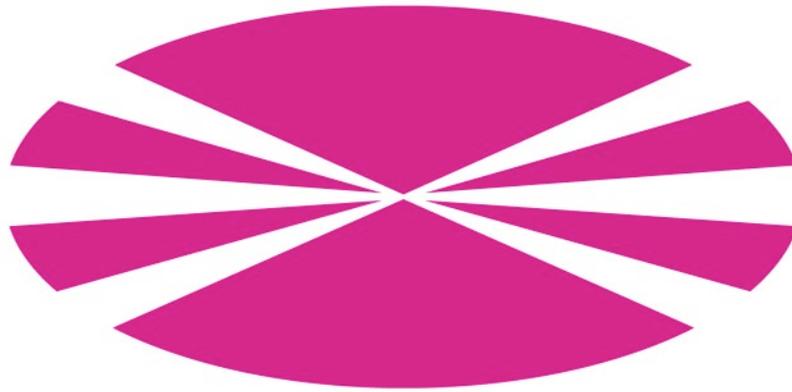


# UNIVERSIDADE DA CORUÑA



## TESIS DOCTORAL

**Estudio de los microRNAs como  
biomarcadores no invasivos de rechazo  
post-trasplante cardiaco**

**Ignacio Pedro Constanso Conde**

**Diciembre 2023**



# **Estudio de los microRNAs como biomarcadores no invasivos de rechazo post-trasplante cardiaco**

Autor: Ignacio Pedro Constanso Conde

---

Tesis Doctoral UDC / 2023

Directora y Tutora: Dra Lucía Núñez Fernández

Directora: Dra María Generosa Crespo Leiro

Programa Oficial de Doctorado en Ciencias de la Salud



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



**Dña. Lucía Núñez Fernández**, Doctora en Farmacología, Profesora Titular da Universidade da Coruña, Grupo de investigación GRINCAR, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Enfermería y Podología, Universidade da Coruña

**Dña. María Generosa Crespo Leiro**, Doctora en Medicina, Profesora Titular de Medicina de la Universidade da Coruña y Jefa de Sección de la Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante Cardíaco del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

### **Certifican**

Que el trabajo contenido en la presente memoria y titulado:

# **Estudio de los microRNAs como biomarcadores no invasivos de rechazo post-trasplante cardíaco**

Que para optar al grado de Doctor presenta **Don Ignacio Pedro Constanso Conde**, Licenciado en Químicas, ha sido realizado bajo nuestra dirección y reúne las características precisas para su presentación y defensa pública como Tesis Doctoral.

A Coruña, 22 de Diciembre de 2023

**Dra Lucía Núñez Fernández**

**Dra María Generosa Crespo Leiro**



Resultados parciales de la investigación que nuclea en esta Tesis Doctoral han dado lugar a un artículo científico publicado en Octubre de 2020 en la revista ***Journal of Heart and Lung Transplantation***. Se trata de una publicación indexada, que sigue proceso de revisión por pares y cuyo factor de impacto Journal Citation Report (JCR) correspondiente al año 2022 es de 8.9. El artículo, cuya referencia se muestra a continuación, se adjunta como material suplementario (Anexo I).

**Constanso-Conde I**, Hermida-Prieto M, Barge-Caballero E, Núñez L, Pombo-Otero J, Suárez-Fuentetaja N, Paniagua-Martín MJ, Barge-Caballero G, Couto-Mallón D, Pan-Lizcano R, Vázquez-Rodríguez JM, Crespo-Leiro MG. Circulating miR-181a-5p as a new biomarker for acute cellular rejection in heart transplantation. J Heart Lung Transplant. 2020 Oct;39(10):1100-1108. doi: 10.1016/j.healun.2020.05.018. Epub 2020 Jun 7. PMID: 32654912.

Esta investigación ha contado con financiación obtenida de una convocatoria competitiva: Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto N<sup>o</sup> Expediente PI15/02224).

El grupo de Investigación es miembro del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV) CB16/11/00425, Instituto Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, del que recibe financiación regular, y fue cofinanciado con fondos FEDER.



## - AGRADECIMIENTOS -

En primer lugar quiero agradecer a la **Dra Marisa Crespo**, directora de esta Tesis, dejarme formar parte de su maravilloso equipo de investigación en Insuficiencia Cardíaca y Transplante Cardíaco. Su labor científica es sobradamente conocida por todo el mundo que se dedica a este campo de la medicina. Su clara visión científica y conocimiento de todos los aspectos que rodean a la insuficiencia cardíaca facilitan mucho el trabajo de todas las personas que aprendemos con ella. Pero, sin duda, la mayor ayuda siempre han sido sus palabras de ánimo cuando las necesitaba, que no han sido pocas veces. Esto demuestra su calidad y calidez como persona. Muchísimas gracias Marisa, sin tu ayuda, hoy no presentaría este trabajo.

En segundo lugar, agradecer a la **Dra Lucía Núñez**, co-directora y tutora de esta Tesis, la paciencia para trabajar conmigo en el día a día. Sus acertados consejos prácticos siempre fueron bienvenidos, más si cabe en un proyecto como este donde, si no tienes una buena capitana, nunca llegas a buen puerto. Gracias Lucía, ha sido un placer trabajar a tu lado.

Gracias a todo el **equipo de investigación del Insuficiencia Cardíaca**, tanto en el Inibic, como en CHUAC. Tod@s l@s que formamos parte de él, sabemos que ninguno podría desarrollar su labor científica sin la labor conjunta de todo el equipo. También dar gracias a la **Dra Natalia Suárez** por abrirme el camino en este estupendo grupo. Gracias a tod@s.

Gracias a tod@s mis compañer@s del Laboratorio de Análisis Clínicos del CHUAC, en especial a mi madre gallega, **Loli Rivas**, que me acogió desde el primer día en su laboratorio de Urgencias como a un hijo. A **Carmela, Hilde, Blanca, Dolo, Pastora, Montse, Fernando, Camino, Asun, Luis, Clara**,... Gracias a tod@s.



## - AGRADECIMIENTOS -

Ahora tengo que echar la vista atrás y agradecer a todas las personas que han hecho posible que me convierta en Doctor aquí, en A Coruña, la ciudad en la que casi me he sentido como en mi querido **Xixón** (Asturias).

En primer lugar quiero agradecer a mi **madre**, ahora ya “güela” **Lola**, que siempre me ha enseñado a mirar todo con un punto de vista diferente, donde el arte siempre ha sido tan importante como la ciencia. Esto siempre me ha ayudado en todos los aspectos de mi vida, incluida esta Tesis. Gracias mamá, soy como soy por ti.

Gracias a mis **hermanas, Sandra y Geli**, por acompañarme en tantas aventuras desde pequeños, desde el bosque encantado de Quintueles hasta hoy, que vemos a nuestros hijos jugar juntos.

Gracias a mi **padre** “Champi”, por enseñarme que a veces hay que tirar para adelante aunque no estén todos los cabos bien amarrados.

Gracias a mi querida **güelina** “Titita”, que me crió. Me acuerdo de ti todos los días.

A toda mi familia de siempre, los que están y los que se fueron, a mi “nueva” familia de **Muros de Nalón** y a los amigos que siguen remando a mi lado.

Gracias a mis **hijos Victoria y Matías**, porque cuando las cosas se ponen un poco cuesta arriba, sólo con mirarlos a los ojos todo lo demás pierde importancia. Me hacéis la persona más feliz del mundo, sois la alegría de la vida.



## - DEDICATORIA -

Esta tesis está dedicada **a mi mujer Marina**, la mejor compañera de viaje que se pueda imaginar. Su amor por la ciencia es contagioso y eso ha hecho que intentara parecerme a ella, aunque fuera de lejos, a través de esta Tesis. Gracias por ensañarme tanto y por representar a esas mujeres científicas que aman lo que hacen y no están dispuestas a renunciar a ello, pese a los escollos que todos los días este mundo, incluido el científico, les pone.



# - ÍNDICE -

	Pag
ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1. La insuficiencia cardiaca.....	13
1.2. El trasplante cardiaco.....	17
1.3. Complicaciones post-trasplante cardiaco.....	21
1.3.1. Fracaso primario del injerto.....	22
1.3.2. Rechazo Agudo.....	22
1.3.3. Enfermedad vascular del injerto.....	23
1.4. Seguimiento del trasplante cardiaco.....	27
1.4.1. Biopsia Endomiocárdica. Limitaciones.....	28
1.4.2. Biomarcadores no invasivos de rechazo celular agudo.....	31
1.4.2.1. Imagen: ecocardiograma y resonancia magnética.....	31
1.4.2.2. Perfiles de expresión génica (AlloMap®).....	32
1.4.2.3. DNA libre derivado del donante.....	33
1.4.2.4. microRNAs.....	34
1.5. Los microRNAs.....	35
1.5.1. Biología .....	35
1.5.2. Aplicaciones clínicas.....	39

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	41
2.1. Literatura previa: microRNAs en el seguimiento de TxC.....	41
2.2. microRNAs en TxC, aportaciones de este estudio.....	45
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
4.1. Diseño del estudio.....	49
4.1.1. Fase de búsqueda.....	50
4.1.2. Fase de validación.....	51
4.2. Biopsias Endomiocárdicas, Rechazo Celular Agudo y Régimen inmunosupresor.....	52
4.3. Análisis de microRNAs en el laboratorio.....	53
4.3.1. Preanalítica de las muestras.....	53
4.3.2. Extracción de microRNAs del suero.....	54
4.3.3. RT ( <i>Reverse Transcriptase</i> ).....	55
4.3.4. qPCR ( <i>quantification Polimerase Chain Reaction</i> ).....	57
4.3.5. Tratamiento de los resultados. Normalización.....	59
4.4. Análisis estadístico.....	61
5. RESULTADOS.....	63
5.1. Población de estudio.....	63
5.2. Fase de búsqueda .....	67
5.3. Fase de validación.....	73
6. DISCUSIÓN.....	77
7. CONCLUSIONES.....	85
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	89

ANEXO I: publicación en revista científica.....	101
ANEXO II: dictamen favorable del comité de ética.....	111
ANEXO III: aplicación informática Simon.....	112
ANEXO IV: lista de los 179 microRNAs estudiados en la fase de búsqueda.....	114
ANEXO V: póster Estudio Multicéntrico Congreso Europeo de Cardiología 2023.	121

## - ABREVIATURAS -

AGO2: *Argonauta 2 protein*

AUC: *Area Under the Curve* (área bajo la curva)

cDNA: DNA complementario

CMV: Citomegalovirus

Cq: Ciclo de cuantificación

dd-cfDNA: *donor derived cell-free DNA* (DNA libre derivado del donante)

DNA: *Desoxirribonucleic Acid*

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

EVI: enfermedad vascular del injerto

HDL: high density lipoprotein

HLA: *human leukocyte antigen*

IC 95%: Intervalo de Confianza del 95%

IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

IL-2: interleuquina 2

ISLHT: *International Society of Lung and Heart Transplantation*

MG: Media Global

mRNA: RNA mensajero

RISC: *RNA-induced silencing complex*

NPM1: *Nucleophosmin*

NS: no significativo

qPCR: *quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)

RCA: rechazo celular agudo

RIQ: Rango Intercuartílico

RMC: resonancia magnética cardiaca

RNA: *Ribonucleic Acid*

ROC: *Receiver Operating Characteristic* (característica operativa del receptor)

RT: *Reverse Transcriptase* (Transcriptasa Reversa)

TxC: trasplante cardiaco

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

## - RESUMEN -

**INTRODUCCIÓN:** el rechazo celular agudo (RCA) es una complicación importante tras un trasplante cardiaco (TxC). La biopsia endomiocárdica (BEM) es el método de referencia para la detección precoz de ese RCA, pero tiene importantes limitaciones. Entre éstas destacan ser invasivo, un probable error de muestreo, el alto coste y la interpretación subjetiva que provocan gran variabilidad en los informes del patólogo. Por ello, sería de gran utilidad encontrar un biomarcador no invasivo de detección de RCA en el paciente trasplantado. Entre los posibles candidatos se encuentran los microRNAs circulantes. El estudio central de esta tesis tiene como objetivo principal seleccionar y validar microRNAs en muestras de suero para la detección precoz de RCA en el seguimiento del TxC.

**MÉTODOS:** en este estudio prospectivo, observacional y unicéntrico se incluyeron a 121 pacientes con TxC. El RCA en base a la BEM se clasificó según la *International Society of Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) del 2004, existiendo 4 grados: "0R" sin rechazo, "1R" rechazo leve, "2R" rechazo moderado, "3R" rechazo grave. Inicialmente, en una fase inicial de búsqueda, se llevó a cabo un experimento con perfiles de expresión de microARNs en los sueros de los pacientes pre-RCA "0R<sub>S1</sub>", durante el RCA "2R<sub>S2</sub>" y post-RCA "0R<sub>S3</sub>". Al episodio enteró se le llamó "0R<sub>S1</sub> → 2R<sub>S2</sub> → 0R<sub>S3</sub>". Se analizaron 179 microRNAs en cada suero mediante RT-qPCR (*Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction*) y se seleccionaron aquellos microRNAs con un patrón de subida/bajada (o viceversa) significativa durante el episodio "0R<sub>S1</sub> → 2R<sub>S2</sub> → 0R<sub>S3</sub>". En la fase siguiente de validación se comprobará la eficacia diagnóstica para detectar RCA de

los microRNAs seleccionados. Para esto se buscarán nuevas muestras de suero para formar dos grupos nuevos de pacientes, un grupo sin rechazo “NoR” y otro con RCA ( $BEM \geq 2R$ ).

