-glicanos (*glycan shift*) se ha denominado *GlycoAge test* (*Vanhooren et al., 2010; Catera et al., 2016; Borelli et al., 2016*). Estos resultados parciales se confirman en nuestro estudio, en el que se observa que las glicoestructuras biantenarias (A2) no galactosiladas (G0) core-fucosiladas (CF) como FA2 (que corresponde al GP5) aumentaban con la edad, a la vez que glicofomas similares biantenarias (A2) pero digalactosiladas (G2) core-fucosiladas (CF) como FAG2 (que corresponden al GP14), disminuían con la edad (Figura 23). En nuestra experiencia, dos *N*-glicanos biantenarios y digalactosilados, ambos sialilados (aspecto no detectado en DSA-FACE), uno core-fucosilado (GP27) y otro no (GP22), también disminuyen con la edad (Figura 12). Los resultados del grupo de Lauc, de los que ya se ha comentado su mayor comparabilidad con los nuestros en cuanto a diseño del estudio y técnica utilizada (HPLC), también mostraron

un aumento de los *N*-glicanos agalactosilados con la edad, a la par que un descenso de los digalactosilados (Knezevic et al., 2010).

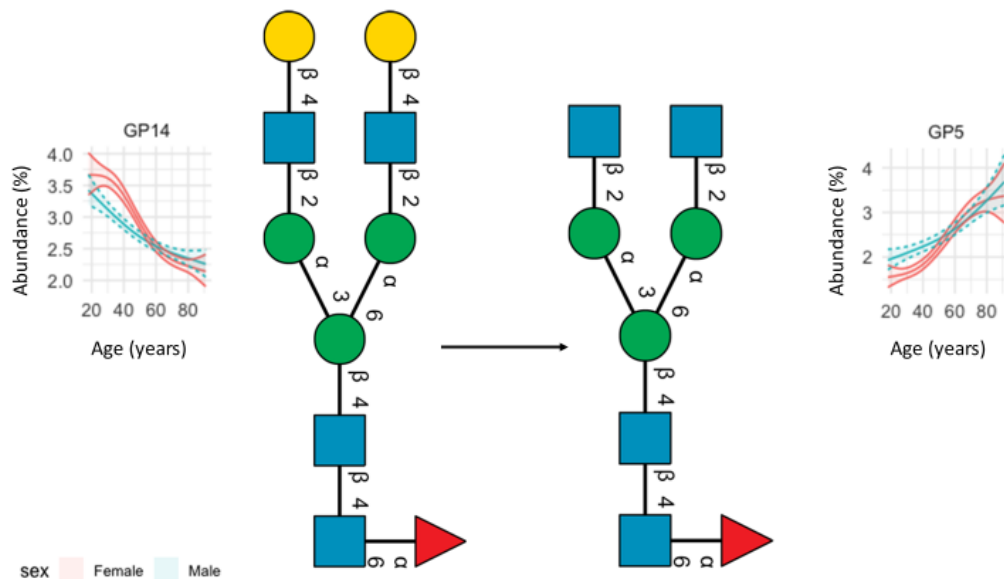


Figura 23. Ejemplo simplificado de la evolución con la edad y la degalactosilación de algunos *N*-glicanos, concordante con la hipótesis del *inflammaging* (Dall'Olio et al., 2013) y con las observaciones del presente estudio (Figura 12). El *N*-glicano de la izquierda corresponde, en el método de nuestro estudio, al GP14 y el de la derecha al GP5. En consistencia con la hipótesis, se observa cómo, en nuestro estudio, el GP14 disminuye con la edad en ambos sexos, a la par que el GP5 (agalactosilado, G0), aumenta. Elaboración de los autores.

El aumento de *N*-glicanos agalactosilados (G0) con la edad se ha demostrado también en el análisis específico de la glicosilación de la IgG y también se ha observado en diversas enfermedades de base inmune (Dall'Olio et al., 2013; Cindric et al., 2021; Shkunnikova et al., 2023). De modo similar, estos datos podrían apoyar la hipótesis de la asociación de los cambios en la *N*-glicosilación con el fenómeno denominado *inflammaging* (envejecimiento inflamatorio), es decir, el envejecimiento dañino condicionado por actividad inflamatoria (Dall'Olio et al., 2013; Cindric et al., 2021; Shkunnikova et al., 2023), como se esquematiza en la Figura 24. La inflamación crónica de bajo grado durante el envejecimiento, sin infección ni otros estímulos inflamatorios manifiestos (*inflammaging*) se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad en la población que envejece (Baele et al., 2023). Existe una relación bidireccional entre la inflamación crónica y el desarrollo de afecciones relacionadas con la edad, como enfermedades cardiovasculares, neurodegeneración, cáncer y fragilidad (Baele et al., 2023).



En el esquema hipotético, en esta situación se alteraría la maquinaria de glicosilación de las células productoras de anticuerpos, lo cual resultaría en la expresión aumentada de IgG

agalactosilada y poco sialilada. Esta IgG aberrantemente glicosilada activaría algunas ramas efectoras de la inmunidad (complemento, células presentadoras, fagocitos), lo cual resultaría en la amplificación de las señales inflamatorias. De acuerdo con este modelo, los N-glicanos agalactosilados, especialmente en la IgG, serían un factor clave para un bucle de amplificación inflamatoria y no meramente un marcador de inflamación y edad (Figura 24) (Dall'Olio et al., 2013, 2018).

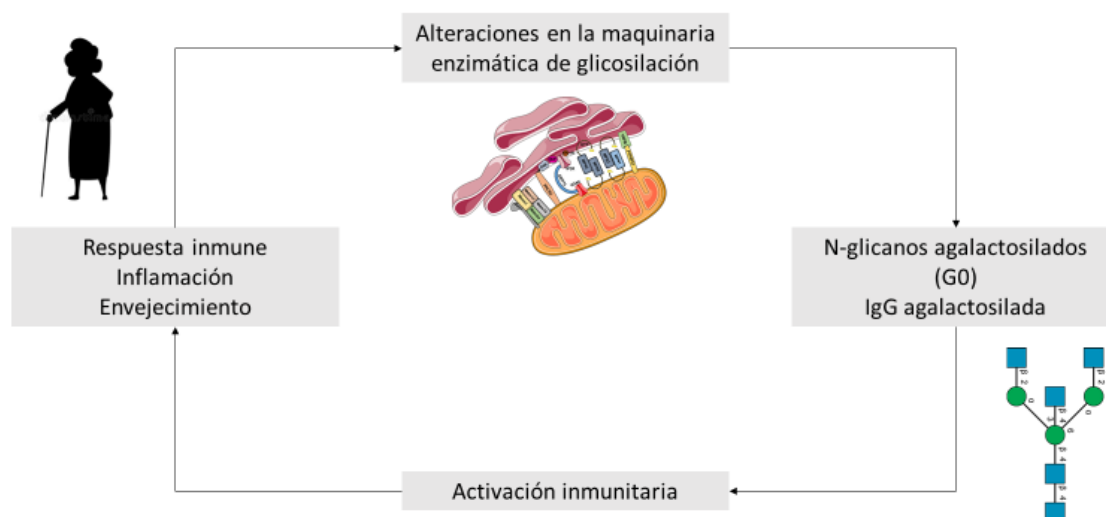


Figura 24. Esquema hipotético del círculo (*loop*) vicioso entre alteraciones de la glicosilación (especialmente, agalactosilación), activación inmune e *inflammaging*. Hipótesis de Dall'Olio et al., (2013). Elaboración de los autores.

Sea o no un auténtico factor (que interviene en el proceso causal) de envejecimiento patológico e inflamatorio, las alteraciones en la glicosilación se han propuesto como herramienta para la medición de la edad biológica en contraposición a la cronológica (Vanhooren et al., 2007, 2009, 2010), así como para la monitorización de la evolución tras los tratamientos. Los cambios en la glicosilación de la IgG, de modo similar al *GlycoAge test* que se ha descrito con el N-glicoma, han dado lugar a un test comercial que pretende cuantificar la edad biológica (véase <https://glycanage.com/>) (Kristic et al., 2014; Mijakovac et al., 2022).

El resto de alteraciones referidas a los GPs aislados y sus combinaciones han sido menos estudiados en la literatura. Por ejemplo, el aumento de de los N-glicanos oligomanosa (en nuestro estudio, GP6 y GP11) aumentan con el paso de los años en ambos sexos, aspecto no descrito, en nuestro conocimiento. Estos N-glicanos forman parte como componente de la primera dimensión de N-glicanos sencillos que caracterizan el primer *cluster* (ver más adelante) identificado en nuestra serie en el análisis de componentes principales, asociado a mayor edad

y a comorbilidad con datos inflamatorios. Una revisión reciente ha destacado el papel de los *N*-glicanos oligomanosa en algunas enfermedades con defectuoso plegamiento de proteínas, incluidas varias asociadas a la edad (Kuribara y Totani, 2022). En animales de experimentación, los *N*-glicanos oligomanosa aumentan en el tejido cardíaco conforme éste envejece (Franzka et al., 2021)

Como ya se ha comentado, el estudio previo más comparable con el nuestro, por diseño, técnica glicómica y tamaño muestral es el del grupo de Gordan Lauc en Croacia (Knezevic et al., 2010). En nuestro trabajo hemos observado que los *N*-glicanos más complejos, como los tetra-antenarios (A4) y los tetragalactosilados (G4), son más abundantes en los hombres, pero aumentan con la edad en las mujeres hasta igualarse en edades avanzadas. Este hallazgo no se confirma en el estudio mencionado (Knezevic et al., 2010), en el que la abundancia de estos *N*-glicanos A4 y G4 fue ligeramente mayor en mujeres. De modo similar, Ding et al. (2011) también comunicaron una mayor abundancia de A4 en mujeres. En dicho estudio, los *N*-glicanos A4 tendieron a aumentar con la edad, sobre todo en las mujeres, mientras que los G4 tendieron a disminuir con la edad en ambos sexos (Knezevic et al., 2010). Hay que tener en cuenta, en cualquier caso, que la abundancia de esta forma de *N*-glicanos es baja.

En nuestro estudio, los *N*-glicanos trigalactosilados (G3) y los triantenarios (A3) se observaron más abundantes en las mujeres que en los hombres, con poca variación con la edad, salvo un significativo incremento de los G3 en las mujeres. Estos hallazgos son similares a los observados por Knezevic et al. (2010). En una serie pequeña de individuos japoneses centenarios (media 106 años) se detectó una alta abundancia de *N*-glicanos multi-antenarios (y multi-sialilados) en comparación a los controles de edad avanzada (media, 71 años) y a los sujetos más jóvenes (media, 30 años) (Miura et al. 2015). Esta abundancia de *N*-glicanos complejos se ha observado en enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Pawłowski et al. 1986; Sarrats et al. 2010; Miyahara et al. 2013, Keser et al. 2017; Adua et al. 2019). En este aspecto, refiriéndonos concretamente a las formas tetra-antenarias (A4) y tetragalactosiladas (G4), los hombres tendrían niveles mayores de abundancia que las mujeres hasta edades muy avanzadas, en las que tenderían a igualarse ambos sexos.