**RESULTADOS:** en la fase inicial de búsqueda se analizaron microRNAs en un total de 21 episodios de RCA “ $0R_{S1} \rightarrow 2R_{S2} \rightarrow 0R_{S3}$ ”, y sus respectivas muestras de suero ( $n = 63$ ). De entre los 179 microARN analizados, solo miR-181a-5p cumplió los criterios establecidos de subida y bajada significativa y por tanto, el único microRNA seleccionado para la siguiente fase. En la validación, miR-181a-5p se analizó en 45 muestras con RCA y 45 muestras sin RCA, encontrándose significativamente sobreexpresado en el grupo con RCA. El candidato miR-181a-5p, además, alcanzó un área bajo la curva  $AUC = 0,804$  (IC 95 %: 0,707-0,880), y una sensibilidad y especificidad del 78% y 76%, respectivamente, con un alto valor predictivo negativo (98%).

**CONCLUSION:** miR-181a-5p ha demostrado muy buenas cualidades como biomarcador no invasivo de RCA en el TxC. Un alto valor predictivo negativo junto con un reducido coste y simplicidad de análisis, justificarían su uso como ayuda en el manejo y seguimiento del paciente trasplantado cardiaco.

## **- RESUMO -**

**INTRODUCCIÓN:** o rexeitamento celular agudo (RCA) é unha complicación importante despois do trasplante cardíaco (TxC). A biopsia endomiocárdica (BEM) é o método de referencia para a detección precoz deste RCA, pero ten importantes limitacións. Estes inclúen ser invasivo, o probable erro de mostraxe, o alto custo e a interpretación subxectiva do patólogo, que provocan unha gran variabilidade nos resultados finais. Polo tanto, sería moi útil atopar un biomarcador non invasivo para detectar RCA no paciente trasplantado. Entre os posibles candidatos están os microRNA circulantes. O obxectivo principal do estudo central desta tese é descubrir e validar microRNA en mostras de soro para a detección precoz de RCA no seguimento de TxC.

**MÉTODOS:** 121 pacientes con HTx foron incluídos neste estudo prospectivo, observacional, dun centro. A RCA baseada en BEM foi clasificada segundo a Sociedade Internacional de Trasplante de Corazón e Pulmón (ISHLT) en 2004, con 4 graos: "0R" sen rexeitamento, "1R" rexeitamento leve, "2R" rexeitamento moderado, "3R" rexeitamento grave. Inicialmente, nunha fase de busca inicial, realizouse un experimento con perfís de expresión de microRNA nos soros de pacientes pre-RCA "0RS1", durante RCA "2RS2" e post-RCA "0RS3". Todo o episodio chamouse "0RS1 →2RS2 →0RS3". Analizáronse 179 microRNA en cada soro mediante RT-qPCR (Reacción en cadea da polimerase cuantitativa da transcriptase inversa) e seleccionáronse aqueles microARN cun patrón de subida/descenso significativo (ou viceversa) durante o episodio "0RS1 →2RS2 →0RS3". A seguinte fase de validación comprobará a eficacia diagnóstica para detectar RCA dos microRNA seleccionados. Para iso, buscaranse novas mostras de

soro para formar dous novos grupos de pacientes, un grupo sen rexeitamento “NoR” e outro con RCA ( $BEM \geq 2R$ ).

**RESULTADOS:** na fase de busca inicial analizáronse os microRNA nun total de 21 episodios de RCA “ORS1 →2RS2 →ORS3”, e as súas respectivas mostras de soro ( $n = 63$ ). Entre os 179 microANAs analizados, só o miR-181a-5p cumpriu os criterios para unha regulación significativa ao alza e á baixa e, polo tanto, o único microRNA seleccionado para a seguinte fase. Na validación, miR-181a-5p analizouse en 45 mostras con RCA e as mesmas sen RCA, encontrándose significativamente sobreexpresada no grupo con RCA. O candidato miR-181a-5p tamén logrou unha área baixo a curva de 0,804 (IC 95%: 0,707-0,880), e unha sensibilidade e especificidade do 78% e 76%, respectivamente, cun alto valor predictivo negativo (98%).

**CONCLUSIÓN:** miR-181a-5p demostrou moi boas calidades como biomarcador non invasivo de RCA en TxC. Un alto valor predictivo negativo xunto cun custo reducido e sinxeleza de análise xustifican o seu uso como axuda na xestión e seguimento do paciente trasplantado cardíaco.

## - ABSTRACT -

**INTRODUCTION:** acute cellular rejection (ACR) is an important complication after heart transplantation (HTx). Endomyocardial biopsy is the reference method for the early detection of this ACR, but it has important limitations. These include being invasive, the probable sampling error, the high cost and the subjective interpretation of the pathologist, which cause great variability in the final results. Therefore, it would be very useful to find a non-invasive biomarker for detecting ACR in the transplant patient. Among the possible candidates are circulating microRNAs. The main objective of the central study of this thesis is to discover and validate microRNAs in serum samples for the early detection of ACR in the follow-up of HTx.

**METHODS:** 121 HTx patients were included in this prospective, observational, single-center study. RCA based on EMB was classified according to the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) in 2004, with 4 grades: "0R" without rejection, "1R" mild rejection, "2R" moderate rejection, "3R" rejection serious. Initially, in an initial search phase, an experiment was carried out with microRNA expression profiles in the serum of pre-RCA patients "0R<sub>S1</sub>", during rejection "2R<sub>S2</sub>" and after rejection "0R<sub>S3</sub>". The entire episode was called "0R<sub>S1</sub> → 2R<sub>S2</sub> → 0R<sub>S3</sub>". A total of 179 microRNAs in each serum were analyzed by RT-qPCR (Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction) and those microRNAs with a significant rise/fall pattern (or vice versa) during the episode "0R<sub>S1</sub> → 2R<sub>S2</sub> → 0R<sub>S3</sub>" were selected. The next validation phase will check the diagnostic efficacy to detect RCA of the selected microRNAs. For this, new serum samples will be sought to form two new groups of patients, a group without "NoR" rejection and another with ACR (BEM $\geq$ 2R).

**RESULTS:** in the initial search phase, microRNAs were analyzed in a total of 21 episodes of RCA “OR<sub>S1</sub> → 2R<sub>S2</sub> → OR<sub>S3</sub>”, and their respective serum samples (n = 63). Among the 179 microRNAs analyzed, only miR-181a-5p met the criteria for significant up- and down-regulation and therefore, the only microRNA selected for the next phase. In validation, miR-181a-5p was analyzed in 45 samples with RCA and 45 samples without RCA, being found significantly overexpressed in the group with RCA. The miR-181a-5p candidate also achieved an area under the curve AUC = 0.804 (95% CI: 0.707-0.880), and a sensitivity and specificity of 78% and 76%, respectively, with a high negative predictive value (98%).

**CONCLUSION:** miR-181a-5p has demonstrated very good qualities as a non-invasive biomarker of ACR in HTx. A high negative predictive value together with a reduced cost and simplicity of analysis would justify its use as an aid in the management and monitoring of the heart transplant patient.





# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La insuficiencia cardíaca

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo occidental. En España, según el Instituto Nacional de Estadística (1), las enfermedades del sistema circulatorio siguen siendo la primera causa de muerte. En 2020, el año de la pandemia de la COVID-19, murieron en España 119.853 personas por causa cardiovascular, lo que supuso el 24,3% de los fallecimientos totales. Los tumores, con 112.741 defunciones (22,8%), fueron la segunda causa de muerte en nuestro país; y las enfermedades infecciosas y parasitarias, entre las que se encuentra la COVID-19, se situaron como la tercera causa de muerte con 80.796 fallecimientos (16,4%).

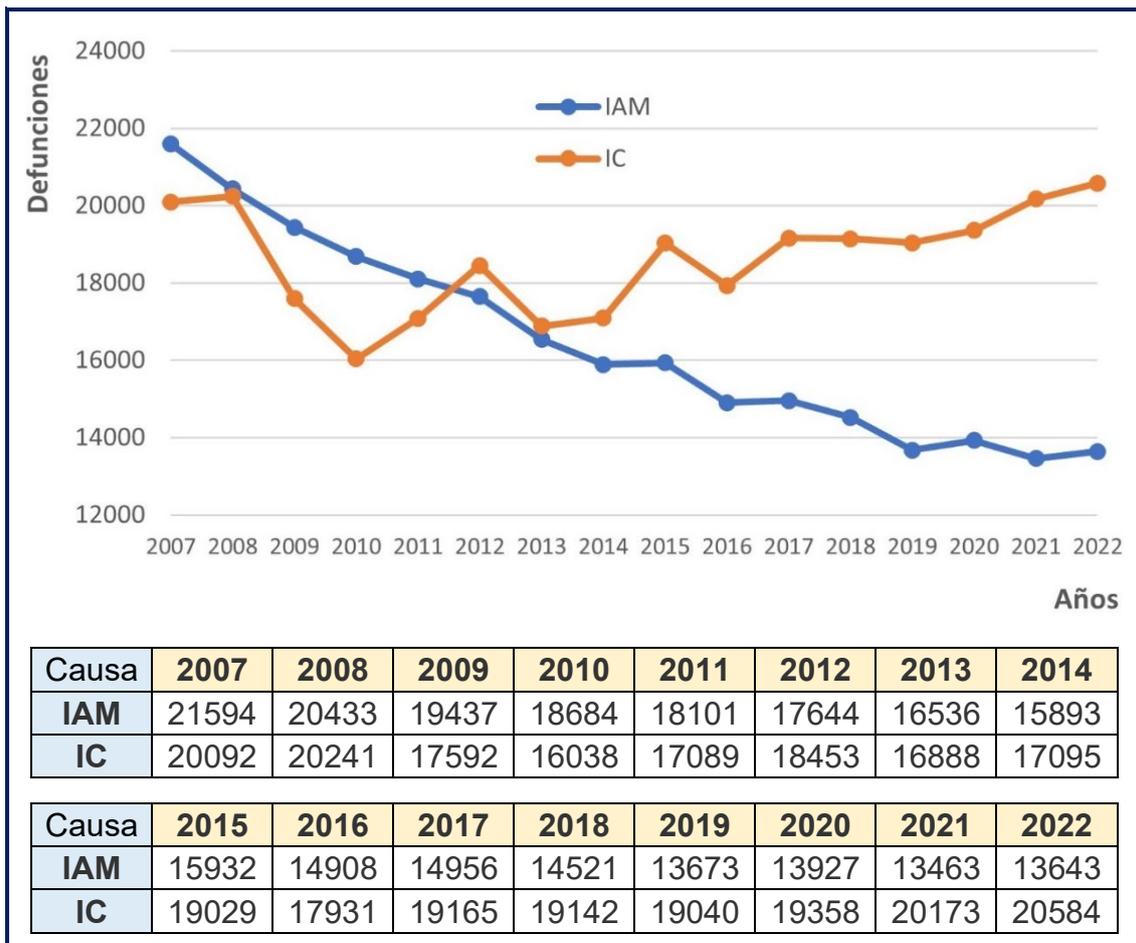
Más allá de las formas agudas de enfermedad (el síndrome coronario agudo y la enfermedad cerebrovascular), la enfermedad crónica cardiovascular ha adquirido una enorme importancia como consecuencia del envejecimiento de la población y la mejora de la supervivencia de estos pacientes (2-6). Entre estas formas crónicas de enfermedad, la insuficiencia cardíaca (IC) representa el principal problema de salud, y su abordaje es un reto para cualquier sistema de salud occidental (7-8).

La IC es un síndrome complejo, expresión final de muchas enfermedades cardíacas, tanto estructurales como funcionales, y que conducen a una incapacidad del corazón para aportar oxígeno y nutrientes a los tejidos, o sólo es capaz de hacerlo aumentando las presiones de llenado. Más concretamente, podemos definir la IC como un síndrome que cursa con síntomas y signos de congestión pulmonar y/o sistémica o de bajo gasto cardíaco derivados tanto del fracaso del corazón como

bomba (en uno o ambos ventrículos), como de los mecanismos compensatorios que se ponen en marcha para hacer frente a ese fracaso. Al menos la mitad de los pacientes con IC presentan una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) reducida ( $FEVI < 40\%$ ). De esta manera, la IC se caracteriza por la presencia de síntomas como disnea en reposo o ejercicio, fatiga, ortopnea, cansancio, edema en los miembros inferiores, signos típicos como ingurgitación yugular, estertores pulmonares, edemas periféricos, hepatomegalia, taquicardia, taquipnea y derrame pleural (9).

En los países desarrollados se estima que del 1 al 2 % de la población padece IC (10-11), aunque como muchos estudios sólo recogen aquellos casos de IC diagnosticados, la prevalencia real puede ser mayor (12). La prevalencia aumenta con la edad y va desde un 1% para menores de 55 años hasta más del 10% en mayores de 70 años, siendo la edad media de aparición de 75 años. En los grupos más jóvenes, la prevalencia es mayor en hombres pero a medida que aumenta la edad, tiende a ser similar en ambos sexos (13-15).

Mientras que la enfermedad cerebrovascular y el infarto agudo de miocardio han descendido de forma significativa su mortalidad y estancia hospitalaria, la insuficiencia cardíaca, las cardiopatías hipertensivas, la cardiopatía isquémica crónica y un grupo heterogéneo amalgama de diferentes patologías cardiovasculares se mantienen o ha aumentado. En la Figura 1 se muestran datos de mortalidad absoluta para la insuficiencia cardíaca y para el infarto agudo de miocardio. En ellas se observa la clara diferencia de tendencia en las dos principales formas de enfermedad cardíaca (1).