La fucosilación es un elemento importante en la salud y en muchas enfermedades (Becker y Lowe, 2003). En nuestro estudio hemos observado que la fucosilación central (core) disminuye con la edad en ambos sexos, sin diferencias entre ellos. Este hallazgo es concordante con los de estudios previos (Vanhooren et al. 2007; Knezevic et al. 2010; Lu et al. 2011; Ruhaak et al. 2011; Pucic et al. 2012). La fucosilación periférica (*outer-arm*), por el contrario, aumenta hasta edades

medias de la vida y se estabiliza a partir de ahí, también en ambos sexos, con un ligero predominio en mujeres. Los hallazgos son ligeramente distintos de los reportados por el mencionado grupo croata (*Knezevic et al., 2010*), en los que la fucosilación periférica fue, en conjunto, mayor en los hombres, con una tendencia a aumentar en éstos con la edad a la par que a disminuir en las mujeres. Hay que tener en cuenta que, en circunstancias como ésta en las que los cambios con la edad no siguen un curso lineal, la simple estimación del efecto de la edad con una prueba de correlación lineal (*Knezevic et al., 2010*) puede ofrecer resultados engañosos.

La sialilación en los glicanos de las proteínas es importante en muchos procesos patológicos (*Sillanauke et al., 1999*). De acuerdo con nuestros datos, la sialilación es el fenómeno más irregular en su comportamiento con la edad. Como ya se ha comentado más arriba, los *N*-glicanos asialilados (S0) tienden a aumentar con la edad, de modo no significativo y sin diferencia entre hombres y mujeres, lo cual es congruente con el descenso ya mencionado de *N*-glicanos sin galactosas, a las cuales se unen los residuos de ácido siálico. Este rasgo S0 no se encuentra analizado en el ya comentado estudio de *Knezevic et al., (2010)*. En los *N*-glicanos monosialilados (S1) se observó una tendencia a la disminución con la edad en las mujeres, no significativa en el caso de los hombres, de modo similar a lo observado por *Knezevic et al. (2010)*, sin diferencias globales entre ambos sexos, como en el estudio mencionado. El comportamiento de los *N*-glicanos disialilados (S2) fue también similar al referido en estudios previos (*Knezevic et al., 2010*), con un nivel de abundancia global mayor en varones que en mujeres, y tendencia a disminuir con la edad en los primeros y aumentar en las segundas. En los *N*-glicanos trisialilados (S3) y tetrasialilados (S4) observamos diferencias entre hombres y mujeres a partir de edades medias, en parte coincidentes con la menopausia en la mujer. Los trisialilados (S3), tienen un descenso a partir de esa edad en los hombres, con ascenso continuo en las mujeres. Los tetrasialilados aumentan de modo paulatino con la edad en las mujeres hasta edades avanzadas, mientras que permanecen estables en los hombres en todos los rangos de edad. En lo que respecta a los S3, el grupo croata tampoco observó diferencias globales significativas entre hombres y mujeres y, de modo similar a nuestros datos, se observó una correlación positiva con la edad en las mujeres (*Knezevic et al., 2010*). En lo que respecta a los S4, en el estudio de *Knezevic et al., (2010)* no se observó tal correlación positiva con la edad en las mujeres. Este posible efecto hormonal en la sialilación no estaba, en nuestro conocimiento, descrito. Algún estudio previo había mencionado un mayor descenso con la edad de los ya mencionados *N*-glicanos biantenarios (A2) digalactosilados (G2) y fucosilados en mujeres que en hombres (*Knezevic et al., 2010; Ding et al., 2011*), atribuido al descenso de estrógenos en las mujeres, dado que éstos modifican la glicosilación (*Kristic et al., 2014; Ercan et al., 2017*), pero

ya se ha comentado que esto no se observó en nuestro estudio. En conjunto, en el estudio del grupo croata se encontraron más variaciones con la edad en las mujeres que en los varones, lo que también fue atribuido al posible efecto hormonal variable a lo largo de la vida (*Knezevic et al., 2010*). En nuestra experiencia, con las salvedades mencionadas, existen variaciones en número análogo en hombres y en mujeres de la serie.

Por encima de todas estas visiones parcelares de la abundancia de *N*-glicanos con diferentes rasgos, nuestro estudio tenía como objetivo el análisis de componentes principales como una herramienta para simplificar la interpretación del *N*-glicoma. Dada la complejidad de la interpretación de los múltiples picos de *N*-glicanos en el cromatograma, unida al carácter composicional de los datos (su suma es 100%, lo cual quiere decir que el aumento porcentual de alguno de ellos supone obligadamente el descenso porcentual de los demás), el estudio incluyó, además del uso de técnicas estadísticas apropiadas para este tipo de datos, la búsqueda de herramientas que simplifiquen su interpretación. El análisis de componentes principales ha mostrado ser una posible herramienta para reducir la complejidad en la interpretación de los datos composicionales del *N*-glicoma sérico. Mediante análisis de componentes principales de los 46 picos de *N*-glicanos del cromatograma, los individuos pueden agruparse en dos *clusters* principales, el primero de los cuales está fundamentalmente definido por los *N*-glicanos más sencillos (GP del 1 al 11, que son agalactosilados o monogalactosilados, monoantenarios o biantenarios, y asialilados, incluidos los oligomanosa), algunos asociados al envejecimiento y, como el caso de los *N*-glicanos agalactosilados, a la inflamación (como se ha comentado más arriba); el segundo *cluster* está fundamentalmente definido por los *N*-glicanos más complejos. De modo importante, los individuos del *cluster* asociado a los *N*-glicanos más sencillos presentan una mayor edad, mayores niveles de glucemia y de marcadores de glicación, mayores niveles de algunos marcadores de inflamación, menor tasa de filtrado glomerular y mayor tasa de comorbilidad. Si bien los individuos de este *cluster* tienen mayor edad que los del otro *cluster*, la pertenencia al *cluster* y los rasgos negativos asociados son independientes de la edad. Es decir, ajustando por edad (controlando por edad o manteniendo su efecto constante), los sujetos del *cluster* con los *N*-glicanos más sencillos presentan datos de mayor envejecimiento y algunos datos inflamatorios. En conjunto, los resultados sugieren que el *N*-glicoma sérico, analizado mediante técnicas sintéticas apropiadas, podría ser, en línea con la hipótesis del *inflammaging*, un marcador de envejecimiento inflamatorio no saludable. En nuestro conocimiento, esta aproximación global al *N*-glicoma no se había utilizado previamente. Serán necesarios estudios longitudinales futuros para mejor establecer si los cambios referidos en el *N*-glicoma sérico pueden ser un marcador pronóstico de envejecimiento no saludable y de mortalidad.

Nuestro trabajo incluyó un subestudio específico sobre la asociación entre los cambios en el *N*-glicoma sérico y las enfermedades cardiovasculares arteriales (Objetivo 4 de los planteados). Como hallazgo principal, los individuos con enfermedad cardiovascular arterial presentan, en el análisis de componentes principales, mayor abundancia de *N*-glicanos de menor y mayor complejidad, con menor abundancia de *N*-glicanos de complejidad intermedia, aunque la enfermedad cerebrovascular es una excepción. De modo particular (Figura 25), un *N*-glicano biantenariario, digalactosilado y disialilado, con *N*-acetilglucosamina bisectriz (GP26), se asocia independientemente (tras ajustar por factores de confusión) y negativamente (con efecto protector) con la enfermedad cardiovascular arterial.

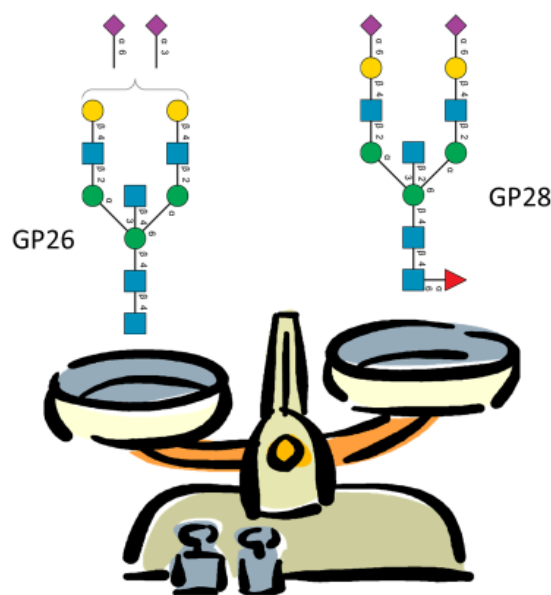


Figura 25. Visión esquemática de algunos de los resultados principales de la asociación del *N*-glicoma sérico con las enfermedades cardiovasculares arteriales mediante el algoritmo *selbal* de R. El balance entre GP26 (en el numerador) y GP28 (en el denominador) se asocia independientemente, de modo negativo, con enfermedad cardiovascular arterial. Especialmente, la abundancia de GP26 se asocia negativamente (efecto protector) con la enfermedad cardiovascular, aunque, como se comenta en los métodos, una aproximación estadística más correcta al análisis de datos composicionales, como los presentes, no es estudiar la asociación de GPs aislados con determinado efecto, sino del balance (*selbal*) entre ellos. Véase cómo los *N*-glicanos de numerador y denominador son muy similares (biantenariarios, digalactosilados, disialilados, con *N*-acetilglucosamina bisectriz), estando su única diferencia principal en la presencia (GP28) o ausencia (GP26) de core-fucosilación. Elaboración de los autores.

La asociación del GP26 con la enfermedad cardiovascular arterial es la más robusta de las encontradas, dado que este glicano está presente en casi todos los balances significativos del algoritmo *selbal*. Es más, su asociación con la enfermedad cardiovascular arterial está presente tras ajustar por otros factores de confusión en la escala *ilr* (es decir, con la media geométrica de

todos los demás GPs en el denominador). Es de destacar que el GP26 está molecularmente relacionado con el GP28, con la única diferencia de la core-fucosilación, presente en el GP28 y ausente en el GP26 (Figura 25). El balance entre GP26 y GP28 también se asoció de forma significativa con la enfermedad cardiovascular arterial. Esta relación es especialmente intrigante. En nuestro estudio no hemos estudiado la glicosilación específica de la IgG, pero en los estudios que han incluido el análisis del *N*-glicoma de esta glicoproteína (la IgG es la glicoproteína más abundante en el suero) una glicofoma igual al GP28 es el elemento principal en el diseño, ya mencionado, del *glycan clock* para predecir la edad biológica de un individuo (Kristic et al., 2014; Mijakovic et al., 2022). En nuestro conocimiento, estos hallazgos no se habían publicado previamente. El GP26 y el GP28 son dos glicofomas poco abundantes en el suero. El GP26 no se modifica sustancialmente con la edad y su abundancia es similar en hombres y en mujeres. El GP28 tiende a aumentar paulatinamente con la edad de forma similar en ambos sexos, aunque su abundancia se estabiliza a partir de edades medias de la vida, con una cierta mayor abundancia en hombres a partir de esa edad (Figuras 12 y 13; Tabla 4).