**Figura 1:** Mortalidad absoluta para la IC y el IAM entre 2007-2022 (tomado de <https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es>). IC: Insuficiencia Cardiaca; IAM: Infarto Agudo de Miocardio

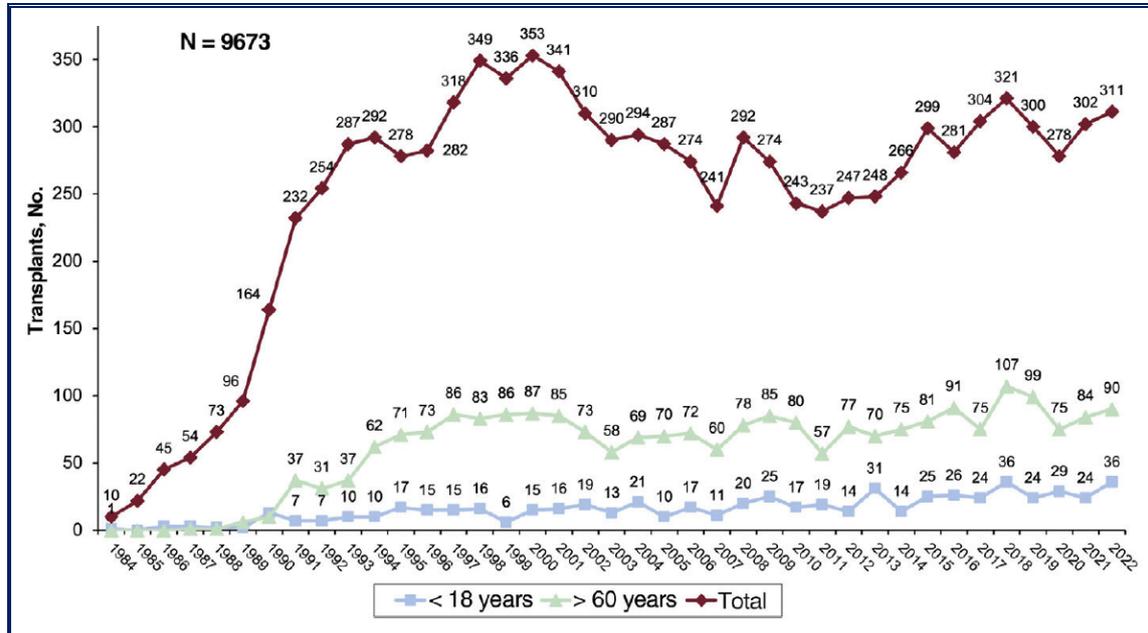
Actualmente, la IC es la causa del 5% de los ingresos hospitalarios urgentes, ocupa el 10% de las camas hospitalarias y representa el 3.5% del gasto sanitario en España (9). El pronóstico de los pacientes admitidos en el hospital por primera vez con diagnóstico de IC es muy pobre, con una vida media de aproximadamente 1,5 años. La quinta parte de estos pacientes mueren dentro del primer mes desde el ingreso, cerca de la mitad hacia el primer año y tres cuartas partes a los 5 años. La IC sintomática confiere un pronóstico tan malo como el de algunos cánceres (16).

El tratamiento de la IC es complejo e incluye fármacos, dispositivos electromecánicos, intervenciones cardíacas percutáneas o quirúrgicas y, para determinados pacientes con IC avanzada (17) terapias complejas como el trasplante cardíaco (TC) o la asistencia mecánica circulatoria de larga duración (9).

En los últimos años se están consiguiendo avances importantes gracias a las nuevas estrategias de tratamiento y manejo farmacológico basado en la evidencia (IECAS y betabloqueantes), al desarrollo de los dispositivos de resincronización cardíaca y a la optimización en la gestión de las unidades especializadas de IC. Todo ello ha colaborado en la ligera mejoría del pronóstico y la calidad de vida de estos pacientes. Pese a ello, la IC sigue siendo un problema de primera magnitud en los sistemas sanitarios de todos los países desarrollados (18).

## 1.2. Trasplante cardiaco

El trasplante cardiaco (TxC) es el tratamiento de elección para aquellos pacientes con IC avanzada y sin comorbilidades que contraindiquen el procedimiento (19). Aunque el primer TxC en humanos se realizó en 1967, su uso no se generalizó hasta la introducción en 1983 de la ciclosporina como inmunosupresor. Se estima que se han realizado más de 100000 TxC en todo el mundo desde entonces (20). En España, desde 1984, se han realizado unos 9000 procedimientos en 20 centros, (Figura 2) (21). Las indicaciones más frecuentes de TxC en nuestro medio son la cardiopatía isquémica (42%), la miocardiopatía dilatada (34%) y, en menor proporción, las valvulopatías evolucionadas (9%) y otras cardiopatías (15%) como miocarditis, cardiopatías congénitas y miocardiopatía hipertrófica (22).

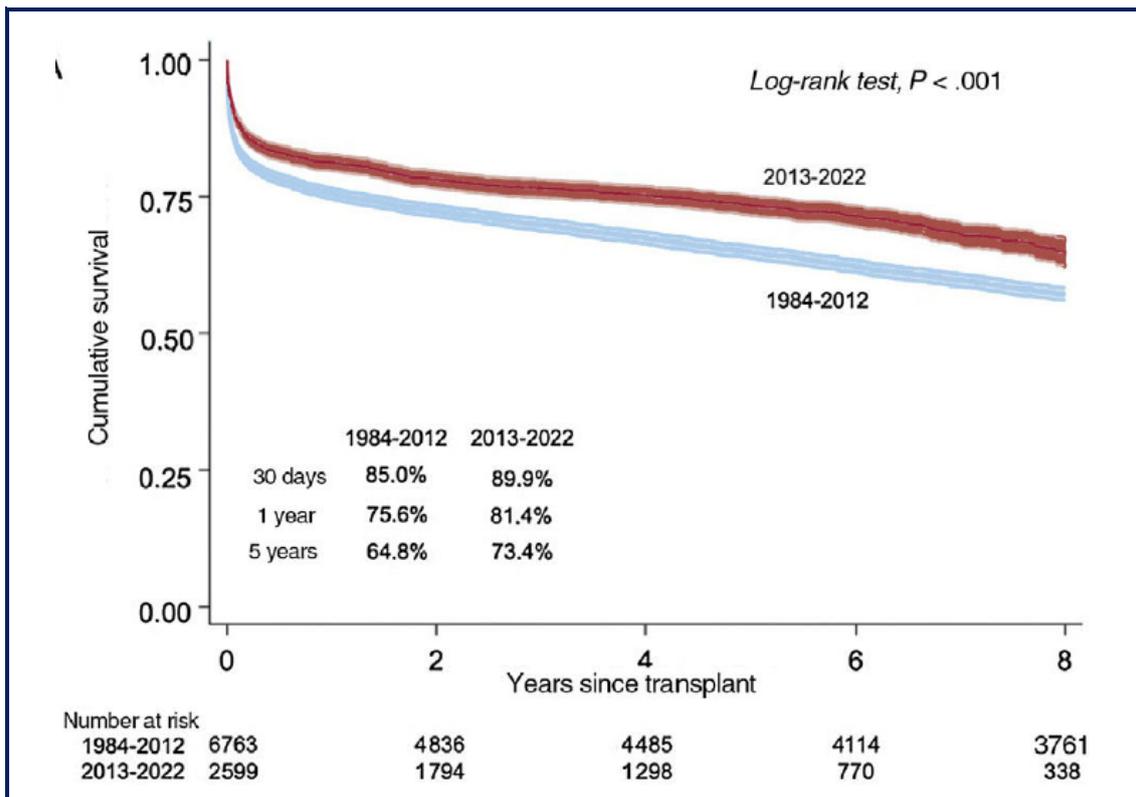


**Figura 2:** Número de TxC entre 1984-2022 totales y por edad (tomado de F. González-Vílchez *et al.* (20)).

En España, el paciente tipo de los últimos años sería un hombre en 3 de cada 4 casos, de unos 50 años y que, en ligeramente más de un tercio de los casos, se somete a un trasplante urgente, normalmente con un dispositivo de asistencia ventricular. Los esfuerzos del sistema español de obtención de órganos han conseguido un aumento del pool de donantes y junto a la mejora de la técnica quirúrgica y experiencia global de los equipos de trasplante han consolidado esta terapia para los pacientes con IC avanzada (21).

En cuanto a la inmunosupresión, no ha habido grandes novedades en los últimos años, y la mayoría de las pacientes en España reciben Basiliximab como terapia de inducción y la triple terapia basada en Tacrolimus, Micofenolato de Mofetilo y esteroides (21).

La supervivencia post-TxC ha aumentado ligeramente en los últimos 30 años (Figura 3). Así, la supervivencia en España en el periodo 2013-2022 es del 81.4% en el primer año post-TxC y de 73.4% a los 5 años, con una mediana de supervivencia global de 12 años (21). Estas cifras son equivalentes a las de los registros internacionales (20). Los factores más asociados a la mortalidad son aquellos relacionados con el estado clínico pre-TxC del receptor (soporte circulatorio o ventilación mecánica) así como varias comorbidades (edad, infección, diabetes, fallo renal, etiología isquémica). Aproximadamente el 40% de los pacientes ingresa el primer año post-TxC, generalmente para seguir un tratamiento de rechazo o infección; en el segundo año sólo ingresan el 20%. La mayoría refieren estar en buena clase funcional, pero menos del 40% se reincorporan al trabajo (20).



**Figura 3:** Comparación de las curvas de supervivencia de TxC entre 2013-2022 y 1984-2012 (tomado de F. González-Vílchez *et al.* (21)).

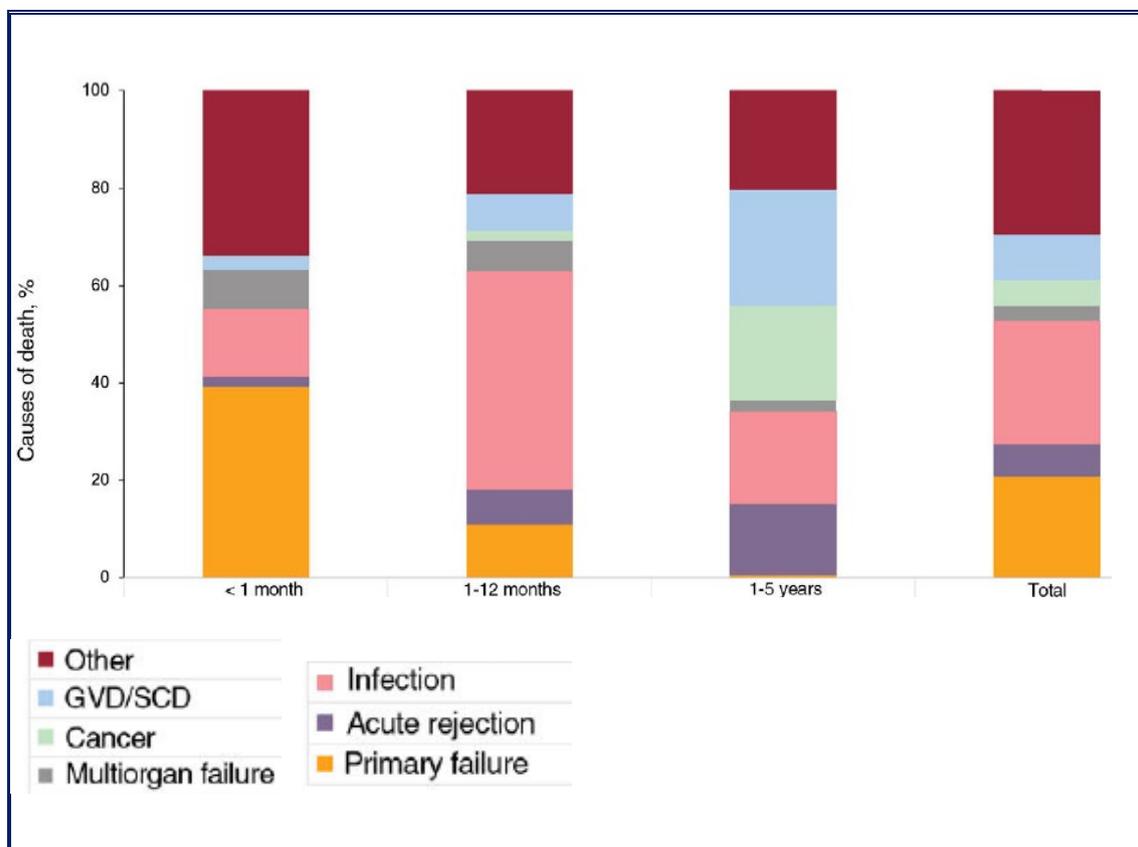
Esta lenta pero continua mejora de los resultados son consecuencia de una mejor selección de donates y receptores, de los avances en la preservación del órgano, una mejor y personalizada inmunosupresión y la profilaxis contra el citomegalovirus.

En España, los principales esfuerzos de la Organización Nacional de Trasplantes en cuanto a TxC, se centran en una mejor asignación de los órganos donados (23), así como en incrementar la disponibilidad de órganos. En cuanto a población pediátrica, un avance importante es el TxC ABO incompatible, técnica cada vez más adoptada en nuestro país (24).



### 1.3. Complicaciones post-trasplante cardiaco

Las principales causas de muerte en los 5 primeros años post-TxC son el fracaso primario del injerto (23.2%) y la infección (21,0%). El primero se da, sobretodo, en el primer mes post-TxC, mientras que la infección predomina a partir del segundo mes (Figura 4). La enfermedad vascular del injerto (EVI) y el rechazo agudo serían, respectivamente, responsables del 9% y del 7% de muertes en los 5 años post-TxC (21).



**Figura 4:** Principales causas de muerte por periodods post-TxC entre 2013-2022. GVD/SCD: graft vascular disease/sudden cardiac death (tomado de F. González-Vílchez et al.(21))

### 1.3.1. Fracaso primario del injerto

El fracaso primario del injerto se define como un fallo agudo del corazón trasplantado para satisfacer las necesidades circulatorias del receptor sin una causa aparente o complicación quirúrgica. Es muy difícil de predecir y de manejar (25), requiriéndose a menudo altas dosis de tratamiento inotrópico y ayuda mecánica circulatoria para prevenir un fallo multiorgánico.