De hecho, existen muy pocos estudios de asociación del *N*-glicoma sérico con la enfermedad cardiovascular arterial. Como ya se ha comentado en la introducción, en un estudio de tamaño muestral limitado, la enfermedad cerebrovascular silente de pequeño vaso demostrada por RMN, se asoció con una menor abundancia de *N*-glicanos core-fucosilados biantenarios digalactosilados y con una mayor abundancia de *N*-glicanos triantenarios fucosilados (Vilar-Bergua et al., 2015). Salvo el aspecto de la core-fucosilación, algunos elementos de los *N*-glicanos mencionados podrían ser similares a los de los hallazgos del presente estudio, si bien, como ya se ha comentado en los resultados, la enfermedad cerebrovascular tuvo un comportamiento diferente al resto de enfermedades cardiovasculares arteriales, según nuestros datos. En otro estudio de mayor tamaño muestral, prospectivo, sobre el valor predictivo del *N*-glicoma sérico en la incidencia de diabetes tipo 2 y de enfermedades cardiovasculares (Wittenbecher et al., 2020) se observó que la abundancia de *N*-glicanos core-fucosilados biantenarios monogalactosilados no sialilados se asoció significativamente con mayor riesgo cardiovascular en mujeres (Wittenbecher et al., 2020). Los hallazgos no son superponibles a los de nuestro estudio. Por último, en el estudio de Ruhaak et al. (2010), la abundancia de un *N*-glicano biantenario, monogalactosilado y sialilado se asoció negativamente con la historia de infarto agudo de miocardio.



La asociación de variaciones en la glicosilación de proteínas con la enfermedad cardiovascular es mecanísticamente plausible, como ya se ha comentado (Huo y Xia, 2009; Scott et al., 2012;

Scott y Patel, 2013; Pu y Yu, 2014; Krishnan et al., 2015; Testa et al., 2015; Lemmers et al., 2017; Gudelj y Lauc, 2018; Sukhorukov et al., 2019; Cvetko et al., 2021; Kifer et al., 2021; Dashti et al., 2021; Rudman et al., 2022). Sin embargo, en lo que respecta al *N*-glicoma como marcador de riesgo, serán necesarios estudios prospectivos longitudinales, con seguimiento, que confirmen o no las asociaciones encontrados en estudios como el presente, de diseño transversal.

6. CONCLUSIONES

1. El *N*-glicoma sérico se modifica sustancialmente con la edad y su evolución es, en parte, diferente en hombres y mujeres.
2. En ambos sexos tienden a aumentar con la edad los *N*-glicanos sencillos como los agalactosilados (G0, relacionados con inflamación), mono-antenarios (A1), oligomanosa (OM) y no-sialilados (S0).
3. En ambos sexos, la fucosilación central (*core*) disminuye con la edad; la fucosilación periférica (*outer-arm*) aumenta hasta edades medias de la vida y se estabiliza a partir de ahí, también en ambos sexos.
4. Existe dimorfismo sexual en la evolución con la edad de *N*-glicanos complejos con altos niveles de ramificación, galactosilación y sialilación.
5. Mediante análisis de componentes principales de los 46 picos de *N*-glicanos del cromatograma, los individuos pueden agruparse en dos *clusters* principales, el primero de los cuales está definido por los *N*-glicanos más sencillos y el segundo por los más complejos. Los individuos del *cluster* asociado a los *N*-glicanos más sencillos presentan una mayor edad, mayores niveles de glucemia y de marcadores de glicación, mayores niveles de algunos marcadores de inflamación, menor tasa de filtrado glomerular y mayor comorbilidad.
6. Los individuos con enfermedad cardiovascular (con excepción de la cerebrovascular) presentan, en el análisis de componentes principales, mayor abundancia de *N*-glicanos de menor y mayor complejidad, con menor abundancia de *N*-glicanos de complejidad intermedia. La abundancia de un *N*-glicano biantenariario, digalactosilado y disialilado, con *N*-acetilglucosamina bisectriz, no fucosilado, se asocia independiente y negativamente con la enfermedad cardiovascular.
7. En conjunto, los resultados son concordantes con la idea de que el *N*-glicoma sérico podría ser, en línea con la hipótesis del *inflammaging*, un marcador de *envejecimiento inflamatorio* no saludable.

7. FUENTES REFERENCIADAS

Adua E, et al. (2019) High throughput profiling of whole plasma N-glycans in type II diabetes mellitus patients and healthy individuals: A perspective from a Ghanaian population. *Arch Biochem Biophys* 661:10–21.

Adult Treatment Panel III (2001) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults - Executive Summary of Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285:2486–2497.

Ajubi NE, et al. (2006) Determination of the length of sedimentation reaction in blood using the TEST 1 system: comparison with the Sedimatic 100 method, turbidimetric fibrinogen levels, and the influence of M-proteins. *Clin Chem Lab Med* 44:904–906.

Akinkuolie AO, et al. (2014) A novel protein glycan biomarker and future cardiovascular disease events. *J Am Heart Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis* 3: e001221.

Akinkuolie AO, et al. (2016) Circulating N-linked glycoprotein side-chain biomarker, rosuvastatin therapy, and incident cardiovascular disease: an analysis from the JUPITER trial. *J Am Heart Assoc* 5:7.

Alende-Castro V, et al. (2019) Factors influencing erythrocyte sedimentation rate in adults: New evidence for an old test. *Medicine (Baltimore)* 98:e16816.

Alende-Castro V, et al. (2021) C-reactive protein versus erythrocyte sedimentation rate: Implications among patients with no known inflammatory conditions. *J Am Board Fam Med* 34:974–983.

Alende-Castro V, et al. (2021b) Serum concentrations of interleukin 6 in the general adult population: Possible Implications for anti-IL-6 therapy in SARS-Cov-2 infection and IL-6-related diseases. *J Invest Allergol Clin Immunol* 31:75–78.

Alende-Castro V, et al. (2023) Factors influencing serum concentrations of soluble interleukin-2 receptor: a general adult population study. *All Life* 16:1.

Alley WR, Jr. et al. (2013) High-sensitivity analytical approaches for the structural characterization of glycoproteins. *Chem Rev* 113:2668–2732.

American Diabetes Association (2019) Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetes-2019. *Diabetes Care* 42 (Suppl. 1): S13–S28.

Apweiler R, et al. (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1473:4–8.

Arai Y, et al. (2015) Inflammation, but not telomere length, predicts successful ageing at extreme old age: A longitudinal study of semi-supercentenarians. *EBioMedicine* 2:1549–1558.

Baechle JJ, et al. (2023) Chronic inflammation and the hallmarks of aging. *Mol Metab* 74:101755.

Becker DJ y Lowe JB. (2003) Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13:41R–53R.

Benjamini Y, Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc Ser B* 57:289–300.

Birukov A, et al. Immunoglobulin G N-Glycosylation signatures in incident type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Care* 2022; 45: 2729–2736.

Bones J, et al. (2011) Glycomic and glycoproteomic analysis of serum from patients with stomach cancer reveals potential markers arising from host defense response mechanisms. *J Proteome Res* 10:1246–1265.

Borelli V, et al. (2015) Plasma N-glycome signature of Down syndrome. *J Proteome Res* 14:4232–4245.

- Butler RN, et al. (2004) Biomarkers of aging: From primitive organisms to humans. *J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 59:560–567.
- Callewaert N, et al. (2004) Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics. *Nat Med* 10:429–434.
- Cao Y, et al. (2018) Two-sample tests of high-dimensional means for compositional data. *Biometrika* 105:115-132.
- Capri M, et al. (2017) Identification of miR-31-5p, miR-141-3p, miR-200c-3p, and GLT1 as human liver aging markers sensitive to donor–recipient age-mismatch in transplants. *Aging Cell* 16:262–272.
- Catera M, et al. (2016) Identification of novel plasma glycosylation-associated markers of aging. *Oncotarget* 7:7455–7468.
- Charlson ME, et al (1987) A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 40:373-83.
- Charrad M, et al. (2014) NbClust: an R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *J Stat Soft* 61:1-36.
- Chen CC, et al. (2010) Altered serum glycomics in Alzheimer disease: A potential blood biomarker? *Rejuvenation Res* 13:439–444.
- Cheng K, et al. (2016) DrawGlycan-SNFG: A robust tool to render glycans and glycopeptides with fragmentation information. *Glycobiology* 27:200–205.
- Chen SY, et al. (2020) Glycans, glycosite, and intact glycopeptide analysis of *N*-linked glycoproteins using liquid handling systems. *Anal Chem* 92:1680-1686.
- Cindrić A, et al (2021) Glycosylation and aging. *Adv Exp Med Biol* 1325:341-373.
- Clerc F, et al. (2016) Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J* 33:309–343.
- Costa AR, et al. (2014) Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Crit Rev Biotechnol* 34:281-299.
- Craig CL, et al. (2003) International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 35:1381–1395.
- Cummings RD, Pierce JM (2014) The challenge and promise of glycomics. *Chem Biol* 21:1–15.
- Cvetko A, et al. (2021) Plasma N-glycome shows continuous deterioration as the diagnosis of insulin resistance approaches. *BMJ Open Diabetes Res Care* 9: e002263.
- Cymer F, et al. (2018) Therapeutic monoclonal antibody *N*-glycosylation - Structure, function and therapeutic potential. *Biologicals* 52:1-11.
- Dall'Olio F. (2018) Glycobiology of aging. *Subcell Biochem* 90:505-526.
- Dall'Olio F, et al. (2013) N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: A link with inflammaging. *Ageing Res Rev* 12:685–698.
- Dashti H, et al. (2021) Glycosylation and cardiovascular diseases. *Adv Exp Med Biol* 1325: 307–319.
- de Jong SE, et al. (2016) IgG1 Fc N-glycan galactosylation as a biomarker for immune activation. *Sci Rep* 6:28207.
- De Martinis M, et al. (2005) Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett* 579:2035–2039.

- de Vroome SW, et al. (2018) Serum N-glycome alterations in colorectal cancer associate with survival. *Oncotarget* 9:30610–30623.
- Ding N, et al. (2011) Human serum N-glycan profiles are age and sex dependent. *Age Ageing* 40:568–575.
- Doherty M, et al. (2018) Plasma N-glycans in colorectal cancer risk. *Sci Rep* 8:8655.
- Dominguez-Vega E, et al. (2018) High-resolution glycoform profiling of intact therapeutic proteins by hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 184:375-381.
- Dotz V, et al. (2018) Plasma protein N-glycan signatures of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1862:2613–2622.
- Dotz V, Wuhrer M (2019) N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. *FEBS Lett* 593:2966–2976.
- Drake PM, et al. (2011) A lectin affinity workflow targeting glycosite-specific, cancer-related carbohydrate structures in trypsin-digested human plasma. *Anal Biochem* 408::71-85.
- Ercan A, et al. (2017) Estrogens regulate glycosylation of IgG in women and men. *JCI Insight* 2:e89703.
- Fashanu OE, et al. (2019) GlycA, a novel inflammatory marker and its association with peripheral arterial disease and carotid plaque: the MultiEthnic Study of Atherosclerosis. *Angiology* 70:737–746.
- Fernández-Ruiz I. (2016) Immune system and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 13:503–503.
- Filzmoser P, et al. (2018) Applied compositional data analysis. Cham: Springer.
- Filzmoser P, et al. (2009) Principal component analysis for compositional data with outliers. *Environmetric* 20: 621-632.
- Filzmoser P, Gschwandtner M (2021) mvoutlier: Multivariate outlier detection based on robust methods. R package version 2.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=mvoutlier>
- Franceschi C (2007) Inflammaging as a major characteristic of old people: Can it be prevented or cured? *Nutr Rev* 65:S173-6.
- Franceschi C, et al. (2000) Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908:244–254.
- Franceschi C, et al. (2007) Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 128:92–105.
- Franceschi C, et al. (2018) The continuum of aging and age-related diseases: Common mechanisms but different rates. *Front Med* 5:61.
- Franzka P, et al (2021). Altered glycosylation in the aging heart. *Front Mol Biosci* 8:673044.
- Freeze HH y Kranz C (2010) Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 12:14.
- Gaunitz S, et al. (2017) Recent advances in the analysis of complex Glycoproteins. *Anal Chem* 89:389-413.
- Graham Ruby J, et al. (2018) Estimates of the heritability of human longevity are substantially inflated due to assortative mating. *Genetics* 210:1109–1124.
- Gruppen EG, et al. (2015) GlycA, a pro-inflammatory glycoprotein biomarker, and incident cardiovascular disease: relationship with C-reactive protein and renal function. *PLoS One* 10:e0139057. pone.0139057
- Gruppen EG, et al. (2019a) Higher plasma GlycA, a novel pro-inflammatory glycoprotein biomarker, is associated with reduced life expectancy: the PREVEND study. *Clin Chim Acta* 488:7–12.