### 1.3.2. Rechazo Agudo

Como se ha comentado, el rechazo agudo es responsable del 7% de las muertes durante los 5 primeros años post-TxC, aunque el rechazo se asocia al desarrollo posterior de EVI por lo que esa cifra sería aún mayor. El rechazo agudo es una respuesta inmunológica mediada por linfocitos T contra los antígenos HLA del donante presentados por las células presentadoras de antígeno. Esta presentación produce una activación y proliferación de los linfocitos T al expresar IL-2 y otras citoquinas. Los linfocitos T activados reaccionarán ante cualquier célula que exprese esos antígenos HLA en su superficie, provocando bien un rechazo celular, bien un rechazo humoral o ambos (26). El rechazo celular se produce a través de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> que activa a los macrófagos, infiltrando el miocardio y produciendo daño celular y en ocasiones necrosis miocitaria. En la biopsia endomiocárdica (BEM) se observa, de forma característica, de infiltración de células mononucleares de predominio linfocitario y necrosis miocitaria. El rechazo humoral se produce a través de la activación de los linfocitos B para producir anticuerpos específicos anti-HLA del donante que se unen al endotelio capilar dando lugar a daño endotelial y vascular (27).

El riesgo de desarrollar RCA es más alto en los tres primeros meses post-TxC y aproximadamente el 60% de los pacientes desarrollarán al menos un episodio de rechazo en los 6 primeros meses post-TxC. Otros factores de riesgo de rechazo celular son el sexo femenino, raza negra, mayor diferencia HLA y dispositivo de asistencia ventricular previo al trasplante (27).

El rechazo humoral puede ocurrir en cualquier momento post-TxC y se asocia a una mayor mortalidad, pérdida del injerto, y desarrollo de EVI. Los factores de riesgo del rechazo humoral son un panel de anticuerpos anti-HLA positivo, embarazo, transfusiones previas y retrasplante (27).

### 1.3.3. Enfermedad vascular del injerto

Desde que el segundo paciente trasplantado en todo el mundo en 1968, el señor Blaiberg, muriera a los 19 meses post-TxC de infarto de miocardio, ya se conoció el alcance de la EVI. Fue una sorpresa para la comunidad médica la enfermedad coronaria se desarrollara tan rápidamente (28). Ésta es una de las causas más importantes de mortalidad post-TxC, suponiendo un 9% de la mortalidad global y su presentación temprana es un marcador de mal pronóstico. Está presente en hasta el 18% de los pacientes con más de un año de evolución post-TxC y en más de 50% de los pacientes tras 10 años post-TxC (29)

La EVI se debe a un complejo proceso multifactorial causado tanto por mecanismos inmunes como no inmunes (30), siendo el RCA uno de los factores de riesgo más importantes (31).

La EVI se caracteriza por el estrechamiento difuso concéntrico y longitudinal de las arterias coronarias epicárdicas y pequeñas ramas. Histológicamente los vasos afectados muestra un engrosamiento concéntrico de la íntima con un aumento del número de células de músculo liso dentro de una matriz de tejido conjuntivo, aunque las placas clásicas fibroadiposo también se ven habitualmente (32). En contraste la aterosclerosis tradicional es focal, no circunferencial y a menudo se observa próxima a los vasos epicárdicos. Así la EVI implica inflamación de los vasos y lesión endotelial siendo su factores de riesgo los clásicos de la aterosclerosis (diabetes, hipertensión, obesidad, tabaquismo y hiperlipemia) pero además también factores de riesgo no clásicos dependientes del trasplante como la diferencia en HLA, episodios previos de rechazo, infección por CMV y edad del donante (33). Por otro lado, la EVI también se asocia con trombos murales y oclusivos intracoronarios que pueden causar infarto agudo de miocardio que se producen habitualmente pasados dos meses desde el TxC (34). El importante papel de las plaquetas se ve respaldado por una fuerte asociación entre la activación plaquetaria y el desarrollo y progresión de EVI (35).

Dado que la mayoría de los receptores de trasplante carecen de inervación del injerto, es poco probable que experimenten angina de pecho en presencia de enfermedad coronaria significativa y pueden permanecer asintomáticos o presentarse clínicamente como IC, arritmias o muerte súbita. Por ello, es necesario realizar coronariografías de control después del primer año post-TxC. Dada su naturaleza difusa, en ocasiones es necesario añadir ecografía intravascular coronaria para mejorar la sensibilidad y

medir exactamente el grado de engrosamiento de la íntima, ya que una progresión en el primer año de más de 0.5 mm se asocia a una EVI más agresiva y peor pronóstico (36).



## 1.4. Seguimiento del trasplante cardiaco

En todo paciente con TxC es necesario conseguir un equilibrio entre el régimen inmunosupresor y el riesgo de rechazo. Si éste se administra por encima de lo requerido hay peligro de desarrollar toxicidad y efectos adversos (insuficiencia renal, infecciones, alteraciones hematológicas, alteraciones gastrointestinales,...). Por el contrario, si administra por debajo de lo requerido hay más probabilidad de rechazo del órgano trasplantado. Debido a la variabilidad interindividual para un correcto ajuste de dosis de los inmunosupresores más empleados, hay que buscar herramientas para predecir estos efectos no deseados. El seguimiento del TxC se realiza, en la mayoría de los centros, mediante BEMs periódicas que detectan de forma precoz el rechazo cardiaco agudo, en especial el subclínico. Esto, junto la clínica del paciente y otras pruebas complementarias como el electrocardiograma, el ecocardiograma, los biomarcadores de IC y necrosis miocárdica y los niveles de inmunosupresores, permite ajustar la dosis de inmunosupresores y/o complementar el tratamiento con otros fármacos, como profilaxis o tratamiento de las complicaciones más frecuentes (infecciones, hipertensión arterial, osteoporosis) (37). La BEM no debería ser la única prueba en la que basar el cambio de tratamiento inmunosupresor (38), por las limitaciones que se comentan en el próximo punto.

### 1.4.1. Biopsia Endomiocárdica

La BEM sigue siendo, desde hace más de 30 años, el método de referencia (*gold standard*) para la detección temprana de RCA en el TxC. Las BEM de protocolo se realizan con más frecuencia durante los 6 primeros meses post-TxC, ya que el RCA es más probable en este periodo. A partir de ese momento, las BEM se espacian aunque el riesgo de RCA nunca desaparece, y el hecho de no sufrirlo al principio no quiere decir que no se vaya a desarrollar más tarde (39). Tras un episodio de RCA se suele realizar una BEM a las dos semanas para comprobar la eficacia del tratamiento (40).

Las BEM se obtienen a través de un cateterismo cardiaco, con acceso por la vena yugular interna derecha o, con menos frecuencia, a través de una vena femoral hasta el ventrículo derecho, donde se toma la muestra del tabique interventricular. Es recomendable obtener 5-6 fragmentos de tejido que contengan, al menos, un 50% de miocardio para poder ser evaluados por el patólogo. La mayoría de los fragmentos se fijan en formalina. Desde 1990, la “*International Society of Heart and Lung Transplantation*” (ISHLT), propuso un esquema estandarizado de nomenclatura para los grados de rechazo agudo en base a la histología e inmunohistoquímica. En 2004 se revisó y se sustituyó por el usado actualmente (41). Los grados de RCA serían:

- Grado “0R”: sin rechazo.
- Grado “1R”: rechazo leve (infiltración intersticial y/o perivascular con más de un foco de daño miocitario).
- Grado “2R”: rechazo moderado (dos o más focos de infiltración con daño miocitario)
- Grado “3R”: rechazo severo (infiltración difusa con daño miocitario multifocal, con o sin edema, hemorragia o vasculitis)

En ocasiones hay pacientes hemodinámicamente comprometidos sin evidencia de rechazo celular o necrosis miocítica evidente. En estos pacientes, además de considerar un posible error de muestreo por la limitada sensibilidad de la BEM, hay que considerar siempre el rechazo humoral mediado por anticuerpos, de daño preferentemente vascular, donde el depósito de anticuerpos puede ser detectado por microscopía de fluorescencia e inmunohistoquímica. Hay un creciente esfuerzo de la comunidad internacional por la estandarización en el diagnóstico y relevancia del rechazo humoral (42).

Las principales **limitaciones de las BEM** serían:

- **Carácter invasivo:** y como tal no está exento de complicaciones, aunque con una incidencia muy baja ( $\approx 0,5\%$ ) (43). En el contexto de TxC es característica, debido a la repetición de BEMs en cada paciente, la regurgitación tricuspídea, que se puede dar hasta en el 30% de los pacientes. Aunque esta complicación suele ser bien tolerada, en ocasiones se requiere un recambio valvular (44).
- **Error en el muestreo:** puede ser que las piezas de BEM extraídas para detectar RCA no sean representativas del miocardio afectado, pudiendo llevar a una infravaloración diagnóstica (un falso negativo) de un posible rechazo (45).
- **Variabilidad interobservador:** los criterios de la ISHLT de 1990 hacían que la clasificación del RCA en función de la BEM tuviera un componente subjetivo muy grande con mucha variabilidad en los resultados en función del patólogo. Para intentar minimizar el componente subjetivo, la ISHLT publicó en 2004 los nuevos y simplificados criterios de clasificación del RCA según la BEM. No obstante, se demostró (46) que esta variabilidad interobservador seguía existiendo, siendo la

concordancia entre patólogos en torno al 70%, y mucho menor, un 30%, en grados altos de rechazo.

Todas estas limitaciones descritas, junto al gran consumo de recursos humanos y monetarios, han llevado a numerosos grupos a buscar biomarcadores que puedan sustituir o complementar las BEM en el seguimiento del pacientes con TxC.

### 1.4.2. Biomarcadores no invasivos de rechazo celular agudo

Existen multitud de estudios de biomarcadores no invasivos para detectar RCA en el contexto del TxC (47), aunque con muchos de ellos con resultados limitados o contradictorios (48-49). Aquí se comentan los biomarcadores más prometedores teniendo en cuenta tanto su capacidad diagnóstica como su posible transferibilidad a la práctica clínica diaria:

**1.4.2.1. Imagen:** la ecocardiografía es la prueba de primera línea para valorar la función y anatomía del corazón trasplantado. Aunque la ISHLT no hace ninguna recomendación en cuanto al seguimiento del TxC con ecocardiograma, varias asociaciones recomiendan realizarlas con cierta periodicidad post-TxC (50). Hay mucha información que proporciona el ecocardiograma que no es sensible ni específica para la detección de RCA. Por ejemplo, la presencia de un derrame pericárdico se observa en aproximadamente dos tercios de los pacientes a los 3 meses del TxC, y una cuarta parte a los 6 meses, independientemente del estado de RCA (51). Sin embargo, el ecocardiograma se utiliza con frecuencia en el seguimiento del TxC para monitorizar la función sistólica del injerto o cuando hay una sospecha clínica de RCA a pesar de tener una BEM negativa "OR". Por tratarse de método no invasivo, fácilmente disponible y repetible, es siempre de gran ayuda. En los últimos años se han descrito nuevos parámetros ecocardiográficos como el *strain* de ventrículo izquierdo y derecho, que pueden mejorar el rendimiento de esta técnica (52).

La resonancia magnética cardiaca (RMC) produce imágenes de alta resolución que facilitan mucho la evaluación de la estructura y función cardiaca. Tiene un gran potencial como marcador no invasivo de RCA y, más concretamente, el tiempo de

relajación T2, que muestra una correlación positiva y significativa con la histología. En el mayor estudio realizado con 68 pacientes a los que se les realizó 123 RMC, se encontró que el tiempo de relajación T2 tenía un valor predictivo negativo del 97% para detectar RCA  $\geq$  "2R", con un valor predictivo positivo del 35% (53).

**1.4.2.2. Perfiles de expresión génica:** es la única estrategia no invasiva recogida en las guías de la ISHLT como posible alternativa a la BEM (54), y está disponible comercialmente como Allomap®. Se basa en un panel de 11 genes estudiados por PCR en muestras de sangre periférica, con cuya expresión relativa se desarrolla un score (0-40) en el que los niveles más altos se asocian con mayor riesgo de rechazo. En el estudio "CARGO" (Cardiac Allograft Rejection Gene Expression Observational Study) (55), el Allomap® consiguió un VPN del 99.6% para descartar RCA  $\geq$  "2R" en pacientes con TxC. Posteriormente, el ensayo clínico "IMAGE" (Invasive Monitoring Attenuation through Gene Expression) demostró resultados muy similares entre un seguimiento exclusivo por perfil de expresión génica frente a un seguimiento por BEM (56). La principal crítica a este ensayo clínico fue que sólo incluyeron pacientes a partir del sexto mes post-TxC, y es sabido que el RCA es más frecuente en los primeros 6 meses post-TxC. Un estudio posterior, el E-IMAGE (Early-IMAGE) (57) incluyó pacientes a partir del 2 mes post-TxC, obteniendo los mismos buenos resultados para detectar RCA que el estudio previo. Finalmente, el estudio CARGO II (58), con más de 13 países europeos participantes, con la inclusión de 238 pacientes y el estudio de 1135 perfiles de expresión génica, corroboraron los buenos resultados. Como hemos mencionado, el AlloMap® es la única técnica que la guía de la ISHLT recomienda (clase IIa, evidencia C) para descartar la presencia de RCA de

grado “≥2R” a partir de los 6 meses desde el TxC. Las ventajas de este test en el seguimiento del TxC es que permite reducir el número de BEMs de protocolo, gracias a su alto VPN en pacientes clínicamente estables. La disminución de BEMs trae, a su vez, una reducción de riesgos para el paciente y de costes para el sistema. Por estas razones en Estados Unidos se utiliza habitualmente, mientras que en Europa sólo está disponible en Francia (Estrasburgo), hecho que hace compleja la logística en cuanto a envío de muestras y tiempos de respuesta a la vez que encarece sus costes.