- Gruppen EG, et al. (2019b) GlycA, a novel pro-inflammatory glycoprotein biomarker is associated with mortality: results from the PREVEND study and meta-analysis. *J Intern Med* 286:596–609.
- Gual A, et al. (1999) Does the concept of a standard drink apply to viticultural societies? *Alcohol Alcohol* 34:153–160.
- Gudelj I, et al. (2018) Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol* 333:65–79.
- Gudelj I, et al. (2018b) Low galacto-sylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. *Biochim Biophys Acta Mol Bas Dis* 1864:2034–2039.
- Gudelj I y Lauc G. (2018) Protein N-glycosylation in cardiovascular diseases and related risk factors. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 12:16.
- Guindo J, et al. (2009) Métodos diagnósticos de la enfermedad arterial periférica. Importancia del índice tobillo-brazo como técnica de criba. *Rev Esp Cardiol Supl* 9:11D-17D.
- Hajat C y Stein E. (2018) The global burden of multiple chronic conditions: A narrative review. *Prev Med Reports* 12:284–293.
- Hamczyk MR, et al. (2020) Biological versus chronological aging: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol* 75:919–930.
- Heijmans R, et al. (2019) IgG N-glycan patterns are associated with ischemic heart disease in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 287:e116–e117.
- Herskind AM, et al. (1996) The heritability of human longevity: A population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Hum Genet* 97:319–323.
- Hoelzel W, et al. (2004) IFCC reference system for measurement of haemoglobin HbA1C in human blood and the National Standardization Schemes in the United States, Japan, and Sweden: A method-comparison study. *Clin Chem* 50:166-174.
- Huo Y y Xia L. (2009) P-selectin glycoprotein ligand-1 plays a crucial role in the selective recruitment of leukocytes into the atherosclerotic arterial wall. *Trends Cardiovasc Med* 19: 140–145.
- Jefferis R (2009) Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol Sci* 30: 356-362.
- Joshi AA, et al. (2016) GlycA is a novel biomarker of inflammation and subclinical cardiovascular disease in psoriasis. *Circ Res* 119:1242–1253.
- Kam RKT, et al. (2007) High-throughput quantitative profiling of serum N-glycome by MALDI-TOF mass spectrometry and N-glycomic fingerprint of liver fibrosis. *Clin Chem* 53:1254-1263.
- Keser T, et al. (2017) Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* 60:2352–2360.
- Kochanek KD, et al. (2017) Mortality in the United States, 2016. *NCHS Data Brief* 1–8.
- Krištić J, et al. (2014) Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 69:779–789.
- Kikuchi N, Narimatsu H (2006) Bioinformatics for comprehensive finding and analysis of glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 1760:578–583.
- Khoury GA, et al. (2011) Proteome-wide post-translational modification statistics: Frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep* 1:90.
- Kifer D, et al. (2021) N-glycosylation of immunoglobulin G predicts incident hypertension. *J Hypertens* 39: 2527–2533.

- Klein A (2007) Human total serum N-glycome. *Adv Clin Chem* 46:51-85.
- Knežević A, et al. (2009) Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *J Proteome Res* 8:694–701.
- Knežević A, et al. (2010) Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology* 20:959–969.
- Kolarich D, et al. (2012) Determination of site-specific glycan heterogeneity on glycoproteins. *Nat Protoc* 7:1285-1298.
- Koles K, et al. (2007) Identification of N-glycosylated proteins from the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Glycobiology* 17:1388-1403.
- Krishnan S, et al. (2015) Combined high-density lipoprotein proteomic and glycomic profiles in patients at risk for coronary artery disease. *J Proteome Res* 14:5109–5118.
- Kristic J, et al. (2014) Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69:779–789.
- Kuribara T y Totani K. Oligomannose-type glycan processing in the endoplasmic reticulum and its importance in misfolding diseases. *Biology (Basel)* 2022;11:199.
- Kynclova P, et al. (2017) Correlation between compositional parts based on symmetric balances. *Math Geosc* 49:777-796.
- Laroy W, et al. (2006) Glycome mapping on DNA sequencing equipment. *Nat Protoc* 1:397–405.
- Lauc G, et al (2014) Epigenetic regulation of glycosylation is the quantum mechanics of biology. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1840:65–70.
- Lauc G, et al. (2016) Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta* 1860:1574–1582.
- Lauc G (2016) Precision medicine that transcends genomics: Glycans as integrators of genes and environment. *Biochim Biophys Acta* 1860:1571–1573.
- Lawler PR y Mora S. (2016) Glycosylation signatures of inflammation identify cardiovascular risk: some glycs it hot. *Circ Res* 119:1154–1156.
- Lemmers RFH, et al. (2017) IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in Independent European populations. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861: 2240–2249.
- Li H, et al. (2018) Modulation of immune-inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm: emerging molecular targets. *J Immunol Res* 2018:7213760.
- Liu L (2015) Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J Pharm Sci* 104:1866-1884.
- Liu D, et al. (2018) Ischemic stroke is associated with the pro-inflammatory potential of N-glycosylated immunoglobulin G. *J Neuroinflammation* 15:123.
- Lu G, et al. (2018) Capillary electrophoresis separations of glycans. *Chem Rev* 118:7867-7885.
- Lu JP, et al. (2011) Screening novel biomarkers for metabolic syndrome by profiling human plasma N-glycans in Chinese han and Croatian populations. *J Proteome Res* 10:4959–4969.
- Mariño K et al. (2010) A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol* 6:713-23.

- Mehdi MM, et al. (2012) Erythrocyte sialic acid content during aging in humans: Correlation with markers of oxidative stress. *Dis Markers* 32:179–186.
- Menni C, et al. (2018) Glycosylation profile of immunoglobulin G is cross-sectionally associated with cardiovascular disease risk score and subclinical atherosclerosis in two independent cohorts. *Circ Res* 122: 1555–1564.
- Merleev AA, et al. (2020) A site-specific map of the human plasma glycome and its age and gender-associated alterations. *Sci Rep* 10:17505. Murphy SL, et al. (2018) Mortality in the United States, 2017. *NCHS Data Brief* 1–8.
- Merry T y Astrautsova S (2003) Chemical and enzymatic release of glycans from glycoproteins. *Methods Mol Biol* 213:27-40.
- Mijakovac A, et al. (2022) Heritability of the glycan clock of biological age. *Front Cell Dev Biol* 10:982609.
- MIT's Magazine of Innovation. (2003) Technology Review. Disponible en <http://www2.technologyreview.com/featured-story/401775/10-emerging-technologies-that-will-change-the/>
- Miura Y, et al. (2015) Change in N-glycosylation of plasma proteins in Japanese semisupercentenarians. *PLoS One* 10:e0142645.
- Miura Y, Endo T (2016) Glycomics and glycoproteomics focused on aging and age-related diseases - Glycans as a potential biomarker for physiological alterations. *Biochim Biophys Acta* 1860:1608–1614.
- Miura Y, et al. (2018) Characteristic glycopeptides associated with extreme human longevity identified through plasma glycoproteomics. *Biochim Biophys Acta* 1862:1462–1471.
- Miyahara K, et al. (2013) Serum glycan markers for evaluation of disease activity and prediction of clinical course in patients with ulcerative colitis. *PLoS One* 8:e74861.
- Monti D, et al. (2017) Inflammaging and human longevity in the omics era. *Mech Ageing Dev* 165:129–138.
- Moore KJ. (2019) Targeting infammation in CVD: advances and challenges. *Nat Rev Cardiol* 16:74–75.
- Moremen KW, et al. (2012) Vertebrate protein glycosylation: Diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:448–462.
- Narimatsu H (2006) Human glycogene cloning: focus on β 3-glycosyltransferase and β 4-glycosyltransferase families. *Curr Opin Struct Biol* 16:567–575.
- Neelamegham S, et al. (2019) Updates to the symbol nomenclature for glycans guidelines. *Glycobiology* 29:620–624.
- Niemelä O (2016). Biomarker-based approaches for assessing alcohol use disorders. *Int J Environ Res Public Health* 13: 166.
- O'Flaherty R, et al. (2022) Changes in serum N-glycome for risk drinkers: a comparison with standard markers for alcohol abuse in men and women. *Biomolecules* 12:241.
- Ongay S, et al. (2012) Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis. *J Sep Sci* 35:2341-2372.
- Ormseth MJ, et al. (2015) Utility of a novel infammatory marker, GlycA, for assessment of rheumatoid arthritis disease activity and coronary atherosclerosis. *Arthritis Res Ther* 17:117.
- Otvos JD, et al. (2015) GlycA: a composite nuclear magnetic resonance biomarker of systemic infammation. *Clin Chem* 61:714–723.

Otvos JD, et al. (2018) Relations of GlycA and lipoprotein particle subspecies with cardiovascular events and mortality: a post hoc analysis of the AIM-HIGH trial. *J Clin Lipidol* 12:348–355.

Our World in Data (2020a) Life expectancy has improved globally. In: <https://Ourworldindata.Org/>. <https://ourworldindata.org/life-expectancy#lifeexpectancy-has-improved-globally>.

Parekh R, et al. (1988) Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *J Exp Med* 167:1731-1736.

Pavic T, et al. (2018) N-glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G in chronic obstructive pulmonary disease. *J Transl Med* 16:323.

Pawłowski T, et al. (1986) Studies on microheterogeneity of acute-phase proteins in rheumatoid arthritis by using crossed affinoimmuno-electrophoresis with free concanavalin A. *Behring Inst Mitt* 80:11–15.

Pinti M, et al. (2016) Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. *Eur J Immunol* 46:2286–2301.

Plavska B, et al. (2023) The N-glycosylation of total plasma proteins and IgG in atrial fibrillation. *Biomolecules* 13:605.

Pu Q y Yu C. (2014) Glycosyltransferases, glycosylation and atherosclerosis. *Glycoconj J* 31:605-11.

Pucic M, et al., (2011) High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics* 10:M111.010090.

Pucic M, et al. (2012) Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology* 22:975–982.

Purmalek MM, et al. (2019) Association of lipoprotein subfractions and glycoprotein acetylation with coronary plaque burden in SLE. *Lupus Sci Med* 6:e000332.

R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Radovani B, et al. (2023) IgG N-glycosylation is altered in coronary artery disease. *Biomolecules* 13:375.

Reiding KR, et al. (2017) Human plasma N-glycosylation as analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization-fourier transform ion cyclotron resonance-MS associates with markers of inflammation and metabolic health. *Mol Cell Proteomics* 16:228–242.

Rojas-Macias MA, et al (2019) Towards a standardized bioinformatics infrastructure for N- and O-glycomics. *Nat Commun* 10:3275.

Román-Viñas B, et al. (2013) Validity of the international physical activity questionnaire in the Catalan population (Spain). *Gac Sanit* 27:254–257.

Royle L, et al. (2006) Detailed structural analysis of N-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Methods Mol Biol* 347:125-143.

Royle L, et al. (2008) HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal Biochem* 376:1-12.

Rudd PM, et al. (2009) High throughput glycome analysis is set to join high throughput genomics. *J Proteome Res* 8:1105.

Rudman N, et al. (2022) Children at onset of type 1 diabetes show altered N-glycosylation of plasma proteins and IgG. *Diabetologia* 65: 1315–1327.

Ruhaak LR, et al. (2010). Decreased levels of bisecting GlcNAc glycoforms of IgG are associated with human longevity. *PLoS ONE* 5:e12566.

Ruhaak LR, et al. (2011) Plasma protein N-glycan profiles are associated with calendar age, familial longevity and health. *J Proteome Res* 10:1667–1674.

Ruhaak LR, et al. (2018) Mass spectrometry approaches to glycomic and glycoproteomic analyses. *Chem Rev* 118:7886–7930.

Russell AC, et al. (2017) The N-glycosylation of immunoglobulin G as a novel biomarker of Parkinson's disease. *Glycobiology* 27:501–510.

Salaspuro M (1999). Carbohydrate-deficient transferrin as compared to other markers of alcoholism: a systematic review. *Alcohol* 19:261–271.

Saldova R, et al. (2014) Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res* 13:2314–2327.

Sánchez Ruiz JC, et al. (2005). Utilidad del índice tobillo-brazo en Atención Primaria. *SEMERGEN* 31: 533-535.

Sarrats A, et al. (2010) Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Proteomics* 4:432–448.

Schwab I y Nimmerjahn F (2014) Role of sialylation in the anti-inflammatory activity of intravenous immunoglobulin - F(ab')₂ versus Fc sialylation. *Clin Exp Immunol* 178 Suppl 1:97-99.

SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. (2021) SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J* 42:2439-2454.

SCORE2-OP working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. (2021) SCORE2-OP risk prediction algorithms: estimating incident cardiovascular event risk in older persons in four geographical risk regions. *Eur Heart J* 42:2455-2467.

Scott DW et al. (2012) Role of endothelial N-glycan mannose residues in monocyte recruitment during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:e51–e59.

Scott DW y Patel RP. (2013) Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: Implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology* 23:622–633.

Shade KTC, et al. (2015) A single glycan on IgE is indispensable for initiation of anaphylaxis. *J Exp Med* 212:457–467.

Shetty V, et al. (2010) Investigation of sialylation aberration in N-linked glycopeptides by lectin and tandem labeling (LTL) quantitative proteomics. *Anal Chem* 82:9201-9210.

Shkunnikova S, et al. (2023) IgG glycans in health and disease: Prediction, intervention, prognosis, and therapy. *Biotechnol Adv* 2023;67:108169.

Sillanauke P, et al. (1999) Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest* 29:413-25.

Shkunnikova S, et al. (2023) IgG glycans in health and disease: Prediction, intervention, prognosis, and therapy. *Biotechnol Adv* 2023;67:108169.

Stambuk J, et al. (2020) Global variability of the human IgG glycome. *Aging (Albany NY)* 12:15222-15259.

Stöckmann H, et al. (2015) Automated, high-throughput serum glycoprofiling platform. *Integr Biol* 7:1026–1032.

Sukhorukov V, et al. (2019) Glycosylation of human plasma lipoproteins reveals a high level of diversity, which directly impacts their functional properties. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864:643–653.

Swirski FK & Nahrendorf M. (2018) Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 18:733–744.

Testa R, et al. (2015) N-Glycomic changes in serum proteins in type 2 diabetes mellitus correlate with complications and with metabolic syndrome parameters. *PLoS One* 10:e0119983.

Tijardović M, et al. (2019) Intense physical exercise induces an anti-inflammatory change in IgG N-glycosylation profile. *Front Physiol* 10:1522.

Titorenko VI. (2018) Molecular and cellular mechanisms of aging and age-related disorders. *Int J Mol Sci* 19:2049.

Trbojević-Akmačić I, et al. (2018) Plasma N-glycome composition associates with chronic low back pain. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862:2124–2133

Tsagris M, Athineou G (2022). Compositional: Compositional Data Analysis. R package version 5.4. <https://CRAN.R-project.org/package=Compositional>

Ueda K, et al. (2010) Development of serum glycoproteomic profiling technique; simultaneous identification of glycosylation sites and site-specific quantification of glycan structure changes. *Mol Cell Proteomics* 9:1819-1828.

van den Boogaart KG, et al. (2022) Compositions: Compositional Data Analysis. R package version 2.0-4. <https://CRAN.R-project.org/package=compositions>

Vanderschaeghe D, et al. (2009) GlycoFibroTest is a highly performant liver fibrosis biomarker derived from DNA sequencer-based serum protein glycomics. *Mol Cell Proteomics* 8:986–994.

Vanderschaeghe D, et al. (2010) High-throughput profiling of the serum N-glycome on capillary electrophoresis microfluidics systems: Toward clinical implementation of GlycoHepatoTest. *Anal Chem* 82:7408–7415.

Vanhooren V, et al. (2007) N-glycomic changes in serum proteins during human aging. *Rejuvenation Res* 10:521–531.

Vanhooren V, et al. (2008) N-glycan profiling in the study of human aging. *Biogerontology* 9:351–356.

Vanhooren V, et al. (2009) N-glycan profiles as tools in diagnosis of hepatocellular carcinoma and prediction of healthy human ageing. *Mech Ageing Dev* 130:92–97.

Vanhooren V, et al. (2010) Serum N-glycan profile shift during human ageing. *Exp Gerontol* 45:738–743.

Varki A, et al. (2008) *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Vilar-Bergua A, et al. (2015) N-glycome profile levels relate to silent brain infarcts in a cohort of hypertensives. *J Am Heart Assoc* 4:e002669.

Virani SS, et al. (2020) Heart disease and stroke Statistics-2020 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 141:e139–e596.

Wang H, et al. (2019) Next-generation (glycomic) biomarkers for cardiometabolic health: a community-based study of immunoglobulin G N-Glycans in a Chinese Han population. *OMICS J Integr Biol* 23:649–659.

Wickham H (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

Wittenbecher C, et al. (2020) Plasma N-glycans as emerging biomarkers of cardiometabolic risk: A prospective investigation in the EPIC Potsdam Cohort Study. *Diabetes Care* 43:661–668.


- Wood SN (2017) Generalized additive models: An introduction with R (2nd edition). Chapman and Hall/CRC.
- Wu WC, et al. (2016) Serum glycated albumin to guide the diagnosis of diabetes mellitus. *PLoS One* 11:e0146780.
- Wuhrer M (2013) Glycomics using mass spectrometry. *Glycoconj J* 30:11-22.
- Yang X y Bartlett MG (2019) Glycan analysis for protein therapeutics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1120:29-40.
- Yersin B, et al. (1995). Screening for excessive alcohol drinking: comparative value of carbohydrate-deficient transferrin, γ -glutamyltransferase, and mean corpuscular volume. *Arch Intern Med* 155: 1907–1911.
- Zaia J (2008) Mass spectrometry and the emerging field of glycomics. *Chem Biol* 15:881-892.
- Zhang P, et al. (2016) Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discov Today* 21:740-765.
- Zhang W, et al. (2011) Large-scale assignment of *N*-glycosylation sites using complementary enzymatic deglycosylation. *Talanta* 85:499-505.
- Zhao S, et al. (2018) GlycoStore: A database of retention properties for glycan analysis. *Bioinformatics* 34:3231–3232.
- Zaytseva OO, et al. (2020) Heritability of human plasma N-glycome. *J Proteome Res* 19:85–91.

ANEXOS

Anexo I

Cuestionario y CRD empleado en el estudio

Anexo I

| | |
|---|--|
| | |
| | <p style="text-align: center;">INFLAMACIÓN Y GLICACIÓN EN ENFERMEDADES PREVALENTES</p> |
| | <p style="text-align: center;">ESTUDIO A ESTRADA</p> |
| | <p style="text-align: center;">CUESTIONARIO</p> <p>Este es un estudio diseñado con la finalidad de obtener datos sobre el estado de salud y factores de riesgo en relación con la inflamación y la glicación. Estos procesos están relacionados con enfermedades que aparecen frecuentemente en la población, tales como la alergia, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. La importancia de estas enfermedades y la posibilidad de obtener una información valiosa a través de la realización este estudio nos impulsan a solicitar su colaboración de forma voluntaria.</p> <p>Por favor lea cada pregunta detenidamente antes de contestarlas. Si no está seguro de cómo contestar una pregunta, responda lo mejor que pueda. Recuerde que no hay respuestas correctas ni incorrectas. Las respuestas a este cuestionario se mantendrán confidenciales y se usarán sólo para fines de investigación. La información que dé se combinará con las respuestas de otros pacientes que completen el cuestionario y usted no será identificado de ninguna manera.</p> |
| | <p>Código Sujeto <input type="text"/></p> |
|  | <p>Fecha: <input type="text"/></p> |

DATOS DEMOGRÁFICOS

Conteste cada pregunta tal como se indica. Si no está seguro de cómo responder a una pregunta, por favor responda lo mejor que pueda y recuerde que no hay respuestas correctas o incorrectas.

EC: Estado Civil

- 1. Casado/a
- 2. Unión libre
- 3. Viudo/a
- 4. Divorciado/a
- 5. Separado/a
- 6. Soltero/a (nunca casado/a)

NE: Nivel de Estudios más alto que completó

- 1. No sabe leer ni escribir
- 2. No completó estudios de Graduado Escolar (EGB)
- 3. Graduado Escolar
- 4. ESO-EGB
- 5. Bachillerato
- 6. Formación Profesional
- 7. Diplomado/Ingeniero Técnico
- 8. Licenciado/Ingeniero/Grado
- 9. Doctorado

HL: Historia Laboral

HL1. ¿Ha trabajado durante un año o más, en los que haya percibido salario?

- 1. Sí
- 0. No

HL2. ¿Cuál es su situación laboral actual?

- 1. Trabajador
- 2. Baja laboral
- 3. Desempleado
- 4. Tareas del hogar
- 5. Jubilado
- 6. Estudiante
- 7. Otras

HL3. Profesión: _____

VIV: Vivienda

VIV1. Tipo:

- 1. Vive en un piso
- 2. Vive en una casa

VIV2. Calefacción:

- 1. Sí
- 0. No

VIV3 Antigüedad de la vivienda en años: _____

VIV4. ¿Tiene animales domésticos con pelo en casa (como perro, gato, cobaya, conejo)?

- 1. Sí
- 0. No

VIV5. ¿Tiene animales de labor (vacas, cerdos, gallinas,...)?

- 1. Sí
- 0. No

VIV6. ¿Tiene un lugar para almacenar hierba fresca o grano?

- 1. Sí
- 0. No

ACTIVIDAD FÍSICA

Estamos interesados en saber acerca de la clase de actividad física que la gente hace como parte de su vida diaria. Las preguntas se referirán acerca del tiempo que usted utilizó siendo físicamente activo(a) en los **últimos 7 días**. Por favor responda cada pregunta aún si usted no se considera una persona activa. Por favor piense en aquellas actividades que usted hace como parte del trabajo, en el jardín y en la casa, para ir de un sitio a otro, y en su tiempo libre de descanso, ejercicio o deporte.