**1.4.2.3. DNA libre derivado del donante:** el dd-cfDNA (*donor derived cell-free DNA*, en inglés) en plasma se comenzó a estudiar para el estudio prenatal de las trisomías y otras patologías genéticas del feto. Para ello es necesario detectar y estudiar el DNA libre fetal en la sangre de la madre (59). Otro uso que se le comenzó a dar desde el inicio al DNA libre fue la detección de mutaciones propias de células neoplásicas en la circulación del huésped (60). También desde el descubrimiento del DNA libre se propuso su uso como marcador de rechazo de un órgano trasplantado (61). Para ello, habría que diferenciar claramente qué fracción pertenecía al donante y cuál al receptor y cuantificar ambas. Para este cometido las técnicas analíticas fundamentales han sido tanto la secuenciación masiva como la PCR digital (62). Los buenos resultados obtenidos por dd-cfDNA en varios ensayos clínicos (63-64) han llevado a la aparición de kits comerciales aprobados por Medicare para su uso en la monitorización del rechazo del órgano trasplantado (65). Para la validación de este kit, denominado AlloSeq® (CareDx, California), se incluyeron, entre otras, numerosas muestras procedentes de pacientes con TxC. Este estudio, junto a otros que también incluyeron muestras procedentes de TxC (66-67) obtuvieron muy buenos resultados

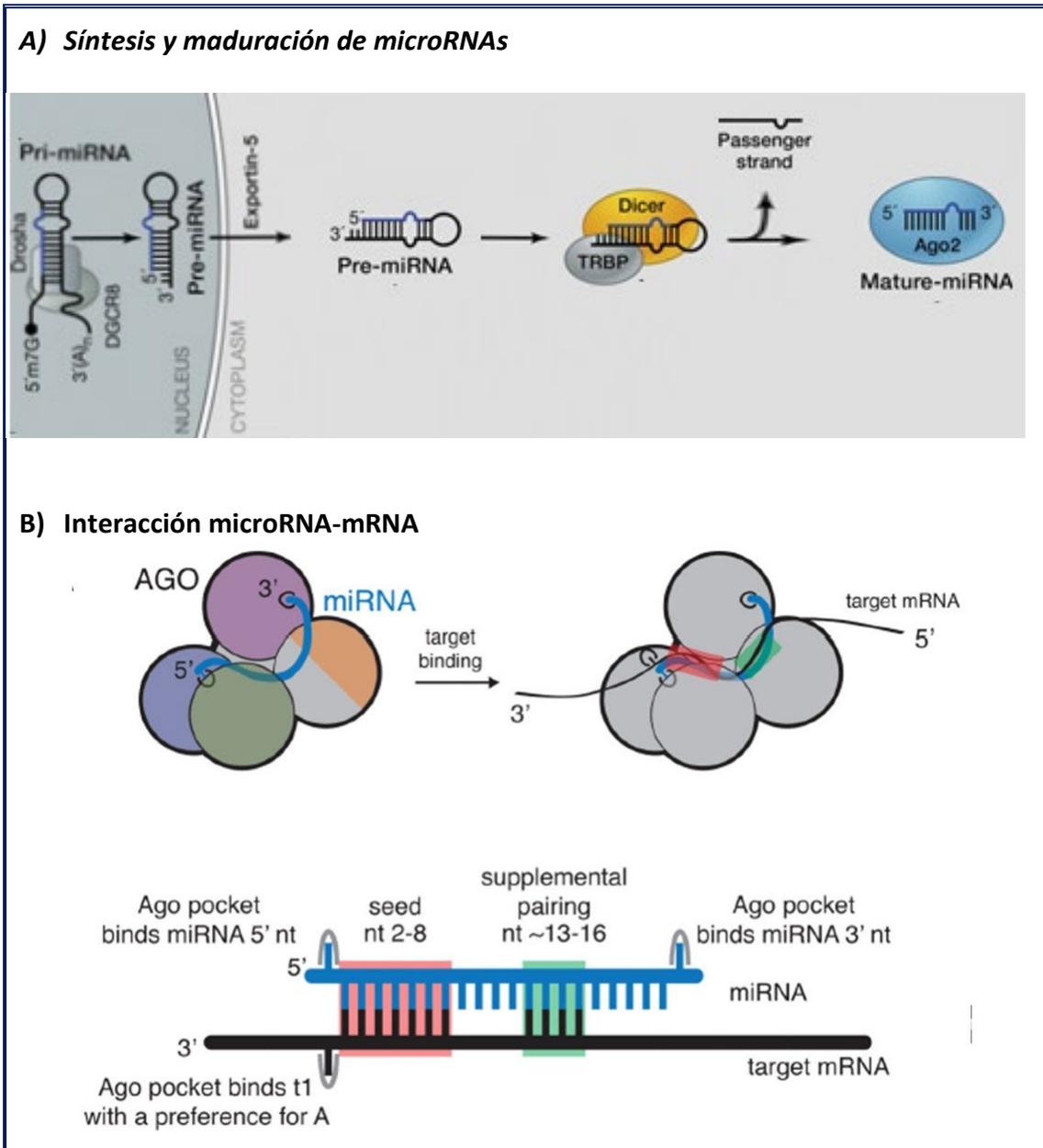
en la detección de rechazo del órgano trasplantado. Las limitaciones de esta técnica son la necesidad de más evidencia científica y la complejidad de la propia técnica que hace que los tiempos de respuesta sean excesivamente largos para una situación clínica que requiere tiempos de intervención muy ajustados.

**1.4.2.4. microRNAs:** en los últimos años han aparecido gran número de publicaciones de estas pequeñas moléculas asociadas a todo tipo de enfermedades y situaciones clínicas. El TxC y el manejo del RCA no es una excepción y, como parte central de esta tesis, se explicará en detalle en el siguiente apartado, desde la biología de los microRNAs hasta su uso como biomarcador no invasivo en TxC.

## 1.5. Los microRNAs

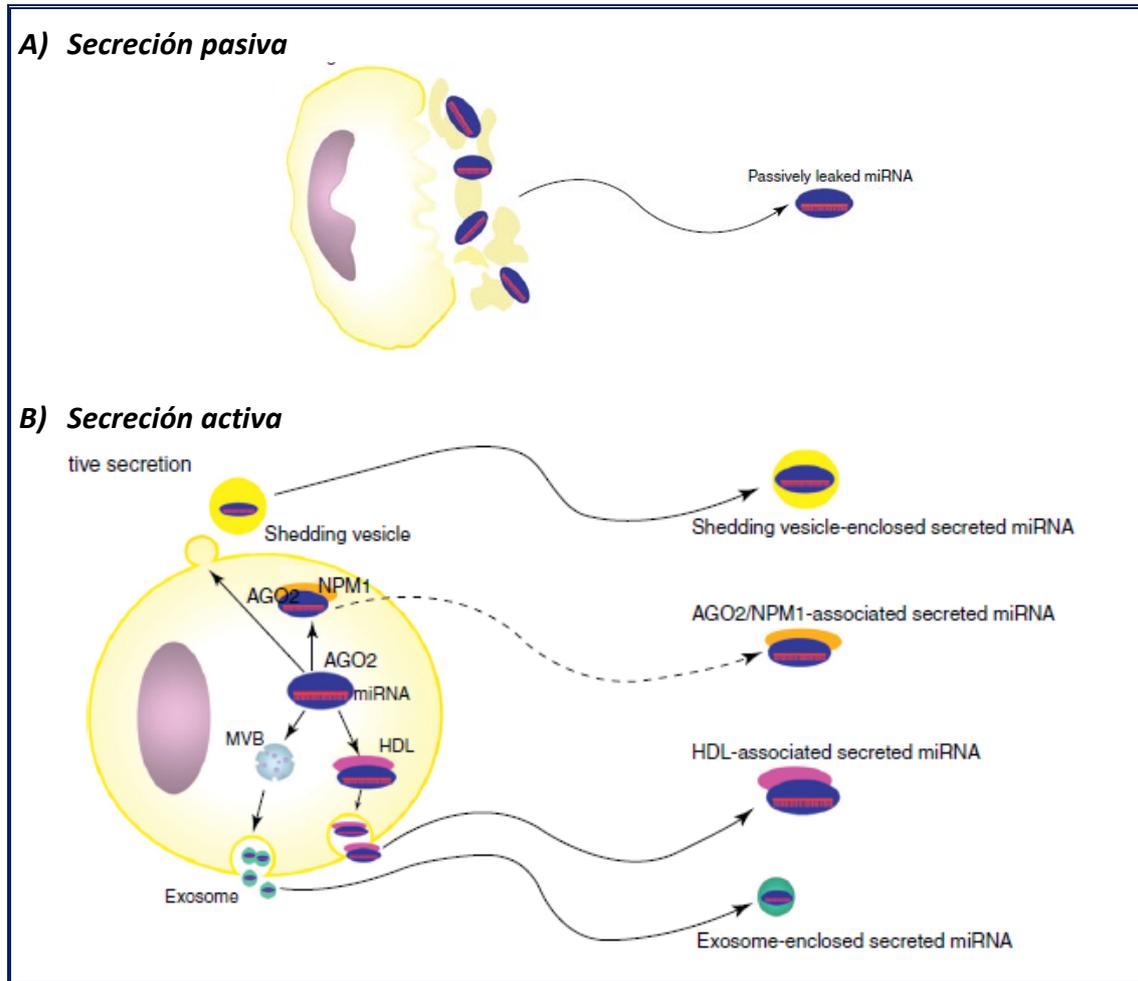
### 1.5.1. Biología

Los microRNA, pequeñas moléculas de RNA de tan sólo 21-25 nucleótidos, fueron descubiertas en la década de 1990. A pesar de este descubrimiento tardío, son unos importantes reguladores de la expresión génica a nivel post-trascricional, uniéndose a mRNA complementario e inactivándolo (68). La síntesis de los microRNAs comienza con la transcripción en el núcleo de unos precursores de microRNAs de doble cadena y 3000 nucleótidos que, primero en el núcleo y luego en el citoplasma, son procesados para disminuir su tamaño y conseguir un microRNA maduro de cadena simple y de unos 22 nucleótidos (Figura 5A). Este microRNA puede seguir varios caminos, bien unirse al complejo miRISC y proceder a su labor inhibitoria en la propia célula o bien ser transportado fuera de la célula hasta otra célula diferente donde realizaría allí la misma función reguladora (69). Los microRNAs se unen al mRNA al que inhiben con ayuda del complejo miRISC (Figura 5B), mediante complementariedad de la secuencia de bases, principalmente, las bases 2 a 8 del microRNA. En el mRNA la unión suelen ser en las zonas no codificantes 3'UTR, zonas con gran importancia en la regulación de la expresión génica.



**Figura 5:** Biología de los microRNA, síntesis y función. **A)** síntesis y maduración de microRNAs; **B)** mecanismo de inhibición de la transcripción e interacción con el mRNA 2 (tomado de Gebert *et al* (68) y Chen *et al.* (69))

De particular importancia es que, al contrario de lo que se pensó al principio, los microRNAs son muy estables fuera de la célula (70) y se encuentran en todo tipo de fluidos biológicos y tejidos, incluida la circulación sanguínea (71). Los microRNAs son secretados de las células donde se originan por varios mecanismos (69). Lo más común, especialmente en circulación sanguínea, es que buena parte de los microRNAs extracelulares procedan de la apoptosis celular (secreción pasiva) (Figura 6A). Estos microRNAs “libres” se encuentran unidos a las proteínas AGO2 y NPM1, principalmente. Por otro lado, se ha probado una secreción activa de microRNAs que consume energía y responde a estímulos externos. La secreción activa se hace a través de microvesículas (exosomas principalmente) o asociadas a lipoproteínas, en concreto, HDL (Figura 6B). De esta forma, pueden viajar a distancia hasta que la célula diana los interioriza y allí harán su papel regulador, inhibiendo un mRNA en concreto (72).



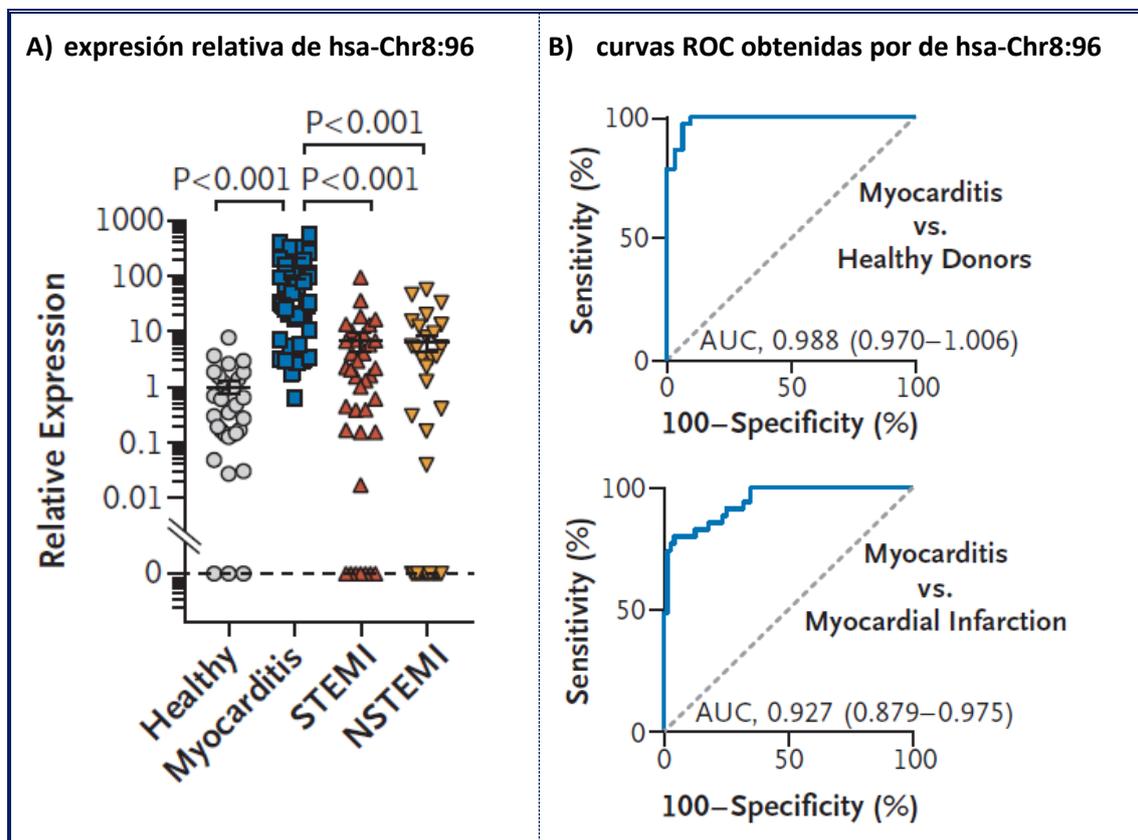
**Figura 6:** Tipos de secreción de los microRNAs del interior celular a la circulación: **A)** secreción pasiva de microRNAs por parte de la célula, que al romperse, vierte a la circulación su contenido, incluyendo microRNAs; **B)** mecanismos de secreción activa (consume energía), bien en el interior de microvesículas, bien asociadas a lipoproteínas como el HDL. Los microRNAs en circulación asociados al complejo AGO2/NPM1 no está claro si se secretan activa o pasivamente (tomado de Chen *et al.* (69))