Piense acerca de todas aquellas actividades **vigorosas** que usted realizó en los **últimos 7 días**. Actividades **vigorosas** son las que requieren un esfuerzo físico fuerte y le hacen respirar mucho más fuerte que lo normal. Piense *solamente* en esas actividades que usted hizo por lo menos 10 minutos continuos.

AF1. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días realizó usted actividades físicas **vigorosas** como levantar objetos pesados, excavar, aeróbicos, o pedalear rápido en bicicleta?

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física vigorosa → *Pase a la pregunta AF3*

AF2. ¿Cuánto tiempo en total usualmente le tomó realizar actividades físicas **vigorosas** en uno de esos días que las realizó?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

Piense acerca de todas aquellas actividades **moderadas** que usted realizó en los **últimos 7 días**. Actividades **moderadas** son aquellas que requieren un esfuerzo físico moderado y le hace respirar algo más fuerte que lo normal. Piense *solamente* en esas actividades que usted hizo por lo menos 10 minutos continuos.

AF3. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **moderadas** tal como cargar objetos livianos, pedalear en bicicleta a paso regular, o jugar dobles de tenis? No incluya caminatas.

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física moderada → *Pase a la pregunta AF5*

AF4. Usualmente, ¿Cuánto tiempo dedica usted en uno de esos días haciendo actividades físicas **moderadas**?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

Piense acerca del tiempo que usted dedicó a caminar en los **últimos 7 días**. Esto incluye trabajo en la casa, caminatas para ir de un sitio a otro, o cualquier otra caminata que usted hizo únicamente por recreación, deporte, ejercicio, o placer.

AF5. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días caminó usted por al menos 10 minutos continuos?

_____ **días por semana**

No caminó → *Pase a la pregunta AF 7*

AF6. Usualmente, ¿Cuánto tiempo gastó usted en uno de esos días **caminando**?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

La última pregunta se refiere al tiempo que usted permaneció **sentado(a)** en la semana en los **últimos 7 días**. Incluya el tiempo sentado(a) en el trabajo, la casa, estudiando, y en su tiempo libre. Esto puede incluir tiempo sentado(a) en un escritorio, visitando amigos(as), leyendo o permanecer sentado(a) o acostado(a) mirando televisión.

AF7. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuánto tiempo permaneció **sentado(a)** en un **día en la semana**?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

ALIMENTACIÓN

DIET1: ¿Cuántas comidas hace al día? _____

| | 1.Sí | 0.No |
|--|--------------------------|--------------------------|
| DIET2: ¿Desayuna, come y cena habitualmente en casa?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DIET3: ¿Suele comer acompañado?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DIET4: ¿Suele repetir?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DIET5: ¿Suele “picotear” entre horas?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

¿Qué desayuna habitualmente?

| | 1.Sí | 0.No |
|--|--------------------------|--------------------------|
| DNO1: Café, té, chocolate, cacao..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DNO2: Leche, yogur..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DNO3: Pan, tostadas, galletas, cereales..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DNO4: Bollería y repostería..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DNO5: Fruta y/o zumo..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DNO6: Alimentos como huevos, jamón, queso..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DNO7: Otro tipo de alimentos..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DNO8: Suele añadirle azúcar o miel al desayuno..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DNO9: Suele desayunar..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

FALI: ¿Con qué frecuencia consume los siguientes alimentos?

| | 1. A diario | 2. Tres veces a la semana pero no a diario | 3. Una o dos veces a la semana | 4. Menos de una vez a la semana | 5. Nunca o casi nunca |
|---|--------------------------|---|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| FALI1. Fruta fresca..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| FALI2. Carne (pollo, ternera, cerdo, cordero.....) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| FALI3. Huevos..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| FALI4. Pescado..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| FALI5. Pasta, arroz, patatas..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| FALI6. Pan, cereales..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| FALI7. Verduras y hortalizas..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| FALI8. Legumbres..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| FALI9. Embutidos y fiambres..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| FALI10. Productos lácteos (leche, queso, yogur.....) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| FALI11. Dulces (galletas, bollería, mermeladas.....) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| FALI12. Refrescos con azúcar..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |


REG1: ¿Ha “estado a dieta” en algún momento de su vida?

1. Sí
 0. No

REG2: Tipo de dieta _____

REG3: En el momento actual, ¿sigue usted alguna dieta o régimen especial?

1. Sí
 0. No

REG4: Tipo de dieta _____
 **CÓDIGO** _____

REG5: ¿Cuál es la razón por la que sigue esta dieta?

- 1. Para perder peso
- 2. Para mantener su peso actual
- 3. Para vivir más saludablemente
- 4. Por una enfermedad o problema de salud
- 5. Por otra razón

ES: Escala de somnolencia de Epworth

Estas preguntas se refieren a la probabilidad de que usted dé una cabezada, se adormile o se quede dormido en situaciones de su vida cotidiana reciente. Indique si es probable que dé una cabezada, se adormile o se quede dormido (no nos referimos a sentirse sólo cansado) en las siguientes situaciones. Aunque no haya hecho algunas de estas cosas últimamente, intente imaginar lo que le pasaría.

Por favor señale con una cruz la casilla que mejor corresponda a cada situación.

ES1: Sentado leyendo

- 0. Nunca se adormilaría
- 1. Pocas posibilidades de que se adormilase
- 2. Es posible que se adormilase
- 3. Grandes posibilidades de que se adormilase

ES2: Viendo la televisión

- 0. Nunca se adormilaría
- 1. Pocas posibilidades de que se adormilase
- 2. Es posible que se adormilase
- 3. Grandes posibilidades de que se adormilase

ES3: Sentado inactivo en un lugar público (por ej., en un teatro, un acto público o una reunión)

- 0. Nunca se adormilaría
- 1. Pocas posibilidades de que se adormilase
- 2. Es posible que se adormilase
- 3. Grandes posibilidades de que se adormilase

ES4: Como pasajero en un coche una hora seguida

- 0. Nunca se adormilaría
- 1. Pocas posibilidades de que se adormilase
- 2. Es posible que se adormilase
- 3. Grandes posibilidades de que se adormilase

ES5: Descansando echado por la tarde cuando las circunstancias lo permiten

- 0. Nunca se adormilaría
- 1. Pocas posibilidades de que se adormilase
- 2. Es posible que se adormilase
- 3. Grandes posibilidades de que se adormilase

ES6: Sentado charlando con alguien

- 0. Nunca se adormilaría
- 1. Pocas posibilidades de que se adormilase
- 2. Es posible que se adormilase
- 3. Grandes posibilidades de que se adormilase

ES7: Sentado tranquilamente después de una comida sin alcohol

- 0. Nunca se adormilaría
- 1. Pocas posibilidades de que se adormilase
- 2. Es posible que se adormilase
- 3. Grandes posibilidades de que se adormilase

ES8: En un coche al pararse unos minutos en el tráfico

- 0. Nunca se adormilaría
- 1. Pocas posibilidades de que se adormilase
- 2. Es posible que se adormilase
- 3. Grandes posibilidades de que se adormilase

SF36: ESTADO DE SALUD

Las preguntas que siguen se refieren a lo que usted piensa sobre su **salud en general**. Sus respuestas permitirán saber cómo se encuentra usted y hasta qué punto es capaz de hacer sus actividades habituales. Conteste cada pregunta tal como se indica. Si no está seguro de cómo responder a una pregunta, por favor responda lo mejor que pueda y recuerde que no hay respuestas correctas o incorrectas.

SF1. En general, usted diría que su salud es:

- 1. Excelente
- 2. Muy buena
- 3. Buena
- 4. Regular
- 5. Mala

SF2. ¿Cómo diría usted que es su salud actual, comparado con la de hace un año?

- 1. Mucho mejor ahora que hace un año
- 2. Más o menos igual que hace un año
- 3. Mucho peor ahora que hace un año
- 4. Algo mejor ahora que hace un año
- 5. Algo peor ahora que hace un año

Las siguientes preguntas se refieren a actividades o cosas que usted podría hacer en un día normal. Su salud actual, ¿le limita para hacer esas actividades o cosas? Si es así, ¿cuánto?

| | 1. Sí, me limita mucho | 2. Sí, me limita un poco | 3. No, no me limita nada |
|---|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| SF3: Esfuerzos intensos; tales como correr, levantar objetos pesados, o participar en deportes agotadores..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF4: Esfuerzos moderados; como mover una mesa, pasar la aspiradora, jugar a los bolos o caminar más de 1 hora..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF5: Coger o llevar la bolsa de la compra..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF6: Subir varios pisos por la escalera..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF7: Subir un solo piso por la escalera..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF8: Agacharse o arrodillarse..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF9: Caminar un kilómetro o más..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF10: Caminar varios centenares de metros..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF11: Caminar unos 100 metros..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF12: Bañarse o vestirse por sí mismo..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Durante las 4 últimas semanas, ¿ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de su salud física

| | 1.Sí | 0.No |
|--|--------------------------|--------------------------|
| SF13: ¿Tuvo que reducir el tiempo dedicado al trabajo o a sus actividades cotidianas?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF14: ¿Hizo menos de lo que hubiera querido hacer?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF15: ¿Tuvo que dejar de hacer algunas tareas en su trabajo o en sus actividades cotidianas?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF16: ¿Tuvo dificultad para hacer su trabajo o sus actividades cotidianas? (por ej, le costó más de lo normal)..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Durante las 4 últimas semanas, ¿ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de algún problema emocional (como estar triste, deprimido, o nervioso)?

1.Sí 0.No

- SF17:** ¿Tuvo que reducir el tiempo dedicado al trabajo o a sus actividades cotidianas por algún problema emocional?.....
- SF18:** ¿Hizo menos de lo que hubiera querido hacer, por algún problema emocional?.....
- SF19:** ¿No hizo su trabajo o sus actividades cotidianas tan cuidadosamente como de costumbre, por algún problema emocional?.....

SF20: Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta que punto su salud física o los problemas emocionales han dificultado sus actividades sociales habituales con la familia, los amigos, los vecinos u otras personas?

- 1. Nada
- 2. Un poco
- 3. Regular
- 4. Bastante
- 5. Mucho

SF21: ¿Tuvo dolor en alguna parte del cuerpo durante las 4 últimas semanas?

- 1. No, ninguno
- 2. Sí, muy poco
- 3. Sí, un poco
- 4. Sí, moderado
- 5. Sí, mucho
- 6. Sí, muchísimo

SF22: Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto el dolor le ha dificultado su trabajo habitual (incluido el trabajo fuera de casa y las tareas domésticas)?

- 1. Nada
- 2. Un poco
- 3. Regular
- 4. Bastante
- 5. Mucho

Las preguntas que siguen se refieren a cómo se ha sentido y cómo le han ido las cosas durante las 4 últimas semanas. En cada pregunta responda lo que se parezca más a cómo se ha sentido usted. Durante las 4 últimas semanas ¿cuánto tiempo....

| | 1. Siempre | 2. Casi siempre | 3. Muchas veces | 4. Algunas veces | 5. Sólo alguna vez | 6. Nunca |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SF23: se sintió lleno de vitalidad?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF24: estuvo muy nervioso?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF25: se sintió tan bajo de moral que nada podía animarle?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF26: se sintió calmado y tranquilo?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF27: tuvo mucha energía?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF28: se sintió desanimado y triste?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF29: se sintió agotado?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF30: se sintió feliz?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF31: se sintió cansado?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

SF32: Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia la salud física o los problemas emocionales le han dificultado sus actividades sociales (como visitar a los amigos o familiares)?