### 1.5.2. Aplicaciones clínicas de los microRNAs

Los microRNAs secretados activamente son una huella dactilar no sólo del tipo de tejido, sino de cualquier alteración homeostásica que se pudiera producir en él. De esto se concluye que, gracias a su estabilidad en sangre y a su condición de regulador importante de la homeostasis, los microRNAs son muy buenos candidatos como biomarcadores en cualquier tipo de enfermedad, como así lo demuestran los numerosísimos estudios desarrollados en los últimos años. No obstante, son contados los casos de microRNAs que hayan alcanzado la práctica clínica o estén próximos a hacerlo. Expondremos dos ejemplos con bastantes posibilidades de conseguirlo:

- **Cáncer:** muchos grupos de investigación y recursos están volcados en el descubrimiento de un microRNA que sea un buen marcador tumoral, ya sea para cribado, diagnóstico, pronóstico o seguimiento de todo tipo de cánceres. Entre los más prometedores estaría miR-371a-3p en el manejo del cancer germinal de testículo (73). Estos tumores, que suponen más del 95% de los cánceres de testículo, tienen una alta prevalencia entre hombres jóvenes. El miR-371a-3p alcanzó una alta sensibilidad y especificidad, 89% y 93%, respectivamente, y una curva ROC con un AUC = 0.94, para clasificar correctamente a 166 pacientes con cáncer frente a 100 controles sanos. Además, miR-371a-3p, desaparecía una vez extirpado el tumor y reaparecía en las recidivas, por lo que también sería idóneo para el seguimiento y manejo de este tumor.
- **Miocarditis aguda:** en este estudio (74), tras una búsqueda compleja con investigación animal de microRNAs candidatos para detectar miocarditis aguda, se identificó *hsa-Chr8:96* como posible candidato. Tras esta etapa inicial de búsqueda se realizó investigación sobre esta asociación mediante un estudio clínico con

humanos. Así, en una cohorte de 132 pacientes con sospecha de miocarditis aguda versus daño miocárdico y/o disfunción ventricular, cuantificaron *hsa-Chr8:96* en el plasma de los pacientes. El diagnóstico final de esta población fue 42 pacientes con miocarditis y 90 con infarto de miocardio. También se cuantificó *hsa-Chr8:96* en 80 controles sanos. Los niveles fueron significativamente más altos en miocarditis aguda frente a infarto y frente a controles sanos (Figura 7A). Además se obtuvo un área bajo la curva ROC de 0.927 para diferenciar miocarditis aguda frente a infarto y de 0.988 frente a sanos (Figura 7B)



**Figura 7:** Principales resultados del estudio de Blanco-Domínguez et al donde buscan un microRNA candidato para la detección de miocarditis aguda (74). STEMI: ST Elevation Myocardial Infarction, NSTEMI: Non ST Elevation Myocardial Infarction

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

### 2.1. Literatura previa: microRNAs en el seguimiento del TxC

En el campo del TxC también se han realizado varios estudios con microRNAs para buscar un biomarcador complementario a la BEM en el seguimiento del rechazo agudo. Al menos ocho estudios hasta la fecha (2022) han buscado algún microRNA diferencialmente expresado durante el RCA. Seis estudios se han centrado en la detección de microRNAs circulantes (75-80), mientras que dos estudios los buscaron en el tejido mismo de la BEM (81-82). Dewi *et al* (75) es el único estudio longitudinal, con muestras tomadas antes, durante y después del rechazo celular. Dewi *et al* encontraron un aumento significativo de miR-142-3p y miR-326 durante el RCA, alcanzando un área bajo la curva de 0.86 y 0.80, respectivamente. Con un tamaño muestral pequeño (sólo 10 pacientes con RCA), los mismos autores en un estudio posterior aumentaron la cohorte a 26 pacientes con RCA. En esta ocasión se obtuvieron valores de área bajo la curva un poco más bajos ( $AUC \approx 0.70$ ) (76). En el estudio de van Huyen *et al* (78) encontraron 4 microRNAs diferencialmente expresados (miR-10a, miR-31, miR-92a-3p y miR-155) con unas curvas ROC casi perfectas ( $AUC \approx 1$ ) para detectar rechazo. No obstante, la cohorte estudiada estuvo formada por 14 RCA y 17 rechazos mediados por anticuerpos, por lo que los resultados obtenidos no fueron exclusivamente de rechazo celular tras el TxC. Pérez-Carrillo *et al.* (80) incorporaron como principal novedad en su estudio la secuenciación masiva durante la fase de búsqueda, cubriendo así la totalidad de microRNAs presentes en suero. La fase de validación de su microRNA candidato, miR-144-3p, se realizó ya con la técnica convencional de qPCR consiguiendo buenos resultados ( $AUC = 0.98$ ). Por todo ello y, aunque el número de estudios es aún pequeño,

estos resultados sugieren que los microARN son buenos candidatos como biomarcadores no invasivos de RCA en el paciente con TxC.

Una revisión de los datos de los estudios previos en su conjunto, muestra una baja reproducibilidad entre ellos (Tabla 1) ya que, de los 15 microRNAs valorados como posibles candidatos (diferencialmente expresados), sólo dos, miR-92a-3p y miR-144-3p, se replicaban entre grupos diferentes de investigación. Posiblemente, este haya sido uno de los motivos, como en muchas otras enfermedades donde se han estudiado microRNAs, por el que estos biomarcadores no hayan llegado a la práctica clínica (83). Se han descrito posibles explicaciones de esta baja reproducibilidad entre estudios con microRNAs para una misma patología y, posiblemente la principal, sea la falta de estandarización en todo el proceso de análisis de los microRNAs (84-85). Otra importante fuente de variabilidad es la propia variabilidad biológica de los microRNAs en cada individuo (intraindividual) o poblacional (interindividual). La variabilidad biológica se puede minimizar con un diseño apropiado del estudio (86). Otra posible fuente de error, como en muchos estudios biomédicos, es un tamaño muestral inadecuado (87).

**Tabla 1:** estudios con microRNAs circulantes asociados a RCA en TxC

Autor (ref)	Tipo de muestra	FASE DE BÚSQUEDA			FASE DE VALIDACIÓN		
		n	miRNAs testados	miRNAs candidatos (p<0.05)	n	miRNAs diferencialmente expresados (p<0.05)	AUC
Dewi 2013 (75)	Suero	10 RCA vs 10 preRCA 10 postRCA	175	miR-27a-3p miR-101-3p miR-142-3p <b>miR-144-3p</b> miR-326 miR-339-3p miR-424-5p	?	miR-142-3p miR-326	0.80 0.86
Dewi 2017 (76)	Suero	Usaron la de su estudio anterior			26 RCA vs 37 noR	miR-27a-3p miR-101-3p miR-142-3p miR-144-3p miR-326 miR-339-3p miR-424-5p	0.72 0.75 0.78 0.70 0.69 0.71 0.73
Dewi 2017 (77)	Exosoma de suero	5 RCA vs 5 noR	175	<b>miR-92a-3p</b> miR-142-3p miR-339-3p	-		
Van Huyen 2014 (78)	Suero	11 RCA vs 30 noR	miR-10a miR-21 miR-31 miR-92a miR-142-3p miR-155 miR-451	miR-10a miR-31 <b>miR-92a-3p</b> miR-155	14 RCA vs 22 noR	miR-10a miR-31 miR-92a miR-155	0.98 0.87 0.96 0.97
Guo 2017 (79)	Sangre	Eligieron miR-29 como candidato en base a una búsqueda bibliográfica			51 RCA vs 231 noR	miR-29	0.79
Perez-Carrillo 2022 (80)	Suero	28 ACR vs 12 noR	Todos (NGS)	miR-106a-5p <b>miR-144-3p</b> miR-652-3p miR-6747-3p	38 RCA Vs 93 noR	miR-144-3p	0.98

NGS: Next Generation Secuencing, noR: muestras analizadas sin rechazo, postRCA: muestras usadas después del rechazo (mismo paciente), preRCA: muestras usadas antes del rechazo (mismo paciente), RCA: muestras analizadas durante el rechazo celular agudo, TxC: Trasplante cardiaco



## 2.2. microRNAs en TxC, aportaciones de este estudio

En primer lugar, ya se han detallado previamente en esta Tesis (43-46) las importantes limitaciones asociadas a la BEM que sigue siendo la principal herramienta en la detección de RCA en el TxC. Por este motivo han ido surgiendo en los últimos años varios biomarcadores no invasivos para detectar el rechazo del órgano trasplantado (25-42). Algunos de ellos, incluso se han patentado y llevado a la práctica clínica aunque también con muchas limitaciones, especialmente en relación a su complejidad metodológica y alto coste asociado.

Los microRNAs se han postulado como potenciales biomarcadores para un gran número de patologías, y también se han publicado varios estudios en relación a su uso para la detección de rechazo en TxC (75-82). Si bien, y aunque los resultados obtenidos por estos estudios son buenos individualmente, se objetiva poca replicabilidad entre ellos.

Por todo lo expuesto aquí, defendemos la importancia y necesidad de llevar a cabo nuestro estudio, primando sobremanera un buen diseño experimental así como cada aspecto metodológico del análisis de los microRNAs. Se seguirán las últimas recomendaciones en el análisis de microRNAs (84-85) para intentar conseguir una buena estandarización de todo el proceso, hecho clave para que los resultados de un nuevo biomarcador sean transferibles a un uso clínico real.



### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- **HIPÓTESIS:** la hipótesis de esta Tesis Doctoral es que un grupo de microRNAs presentes en el suero de pacientes sometidos a TxC puedan detectar precozmente la presencia de rechazo celular agudo del órgano trasplantado.
- **OBJETIVOS:** el propósito general del presente trabajo fue la búsqueda y validación de microRNAs que pudieran detectar RCA en el suero de los pacientes sometidos a TxC en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

El estudio se ha planteado con la intención de dar respuesta a los siguientes

**objetivos principales:**

1. Encontrar microRNAs en el suero de pacientes con TxC que se encuentren diferencialmente expresados durante un episodio de RCA.
2. Estudiar la capacidad diagnóstica para detectar RCA de los microRNAs diferencialmente expresados.

Adicionalmente se han establecido los siguientes **objetivos secundarios:**

3. Estudiar su implantación en un escenario real de seguimiento de TxC.
4. Valorar las posibles ventajas de los microRNAs frente a otros biomarcadores no invasivos de RCA en el TxC.

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Diseño del estudio

El diseño experimental consistió en un estudio prospectivo, observacional y unicéntrico donde se incluyeron pacientes intervenidos de TxC entre Abril de 2013 y Agosto de 2018 en el Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC, A Coruña, España).

El presente trabajo se enmarca en la línea de investigación en Insuficiencia Cardíaca Avanzada y Trasplante Cardíaco del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), que dirige la Dra. María G. Crespo Leiro. Esta línea de investigación cuenta con una colección de muestras y datos dada de alta en el Registro Nacional de Biobancos, Sección de Colecciones con el código de registro C:0000419. Este estudio fue aprobado por el Comité ético de investigación de Galicia (Referencia: 2015/311 (Anexo II)) y se realizó en conformidad con la guía ética de la Declaración de Helsinki. Los pacientes incluidos en este estudio firmaron el consentimiento informado para el uso de sus muestras biológicas e información clínica con fines de investigación.

Tras el TxC todos los pacientes tuvieron un programa de seguimiento que incluía BEMs secuenciales. El mismo día de la BEM al paciente se le extraía sangre para analítica de rutina y, si daban su consentimiento, el excedente de suero se guardaba en la seroteca para posterior uso en investigación clínica. También a todos los pacientes se les da de alta en la base de datos (Simón, Anexo III) con todas las variables clínicas que puedan ser de interés para su seguimiento y posterior análisis, especialmente la probabilidad de presentar rechazo en función de alguna de estas variables.

El estudio se diseñó para ser llevado a cabo en dos fases secuenciales. La primera fase, llamada fase de búsqueda, consistió en un estudio de perfiles de expresión de microRNAs. En esta fase se identificaron y seleccionaron aquellos microRNAs diferencialmente expresados durante un RCA. Los microRNAs seleccionados se incluyeron en una segunda fase de validación, donde se estudió su capacidad diagnóstica para detectar RCA en los pacientes trasplantados.

#### 4.1.1. Fase de búsqueda

En esta primera fase se identificaron aquellos pacientes que en la base de datos de la seroteca de TxC presentaban episodios de RCA (según BEM), es decir, con un grado igual o superior a "2R". Una vez seleccionados los pacientes con "BEM $\geq$ 2R", se buscó en estos mismos pacientes aquellos que, además, tuvieran una BEM=0R (es decir, sin RCA) inmediatamente antes y después del episodio de RCA. Los microRNAs se analizaron en las muestras de suero extraídas el mismo día que las BEM seleccionadas. Al episodio entero de rechazo y sus 3 muestras de suero correspondientes se las denominó "0R<sub>S1</sub> → 2R<sub>S2</sub> → 0R<sub>S3</sub>". En cada una de esas 3 muestras se analizaron 179 microRNAs (Anexo IV) mediante RT-qPCR, y las 3 muestras del mismo episodio se procesaron siempre en la misma serie analítica, a fin de minimizar la variabilidad analítica.

Para la siguiente fase de validación se seleccionaron, de entre los 179 microRNAs estudiados, aquellos que cumplieron las 3 condiciones siguientes:

- Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre 0R<sub>S1</sub> y 2R<sub>S2</sub>
- Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre 2R<sub>S2</sub> y 0R<sub>S3</sub>
- Un patrón de subida y bajada (o viceversa)

### 4.1.2. Fase de validación

En esta fase se evaluó la capacidad diagnóstica de los microRNAs seleccionados durante la fase anterior. Para ello, se identificó en la base de datos asociada a la seroteca de TxC, las BEM $\geq$ 2R no seleccionadas para la fase previa de búsqueda, bien porque no tenía BEM=0R antes y después, bien porque se extrajeron con posterioridad a la finalización de la primera fase. Los sueros extraídos el mismo día que las BEM $\geq$ 2R formaron el grupo de casos "RCA". Por otro lado, se seleccionaron BEM=0R y sus sueros asociados que no hubieran sido utilizados en la fase anterior. Estas muestra formaron el grupo control. En todas las muestras obtenidas se cuantificaron los microRNAs candidatos para evaluar su posible utilidad en el diagnóstico de RCA y en el manejo del paciente TxC.

## 4.2. Biopsias endomiocárdicas, rechazo celular agudo y régimen inmunosupresor

Las BEMs utilizadas en este estudio fueron examinadas por patólogos experimentados del Servicio de Anatomía Patológica y se clasificaron según el criterio ISHLT 2005 para RCA como: no rechazo "0R", rechazo leve "1R", rechazo moderado "2R" y rechazo severo "3R". Se consideró rechazo clínicamente significativo cuando el grado de EMB era  $\geq 2R$  (porque en pacientes asintomáticos sin disfunción del injerto, suele ser el umbral para el tratamiento de rechazo).

El protocolo estándar de inmunosupresión fue la terapia triple con tacrolimus, micofenolato de mofetilo y prednisona. Los pacientes recibieron terapia de inducción, principalmente con basiliximab y, en algunos casos, como en pacientes sensibilizados, timoglobulina. El tratamiento de los episodios de rechazo fue con bolo de esteroides intravenosos, 250 mg a 1000 mg según la gravedad, durante 3 días.

### 4.3. Análisis de microRNAs en el laboratorio

#### 4.3.1. Preanalítica de las muestras de suero

El mismo día que a los pacientes TxC se les realizó la BEM de seguimiento, se les extrajo de forma rutinaria sangre para realizar una analítica completa con fines asistenciales. La extracción se realizó mediante venopunción, en tubo de suero con gel separador (Vacuette), el cual se deja coagular 20 minutos para luego ser centrifugado 10 minutos a 1900 *g* y 4°C. Una vez que la analítica de rutina fue completada (normalmente en el mismo día), se recogió el suero sobrante (normalmente, en torno a 1,5 mL) en un vial Eppendorf correctamente identificado y se envió a la colección de muestras de “Insuficiencia Cardíaca”, donde se centrifuga el suero de nuevo 15 minutos a 3000 *g* y 4°C para eliminar totalmente restos celulares. Finalmente, las muestras de suero se dividieron en, al menos, 2 alícuotas de 500 µL cada una, se identificaron y congelaron a -80°C. En el momento de la extracción de la sangre, ninguno de los pacientes seleccionados para el estudio presentaba rechazo mediado por anticuerpos o utilizaba terapia con heparina/salicilato y ninguna muestra de suero presentaba hemólisis.

### 4.3.2. Extracción de los microRNAs del suero

En biología molecular, cuando se trabaja con DNA o RNA, tras la extracción de éstos en la muestra de interés (sangre, tejido, cultivos...), se suele medir su concentración para partir siempre de la misma concentración de DNA o RNA y estandarizar todo el proceso de análisis. Sin embargo, la cantidad de microRNAs en suero es muy baja y es muy difícil cuantificarla por los métodos habituales. Por ello, para estandarizar y normalizar los resultados del estudio, se partió siempre del mismo volumen de suero de 200 µL para todas las muestras (71). Antes de la extracción de los microRNAs se añadió a todas las muestras de suero una cantidad conocida de microRNAs sintéticos (Spike-in: UniSp6) para normalizar los resultados y como control interno de que todo el proceso de análisis ha ido correcto en cada etapa. También se añadió MS2, que mejora la capacidad de recuperación de los microRNAs durante el proceso de extracción (71). No se realizó digestión previa de las muestras de suero con DNAsas ya que no contienen cantidades de DNA suficientemente elevadas como para alterar nuestros resultados.

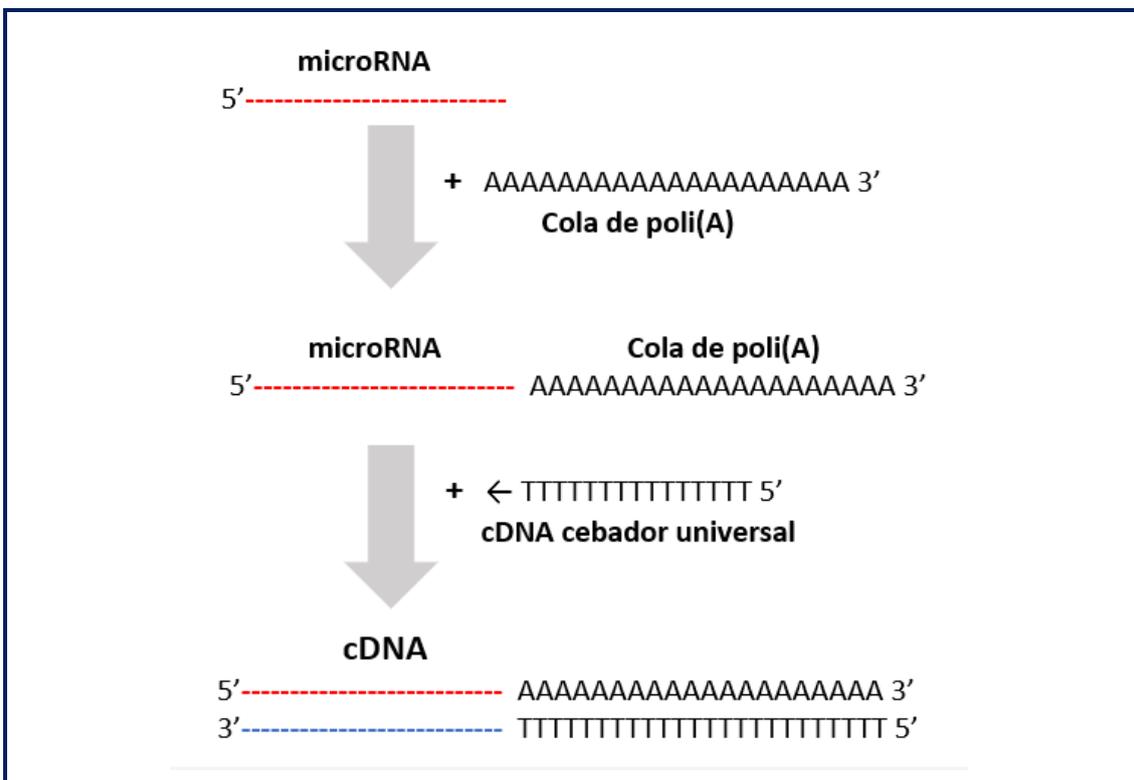
Para la extracción de los microARNs en este estudio se utilizó el kit “*miRNeasy Serum / Plasma Advanced Kit*” (cat: 217204, Qiagen, Alemania), que es un método sin fenol basado en la lisis de muestras de suero a base de guanidina, un paso de eliminación de inhibidores y la purificación de RNA total basado en membranas de sílice. El RNA total se eluyó en 21 µL de agua.

### 4.3.3. RT (*Reverse Transcriptase*)

Las técnicas de PCR utilizan siempre DNA, por lo que cuando se quiere analizar RNA en sus diferentes formas (mRNA, microRNA...) previamente a la qPCR hay que transformarlo en DNA. Para ello se realiza una reacción llamada de Transcripción Inversa (RT, *Reverse Transcription*), en donde el RNA monocatenario que queremos analizar por qPCR se transforma previamente en su DNA complementario (DNAc) de doble hebra. Para ello se siguió el siguiente procedimiento:

- **Fase de búsqueda:** la síntesis de DNAc se realizó utilizando el "kit mirCURY LNA RT" (Cat: 339340, Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En concreto, para obtener 20  $\mu\text{L}$  de reacción de RT se añadieron 4  $\mu\text{L}$  del microRNA aislado, 4  $\mu\text{L}$  de "5xRT Reaction Buffer", 2  $\mu\text{L}$  de "10xRT Enzyme Mix", 9  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasa y 1  $\mu\text{L}$  de spike-in UniSp6. La reacción de RT se incubó a 42°C durante 60 minutos (elongación) y 95°C durante 5 minutos (inactivación polimerasa) y se mantuvo a 4°C durante 5 minutos. El cDNA sintetizado se almacenó inmediatamente a -20°C hasta qPCR.
- **Fase de validación:** se realizó la RT de la misma forma en la fase anterior pero con la mitad de volumen de microRNA eluído y de todos los reactivos, dando un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  en lugar de 20  $\mu\text{L}$ .

Se eligieron los kits de RT *miRCURY* de Qiagen porque en una sólo reacción se pueden sintetizar los cDNAs de todos los microRNAs presentes en la muestra, reduciendo el volumen de muestra necesario así como el tiempo y por tanto el coste del proceso. En este caso se añade una cola de poli(A) a todos los microRNAs de tal modo que luego, con la ayuda de un cebador universal de poli(T), se consigue iniciar la reacción de elongación de todos los microRNAs presentes en la muestra (Figura 8).



**Figura 8:** Pasos de la RT (*Reverse Transcription*) del kit "RT miRCURY" (Qiagen)

#### 4.3.4. qPCR (*quantification Polymerase Chain Reaction*)

- **Fase de búsqueda:** se utilizó el kit “*miRCURY LNA miRNA Serum/Plasma Focus PCR Panel Kit* (Qiagen, cat: 339325)”. Éste incluye 2 placas de PCR de 96 pocillos con cebadores prealiquotados para 179 microRNA de suero (Anexo IV), además de calibradores interplaca y pocillos de blanco. Se utilizaron también 4 controles internos spike-in de RNA (UniSp2, UniSp4, UniSp5, UniSp6) para controlar cada etapa del proceso. Los 179 microRNA séricos estudiados se encuentran entre los más abundantes en el suero humano. Para cada muestra se mezclaron 20 µL de ADNc (procedentes de la RT del paso previo) con 980 µL de agua libre de RNAasa y 1000 µL de “*2xmiRCURY SYBR Green Master Mix*” (Qiagen, Cat: 339345). A continuación, se dispensaron 10 µL de esta mezcla en cada pocillo de los 2x96 pocillos. El reactivo “*2xmiRCURY SYBR Green Master Mix*” contiene un tampón de PCR, una mezcla de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y DNA polimerasa QuantiNova® (DNA Taq-polimerasa, anticuerpo QuantiNova, QuantiNova Guard). La qPCR se realizó en un *LightCycler 480 Real-Time PCR System* (Roche, Suiza) mediante un programa que comprendía una incubación a 95°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 10 segundos y 56°C durante 60 segundos. Las curvas obtenidas se estudiaron en el software de Roche LC para obtener el ciclo de cuantificación (Cq) por el método de la segunda derivada.

- **Fase de validación:** se utilizó el reactivo "*miRCURY LNA miRNA PCR Assay Kit (Qiagen, cat: 339306)*", diseñado para mir-181-5p. Primero se mezclaron 2  $\mu\text{L}$  de cDNA de la reacción de RT con 58  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasa (dilución final de cDNA 1:30). Luego, las reacciones de qPCRs de 10  $\mu\text{L}$  se realizaron en placas de 96 pocillos mezclando: 5  $\mu\text{L}$  de "*2xmiRCURY SYBR Green Master Mix*", 1  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAasa, 1  $\mu\text{L}$  de cebador y 3  $\mu\text{L}$  de DNAc (diluido 1:30).

La DNA polimerasa de este kit está inactiva a temperatura ambiente, evitando posibles amplificaciones inespecíficas hasta que comiencen los ciclos de qPCR. Cuando se calienta a 95°C durante 2 minutos se activa.

### 4.3.5. Tratamiento de los resultados. Normalización

Se estableció un punto de corte de  $Cq \geq 37$  por encima del cual se considera “no amplificación”, es decir, no se detecta microRNA. De la misma manera, si un microRNA no amplifica se considera que su  $Cq=37$ . Aquellos microRNAs que no se detectaron en más del 80% de las muestras se excluyeron para análisis posteriores y así reducir el ruido en los cálculos estadísticos. Normalización:

- Fase de búsqueda:** se utilizó el método de “Media Global, (MG)” para normalizar los resultados de la qPCR expresándose éstos como expresión relativa ( $2^{-\Delta Cq}$ ). Primero, se calculó la MG como el  $Cq$  promedio de todos los microARN en cada muestra. Posteriormente, todos los microRNA se normalizaron mediante:  $\Delta Cq = Cq_{miR} - Cq_{GM}$  y la expresión relativa se calculó utilizando el método ( $2^{-\Delta Cq}$ ). Finalmente, se utilizó el método Fold Change ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) para comparar la expresión relativa entre muestras de los diferentes grupos:  $-\Delta\Delta Cq = (Cq_{miR \text{ muestra1}} - Cq_{GM}) - (Cq_{miR \text{ muestra2}} - Cq_{GM})$
- Fase de validación:** se utilizó el algoritmo *geNorm* (*software qbase PLUS de Biogazelle*) para evaluar qué microRNA de la fase de búsqueda eran más estables y adecuados para normalizar los resultados de expresión de miR en la siguiente fase de validación. Con base en los resultados de *geNorm* (0.5 < promedio de *geNorm*  $M \leq 1.0$ ), el factor de normalización óptimo podría calcularse como la media geométrica de miR-23b-3p y miR-30c-5p. Ambos miR se seleccionaron como genes de referencia para normalizar los resultados en la fase de validación.