- 1. Siempre
- 2. Casi siempre
- 3. Algunas veces
- 4. Sólo alguna vez
- 5. Nunca

Por favor, diga si le parece **CIERTA** o **FALSA** cada una de las siguientes frases:

| | 1. Totalmente cierta | 2. Bastante cierta | 3. No lo sé | 4. Bastante falsa | 5. Totalmente falsa |
|---|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| SF33: Creo que me pongo enfermo más fácilmente que otras personas..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF34: Estoy tan sano como cualquiera.. | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF35: Creo que mi salud va a empeorar | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| SF36: Mi salud es excelente..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

ALCOHOL Y TABACO

Estas preguntas son sobre el **consumo de alcohol y tabaco**. Por favor responda lo mejor que pueda y recuerde que no hay respuestas correctas o incorrectas.

CONSUMO DE TABACO

Conteste a las siguientes cuestiones, haciendo referencia a toda su vida.

TAB1. ¿Ha fumado alguna vez?

- 1. No, no he fumado nunca
- 2. Sí, he fumado sólo en alguna ocasión
- 3. Sí, actualmente fumo
- 4. Sí, pero ya no fumo

TAB2. ¿Qué edad tenía cuando empezó a fumar? _____ años

TAB3. ¿Qué edad tenía cuando dejó de fumar? _____ años

TAB4. En promedio, ¿cuántos cigarrillos fuma o fumaba?

_____ por Día Semana Mes Año

CONSUMO DE ALCOHOL

Conteste a las siguientes cuestiones, haciendo referencia a toda su vida.

ALC1. ¿Con qué frecuencia bebe algún tipo de bebida alcohólica?

- 1. No he bebido ni bebo ningún tipo de bebida alcohólica
- 2. Sí, pero de forma ocasional, en celebraciones y fiestas
- 3. Bebía de forma habitual en el pasado, y lo dejé hace _____ meses/años
- 4. Bebo habitualmente los fines de semana
- 5. Bebo habitualmente todos los días
- 6. Bebo habitualmente todos los días y más los fines de semana

ALC2. ¿Cuántas consumiciones de bebidas alcohólicas suele realizar un día de consumo normal?

- Caña, botellín de cerveza _____ (número de cervezas al día)
- Vasos de vino _____ (número de vasos al día)
- Copas licor, aguardiente _____ (número de copas al día)

ALC3. ¿Cuántas consumiciones de bebidas alcohólicas suele realizar un día de fin de semana?

- Caña, botellín de cerveza _____ (número de cervezas al día)
- Vasos de vino _____ (número de vasos al día)
- Copas licor, aguardiente _____ (número de copas al día)

ALC4. ¿Qué edad tenía cuando comenzó a beber bebidas alcohólicas? _____ años

ALC5. ¿Qué edad tenía cuando dejó de beber bebidas alcohólicas? _____ años

AUDIT: Test de Identificación de Trastornos Relacionados con el Uso del Alcohol

Conteste a las siguientes cuestiones, haciendo referencia al último año.

AU1. ¿Con qué frecuencia toma alguna “bebida” que contenga alcohol?

- Nunca
- Una o menos veces al mes
- 2-4 veces al mes
- 2-3 veces por semana
- 4 ó más veces por semana

AU2. ¿Cuántas “bebidas alcohólicas” toma durante un día típico en el que ha bebido?

- 1 ó 2
- 3 ó 4
- 5 ó 6
- 7 a 9
- 10 ó más

AU3. ¿Con qué frecuencia toma seis “bebidas” o más en una sola ocasión?

- Nunca
- Menos de una vez al mes
- Mensualmente
- Semanalmente
- A diario o casi a diario

AU4. ¿Con qué frecuencia en el último año ha sentido incapacidad de parar de beber una vez que había comenzado?

- Nunca
- Menos de una vez al mes
- Mensualmente
- Semanalmente
- A diario o casi a diario

AU5. ¿Con qué frecuencia durante el último año no pudo hacer lo que normalmente se esperaba de usted debido a la bebida?

- Nunca
- Menos de una vez al mes
- Mensualmente
- Semanalmente
- A diario o casi a diario

AU6. Durante el último año, ¿con qué frecuencia necesitó tomar alguna “bebida alcohólica” por la mañana para poder ponerse en funcionamiento después de una noche de haber bebido mucho?

- Nunca
- Menos de una vez al mes
- Mensualmente
- Semanalmente
- A diario o casi a diario

AU7. Durante el último año, ¿con qué frecuencia se sintió culpable o con remordimientos después de haber bebido?

- Nunca
- Menos de una vez al mes
- Mensualmente
- Semanalmente
- A diario o casi a diario

AU8. Durante el último año, ¿en cuántas ocasiones no fue capaz de recordar lo que le había pasado la noche anterior por haber estado bebiendo?

- Nunca
- Menos de una vez al mes
- Mensualmente
- Semanalmente
- A diario o casi a diario

AU9. ¿Usted u otra persona ha sufrido algún daño como consecuencia de que usted hubiera bebido?

- No
- Sí, pero no en el último año
- Sí, el último año

AU10. ¿Algún pariente, amigo, médico o profesional sanitario le ha expresado su preocupación por su consumo de alcohol o le ha sugerido dejar de beber?

- No
- Sí, pero no en el último año
- Sí, el último año

Comentarios:

¡Muchas gracias por su tiempo! Por favor, no olvide entregarle este cuestionario cubierto al técnico encargado del estudio en el Centro de Salud de A Estrada

INFLAMACIÓN Y GLICACIÓN EN ENFERMEDADES PREVALENTES

ESTUDIO A ESTRADA

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

Este es un estudio diseñado con la finalidad de obtener datos sobre el estado de salud y factores de riesgo en relación con la inflamación y la glicación. Estos procesos están relacionados con enfermedades que aparecen frecuentemente en la población, tales como la alergia, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. La importancia de estas enfermedades y la posibilidad de obtener una información valiosa a través de la realización de este estudio nos impulsan a solicitar su colaboración de forma voluntaria.

Código Sujeto

Fecha:

INFORMACIÓN MÉDICA Y DEMOGRÁFICA

Fecha de Nacimiento: ____ / ____ / ____

Edad: ____ años

Sexo: 0. Mujer 1. Varón

Lugar de nacimiento: _____

Domicilio: _____

Teléfono fijo: _____ **Teléfono móvil:** _____

Correo electrónico: _____

Antecedentes Familiares: Enfermedad Cardiovascular

Preguntar si alguien de la familia, padeció del corazón o tuvo un derrame o trombosis o murió de repente. En caso afirmativo, ¿quién y cuantos años tenía o tiene?

1. Sí, en caso de padre o hermano < 55 años o madre o hermana < 65 año hayan padecido angor, IAM, enfermedad arterial periférica, ACV o muerte súbita
0. No, en caso contrario

Fármacos que toma de forma habitual

HISTORIAL FARMACOTERAPEUTICO. IMPRESIÓN Y COMPROBACION (tachar o inactivar previamente la medicación que no esté tomando)

MÉDICO

¿Padece o ha padecido alguna de las siguientes enfermedades?

| | | | Antigüedad en años |
|--|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| HTA | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Diabetes Mellitus | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Dislipemia | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Cardiopatía isquémica (angor, infarto, ...) | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Insuficiencia cardíaca | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Arteriopatía periférica | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Insuficiencia Renal | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Hepatopatía | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Asma | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| EPOC | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| SAOS | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Depresión | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Reumatismo inflamatorio o artritis | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Enfermedad vascular cerebral | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Osteoporosis | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Cáncer | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Enfermedad Inflamatoria intestinal | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Psoriasis | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Dermatitis atópica | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Enfermedad tiroidea | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Úlcera gastroduodenal | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Migraña | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |
| Otras patologías crónicas (especificar) | 1. Si <input type="checkbox"/> | 0. No <input type="checkbox"/> | |

MÉDICO

ALERGIA

- ALE1: ¿Se le tapa la nariz con frecuencia sin tener catarro?..... 1.Sí 0.No
- ALE2: ¿Le pica la nariz y estornuda cuando hay polvo o si sale al campo en primavera? 1.Sí 0.No
- ALE3: ¿Suele tener agüilla en la nariz?..... 1.Sí 0.No
- ALE4: ¿Le pican con frecuencia los ojos?..... 1.Sí 0.No
- ALE5: ¿Se le ponen rojos y le lloran?..... 1.Sí 0.No
- ALE6: ¿Le pican los oídos o el cielo de la boca?..... 1.Sí 0.No
- ALE7: ¿Ha tenido alguna vez dificultad para respirar en el pecho con ruidos como pitos? 1.Sí 0.No
- ALE8: ¿Tiene eccemas en la piel: piel roja, que pica (señalar flexuras)?..... 1.Sí 0.No
- ALE9: ¿Ha tenido últimamente parásitos en el intestino como tienen los niños?..... 1.Sí 0.No
- ALE10: ¿Le ha picado alguna vez una abeja/avispa?..... 1.Sí 0.No
- ALE11: ¿Cuánto tiempo ha transcurrido desde la última picadura?..... _____ meses
- ALE12: ¿Le ha picado alguna vez una garrapata? 1.Sí 0.No
- ALE13: ¿Cuánto tiempo ha transcurrido desde la última picadura? _____ meses
- ALE14: ¿Alguna vez le han diagnosticado o le han dicho que tenía asma? 1.Sí 0.No
- ALE15: ¿Ha tomado alguna vez inhaladores por la boca para los bronquios (se le debe aclarar que no son inhaladores nasales)?..... 1.Sí 0.No

ENFERMERÍA

ANTROPOMETRÍA

Peso _____ Kg.

Talla _____ cm.

Diámetro Cintura _____ cm.

Diámetro Cadera _____ cm.

PRESIÓN ARTERIAL

Sistólica 1ª toma _____ mmHg

2ª toma _____ mmHg

Diastólica 1ª toma _____ mmHg

2ª toma _____ mmHg

Índice tobillo-brazo: Derecho: _____

Izquierdo: _____

Monofilamento: Derecho: _____

Izquierdo: _____

ELECTROCARDIOGRAMA

Frasco para recogida de orina

CUESTIONARIO ENFERMERÍA: DATOS SOCIALES

“A continuación, si no le importa, me gustaría hacerle unas preguntas para saber sus condiciones sociales”.

DS1: ¿Vive solo?

1. Sí (Si la respuesta es afirmativa, saltar las 2 siguientes preguntas, ir a DS4)

0. No

ENFERMERÍA

DS2: ¿Cuántas personas viven en su casa? _____ personas

DS3: ¿Quiénes son las personas que viven en su casa? (Señalar tantas opciones como personas convivan)

- 1. Pareja
- 2. Hijos
- 3. Hijos políticos
- 4. Padre
- 5. Madre
- 6. Suegro/a
- 7. Nietos
- 8. Hermanos
- 9. Abuelos
- 10. Pareja de su padre o de su madre
- 11. Hijos de su pareja
- 12. Tíos
- 13. Amigos
- 14. Otros (anotar quien) _____

DS4: ¿Dedica parte de su tiempo a cuidar a alguna persona que dependa de usted por razones de salud o discapacidad?

- 1. Sí
- 2. No
- 3. No, porque por salud o discapacidad no está en condiciones de cuidar de nadie
- 4. No, porque necesita que le cuiden a usted

En el caso de que cuide a alguna persona preguntar:

DS5: ¿Cuál es su relación con esa persona?

- 1. Familiar (especificar) _____
- 2. Laboral
- 3. Otros (especificar) _____

DS6: ¿Considera que como consecuencia del tiempo que dedica al cuidado de esa persona **NO dispone de tiempo suficiente para alguna de las siguientes actividades?**

- 1. Tiempo libre para su ocio
- 2. Cuidado de su familia (hijos, pareja, etc.)
- 3. Actividades relacionadas con su profesión
- 4. Atención a su propia salud
- 5. Relacionarse con sus amigos
- 6. Otros (especificar) _____
- 7. No me quita tiempo para ninguna actividad

DS7. La persona que usted cuida, ¿está encamada?

- 1. Sí
- 0. No

DS8. La persona que usted cuida, ¿usa pañales de incontinencia?

- 1. Sí
- 0. No

DS9. La persona que usted cuida, ¿necesita ayuda para realizar alguna de las siguientes actividades?

- 1. Higiene personal
- 2. Comer
- 3. Vestirse
- 4. Moverse
- 5. Puede realizar sin ninguna ayuda todas ellas

MATERNIDAD Y CICLO MENSTRUAL

CM1: ¿Alguien de su familia ha padecido de cáncer de ovarios y/o de mamá?

- 1. Sí
- 0. No

CM2: En caso afirmativo, ¿quién o quiénes?

- 0. Madre
- 1. Abuela (materna)
- 2. Hermana
- 3. Tía (materna)
- 4. Prima (materna)
- 5. Sobrina (materna)
- 6. Nieta (hija de hija)

CM3: ¿Ha tenido hijos?

- 1. Sí
- 0. No (ir a la pregunta CM7)

En el caso de que tenga hijos preguntar:

CM4: ¿Cuántos? _____ hijos

ENFERMERÍA

CM5: ¿Le ha dado el pecho durante al menos 3 meses a alguno de sus hijos?

- 1. Sí
- 0. No

CM6: ¿A qué edad tuvo a su primer hijo? _____ años

CM7: ¿A qué edad tuvo su primer ciclo menstrual (menarquía)? _____ años

CM8: ¿Tiene la menopausia?

- 1. Sí
- 0. No (ir a la pregunta CM11)

En el caso de que tenga la menopausia preguntar:

CM9: ¿A qué edad tuvo su último ciclo menstrual? _____ años

CM10: ¿Ha recibido algún tratamiento para combatir los síntomas de la menopausia como es la terapia hormonal sustitutiva?

- 1. Sí
- 0. No

En el caso de que no tenga la menopausia:

CM11: ¿Cuál es la fecha del primer día de su último ciclo menstrual? _____

CM12: ¿Cuántos días le suele durar? _____ días

CM13: ¿Su ciclo menstrual suele ser doloroso?

- 1. Sí
- 0. No

CM14: ¿Su ciclo menstrual suele ser regular?

- 1. Sí
- 0. No

CM15: ¿Toma anticonceptivos?

- 1. Sí
- 0. No

En el caso de que tome anticonceptivos:

CM16: ¿Qué anticonceptivos utiliza? (Escribir la marca) _____

Anexo II

Autorizaciones Comité Ético de Investigación de Galicia

Dictamen del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (I)



Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia
Edificio Administrativo de San Lázaro
15781 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tlf: 881 546425 Fax: 881 541804
ceic@sergas.es

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALICIA

Dña. Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 21/12/2010 el estudio:

Título: Marcadores de inflamación y su relación con enfermedades frecuentes en la población general adulta

Promotor: Arturo González Quintela

Version:

Código do Promotor:

Código de Registro CEIC de Galicia: 2010/315

Y que este Comité de conformidad con sus Procedimientos Normalizados de Trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registros, emite un **DICTAMEN FAVORABLE** al estudio propuesto y que se llevará a cabo en:

| Centros | Investigadores principales |
|--------------------------------|----------------------------|
| C.H. Universitario de Santiago | Arturo González Quintela |

En Santiago de Compostela a 03 de enero de 2011

La Secretaria



Paula M. López Vázquez

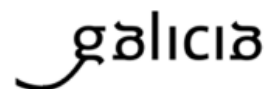


Dictamen del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (II)



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es



DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 18/10/2016 o estudo:

Título: Marcadores glicómicos de inflamación y su relación con enfermedades frecuentes en la población adulta

Promotor: Arturo González Quintela

Tipo de estudo: Outros

Código de Rexistro: 2016/464

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así coma os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e o RD 1090/2015, de 4 de decembro, polo que se regulan os ensaios clínicos con medicamentos, os Comités de Ética da Investigación con medicamentos e Rexistro Español de Estudos Clínicos
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así coma os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Tralado do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo polo/a investigador/a do centro:

| Centros | Investigadores Principais |
|--------------------------------|---------------------------|
| C.H. Universitario de Santiago | Arturo González Quintela |

En Santiago de Compostela, a 18 de outubro de 2016
O secretario



Juan M. Vázquez Lago

Anexo III

Lista de verificación de Strobe

| Sí/No/NA | | página |
|---------------------------|--|-----------------|
| Título y resumen | | |
| Si | Indique, en el título o en el resumen, el diseño del estudio | 13 |
| Si | Proporcione en el resumen una sinopsis informativa y equilibrada de lo que se ha hecho y lo que se ha encontrado. | 13,14 |
| Introducción | | |
| Si | Indique el fundamento científico de la Investigación que se comunica | 21-36 |
| Objetivos | | |
| Si | Indique los objetivos específicos, incluida cualquier hipótesis preespecificada | 41 |
| Material y métodos | | |
| Diseño del estudio | | |
| Si | Presente los elementos clave del diseño del estudio | 45 |
| Contexto | | |
| Si | Describa el marco, los lugares y las fechas relevantes, incluidos los períodos de reclutamiento, exposición, seguimiento y recogida de datos. | 45 |
| Participantes | | |
| NA | Para estudios de cohortes: proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el método de selección de los participantes. Especifique los métodos de seguimiento | |
| NA | Estudios de casos y controles: proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el proceso diagnóstico de los casos y el de selección de los controles. | |
| Si | Estudios transversales: proporcione los criterios de elegibilidad y las fuentes y métodos de selección de los participantes | 45 |
| NA | Estudios de cohortes apareados. Proporcione los criterios para la formación de parejas y el número de participantes con y sin exposición | |
| NA | Estudios de casos y controles apareados. Proporcione los criterios para la formación de las parejas y el número de controles por cada caso | |
| Variables | | |
| Si | Defina claramente todas las variables: de respuesta, exposiciones, predictoras, confusoras y modificadoras del efecto. Si procede, proporcione los criterios diagnósticos | 46-50 |
| Fuentes de datos/medidas | | |
| Si | Para cada variable de interés, proporcione las fuentes de datos y los detalles de los métodos de valoración (medida). | 46-50 |
| NA | Si hubiera más de un grupo, especifique la comparabilidad de los procesos de medida | |
| Sesgos | | |
| Si | Especifique todas las medidas adoptadas para afrontar fuentes potenciales de sesgo | 91-94 |
| Tamaño muestral | | |
| Si | Explique cómo se determinó el tamaño muestral | 45 |
| Variables cuantitativas | | |
| Si | Explique cómo se trataron las variables cuantitativas en el análisis. Si procede, explique cómo se categorizaron y por qué | 46-50 |
| Métodos estadísticos | | |
| Si | Especifique todos los métodos estadísticos, incluidos los empleados para controlar los factores de confusión | 56-59 |
| Si | Especifique todos los métodos utilizados para analizar subgrupos e interacciones | 56-59 |
| Si | Explique el tratamiento de los datos ausentes (missing data) | 46-50; 56-59 |
| NA | Estudio de cohortes: si procede, explique cómo se afrontan las pérdidas en el seguimiento | |
| NA | Estudios de casos y controles: si procede, explique cómo se aparearon casos y controles | |
| Si | Estudios transversales: si procede, especifique cómo se tiene en cuenta en el análisis la estrategia de muestreo | 45 |

| | | |
|-------------------------------------|---|--------|
| Si | Describa los análisis de sensibilidad | |
| Resultados | | |
| Participantes | | |
| Si | Número de participantes en cada fase del estudio; por ejemplo: cifras de los participantes potencialmente elegibles, los analizados para ser incluidos, los confirmados elegibles, los incluidos en el estudio, los que tuvieron un seguimiento completo y los analizados | 45 |
| Si | Razones de la pérdida de participantes en cada fase | 45 |
| Si | Considere el uso de un diagrama de flujo | 45 |
| Datos descriptivos | | |
| Si | Características de los participantes en el estudio (p. ej., demográficas, clínicas, sociales) e información sobre exposiciones y posibles factores de confusión | 46-50 |
| Si | Número de participantes con datos ausentes en cada variable de interés | 46-50 |
| NA | Estudios de cohortes: resume el período de seguimiento (p. ej., promedio y total) | |
| Datos de las variables de resultado | | |
| NA | Estudios de cohortes: describa el número de eventos del efecto, o bien proporcione medidas resumen a lo largo del tiempo | |
| NA | Estudios de casos y controles: describa el número de participantes en cada categoría de exposición, o bien proporcione medidas resumen de exposición | |
| Si | Estudios transversales: describa el número de eventos del efecto, o bien proporcione medidas resumen | 56 |
| Resultados principales | | |
| Si | Proporcione estimaciones crudas (no ajustadas) y, si procede, ajustadas por factores de confusión, así como su precisión (p. ej., intervalos de confianza del 95%). Especifique los factores de confusión por los que se ajusta y las razones para incluirlos | 81 |
| NA | Si fuera pertinente, valore acompañar las estimaciones del riesgo relativo con estimaciones del riesgo absoluto para un período de tiempo relevante | |
| Otros análisis | | |
| Si | Describa otros análisis efectuados (de subgrupos, interacciones o sensibilidad) | 81-85 |
| Discusión | | |
| Resultados clave | | |
| Si | Resume los resultados principales de los objetivos del estudio | 96 |
| Limitaciones | | |
| Si | Discuta las limitaciones del estudio, teniendo en cuenta posibles fuentes de sesgo o de imprecisión. Razone tanto sobre la dirección como sobre la magnitud de cualquier posible sesgo | 91-94 |
| Interpretación | | |
| Si | Proporcione una interpretación global prudente de los resultados considerando objetivos, limitaciones, multiplicidad de análisis, resultados de estudios similares y otras pruebas empíricas relevantes | 94-105 |
| Generabilidad | | |
| Si | Discuta la posibilidad de generalizar los resultados (validez externa) | 94 |
| Financiación | | |
| Si | Especifique la financiación y el papel de los patrocinadores del estudio y, si procede, del estudio previo en el que se basa el presente trabajo | 9 |



En este estudio, de diseño transversal, se analiza el N-glicoma sérico de una población adulta de 1516 sujetos seleccionados al azar, con la finalidad de investigar su asociación con la edad, el género y la enfermedad cardiovascular.

Los resultados sugieren que el N-glicoma sérico podría ser un marcador de envejecimiento inflamatorio no saludable (de acuerdo con la hipótesis del inflammaging). Determinados cambios en el N-glicoma sérico se asocian a enfermedades cardiovasculares.