## 4.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 8.0. Las variables continuas se presentan como media (IC del 95%) cuando tienen una distribución normal y como mediana (rango intercuartílico RIQ, <25-75>) cuando tienen una distribución no normal. Los datos categóricos se muestran como recuento y porcentaje (n,%). La distribución de normalidad se evaluó con las pruebas de D'Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk. La correlación de Pearson (r) se utilizó para medir la fuerza de una asociación lineal entre 2 variables cuantitativas. Para ver la asociación entre variables cualitativas se utilizó el test exacto de Fisher. Un valor de p bilateral <0,05 se consideró estadísticamente significativa para todos los cálculos.

- **Fase de búsqueda:** el análisis de las diferencias entre 3 grupos (“OR<sub>S1</sub> → 2R<sub>S2</sub> → OR<sub>S3</sub>”) se realizó mediante el análisis de varianza unidireccional con datos pareados y la prueba de Tukey post-hoc (distribuida normalmente) o la prueba de Friedman con la corrección de Dunn (distribución no normal). Los niveles de expresión de microRNA relativos [ $2^{-(\Delta Cq)}$ ] se transformaron logarítmicamente (base2) antes de analizarlos estadísticamente al igual que en la fase de validación.
- **Fase de validación:** se realizó la prueba t de Student para datos no apareados (distribución normal) o la prueba U de Mann-Whitney (distribución no normal) para comparar las diferencias entre 2 grupos (fase de validación). Con el software MedCalc se generó una curva ROC para cada uno de los microRNA seleccionados. Se calcularon las áreas bajo la curva (AUC) y sus respectivos IC del 95% para evaluar la sensibilidad y la especificidad en la detección de RCA. Se calcularon el valor predicho negativo (VPN) y el valor predicho positivo (VPP) para el punto de corte con el AUC máximo (índice de Youden) y la prevalencia de RCA obtenida (% EMB ≥ 2R).



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Población de estudio

Entre Abril de 2013 y Agosto del 2018 se realizaron 121 Trasplantes Cardiacos (TxC) en nuestro hospital. En este grupo de pacientes, las cardiopatías primarias por orden de prevalencia fueron la miocardiopatía dilatada (n=45; 37%), la miocardiopatía isquémica (n=44; 36%), la miocardiopatía hipertrófica (n=13; 11%), miocardiopatías congénitas (n=6; 5%), miocardiopatías valvulares (n=5; 4%) y otras (n=8; 7%). La mediana de edad de los pacientes trasplantados fue de 59 años (Rango Inter cuartílico, RIQ: 49-65 años) siendo el 82% de ellos varones. Cuatro pacientes fallecieron durante el procedimiento quirúrgico. A los 117 pacientes restantes, durante el primer año post-TxC se les realizó un total de 1113 BEMs de seguimiento, con una mediana de BEMs por paciente de 9 (RIQ: 8-11). Estas BEMs estaban programadas a tiempos concretos: durante los 2 primeros meses cada 15 días, y luego 1 BEM cada mes hasta los 8 meses post-TxC. Estos tiempos se cumplieron escrupulosamente (Tabla 2).

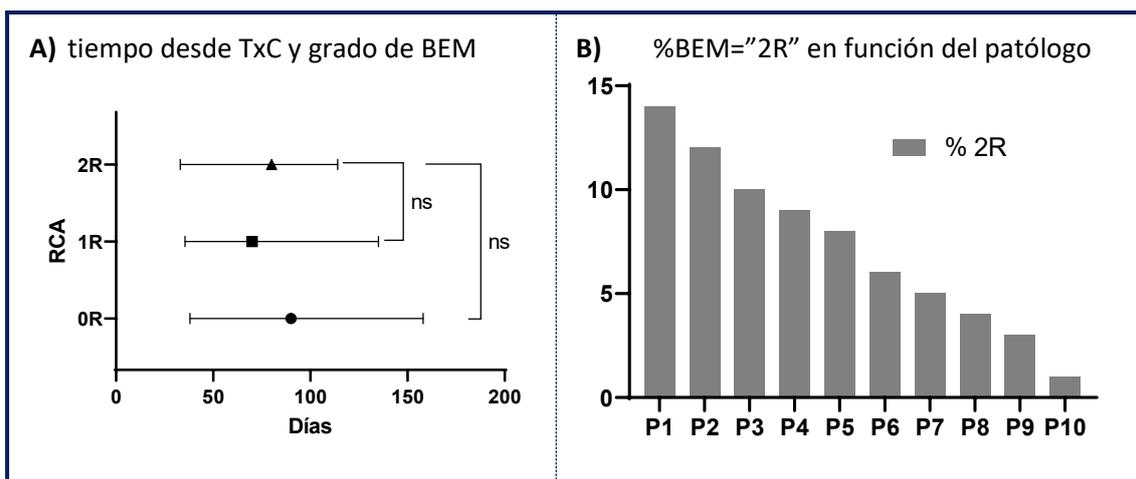
**Tabla 2:** Tiempo transcurrido desde el TxC hasta la BEM.

	BEMs (nº ordinal)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Días Desde TxC Mediana (RIQ)	11 (10-13)	25 (23-30)	43 (39-52)	64 (78-124)	90 (82-107)	121 (106-143)	155 (133-177)	184 (166-206)	241 (196-370)
Meses Desde TxC Mediana (RIQ)	0,4 (0,3-0,4)	0,8 (0,8-1)	1,4 (1,3-1,7)	2,1 (2,6-4,1)	3,0 (2,7-3,6)	4,0 (3,5-4,8)	5,2 (4,4-5,9)	6,1 (5,5-6,9)	8,0 (6,5-12,3)

BEM: Biopsia Endomiocárdica, RIQ: Rango Inter cuartílico TxC: trasplante cardiaco

El número de BEMs según el grado de RCA (ISHLT 2004) fueron: “Grado 0R” = 565 (51%), “Grado 1R” = 461 (41%), “Grado 2R” = 75 (7%), “Grado 3R” = 2 (0.2%) y “BEM No válida” = 10 (0.9%). Para el presente estudio se descartaron las BEMs donde se detectó rechazo mediado por anticuerpos, ya sea de manera aislada (n=3, 0.3%) o concomitante con RCA (n=17, 1.5%).

No se encontró asociación significativa entre la probabilidad de sufrir rechazo y el tiempo transcurrido desde el TxC (Figura 9A). Como se puede observar en la gráfica, no hay diferencia significativa en el tiempo (en días) donde aparecen BEM $\geq$ 2R y el resto de BEM sin rechazo. Por otro lado, sí que parece haber asociación entre el grado de BEM y el patólogo que la examina (Figura 9B). Como se observa en la gráfica, la dispersión de los resultados entre los 10 patólogos que revisaron más de 50 BEM en nuestro estudio es alta. Así, se comprobó que entre el patólogo que más RCA informó (BEM $\geq$ 2R = 14%) y el que menos (BEM $\geq$ 2R = 2%), había un 12% de diferencia, y por tanto, una variabilidad bastante importante.



**Figura 9:** Estudio RCA en función del tiempo post-TxC y en función del patólogo. A) Grado de RCA en función del tiempo post-TxC; B) %BEM = "2R" en función del patólogo. BEM: biopsia endomiocárdica. RCA: Rechazo Celular Agudo; TxC: Trasplante Cardíaco, Px: patólogo "x"

El 93.8% de los pacientes TxC llevaron un régimen inmunosupresor a base Tacrolimus, Micofenolato de mofetilo y Prednisona. El 6.2% restante se inmunosuprimió con Ciclosporina, Micofenolato de mofetilo y Prednisona. La terapia de inducción con Basiliximab se utilizó en el 93,8% de pacientes y con Timoglobulina en el 6,2%. Durante los episodios de RCA a los pacientes se les suministró un bolo intravenoso de Metilprednisolona durante 3 días, 250 mg/día (52,4%), 500 mg/día (38,1%), o 1 g/día (9,5%).



## 5.2. Fase de búsqueda

De los 121 pacientes TxC sólo 11 pacientes presentaban un episodio “ $OR_{S1} \rightarrow 2R_{S2}$  →  $OR_{S3}$ ” y 5 pacientes con 2 episodios “ $OR_{S1} \rightarrow 2R_{S2} \rightarrow OR_{S3}$ ” separados en el tiempo. Es decir, se encontraron un total de 21 episodios RCA “ $OR_{S1} \rightarrow 2R_{S2} \rightarrow OR_{S3}$ ”, de los que se seleccionaron sus respectivas muestras de suero (21 episodios x 3 sueros = 63 sueros). Las características de los pacientes en cada grupo de muestras “ $OR_{S1}$ ”, “ $2R_{S2}$ ”, “ $OR_{S3}$ ” se detallan en la Tabla 3:

**Tabla 3:** características por grupo de muestras “ $OR_{S1}$ ”, “ $2R_{S2}$ ”, “ $OR_{S3}$ ” de la fase de búsqueda.

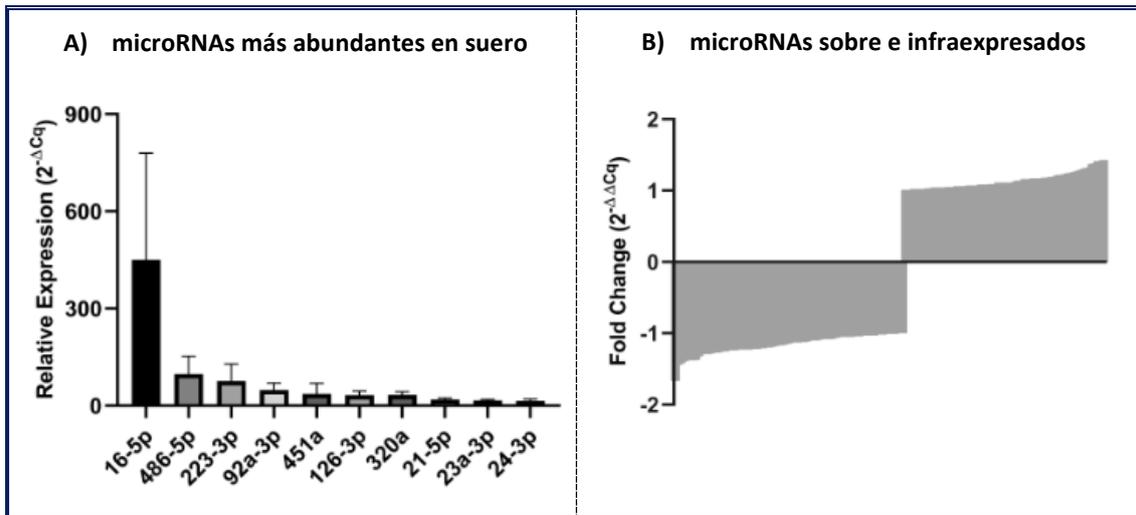
<b>N=21</b> <b>(<math>OR_{S1} \rightarrow 2R_{S2} \rightarrow OR_{S3}</math>)</b>	<b><math>OR_{S1}</math></b>	<b><math>2R_{S2}</math></b>	<b><math>OR_{S3}</math></b>	<b>P-value</b>
<b>días post-TxC</b> (IC 95%)	58 (35-80)	102 (79-125)	178 (139-216)	todos <0,0001
<b>Tacrolimus (ng/mL)</b> (RIQ)	11,2 (9,8-12,7)	9,4 (8,1-10,7)	9,3 (8,2-10,4)	todos NS
<b>Creatinina (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b> (RIQ)	149 (130-170)	133 (120-146)	144 (124-164)	todos NS
<b>Hematíes (<math>\times 10^{12}/\text{L}</math>)</b> (RIQ)	3,46 (3,27-3,66)	3,57 (3,30-3,84)	3,81 (3,59-4,03)	$OR_{S1}$ vs $OR_{S3}$ < 0,005
<b>Plaquetas (<math>\times 10^9/\text{L}</math>)</b> (RIQ)	176 (146-206)	166 (138-193)	173 (143-203)	todos NS
<b>Leucocitos (<math>\times 10^9/\text{L}</math>)</b> (RIQ)	7,35 (6,06-8,64)	6,19 (5,02-7,37)	7,05 (5,91-8,20)	todos NS
<b>Linfocitos (<math>\times 10^9/\text{L}</math>)</b> (IC 95%)	0,82 (0,60-1,05)	1,06 (0,84-1,29)	1,18 (0,98-1,37)	$OR_{S1}$ vs $2R_{S2}$ < 0,05 $OR_{S1}$ vs $OR_{S3}$ < 0,05
<b>Neutrófilos (<math>\times 10^9/\text{L}</math>)</b> (RIQ)	5,99 (4,71-7,27)	4,48 (3,50-5,46)	5,17 (4,13-6,20)	todos NS
<b>CMV (carga viral)</b>	Indetectable			--

CMV: citomegalovirus; IC: Intervalo de confianza; NS: no significativo; RIQ: rango intercuartilico; TxC: trasplante cardiaco

El número de días transcurridos desde el TxC hasta cada uno de los 3 grupos de muestras fueron: 58 días (RIQ: 35-80) para el grupo "OR<sub>S1</sub>", 102 días (RIQ: 79-125) para "2R<sub>S2</sub>", y 178 días (RIQ: 139- 216) para "OR<sub>S3</sub>". Es importante señalar que la consideración planteada inicialmente de que las muestras "BEM=OR" sin rechazo fueran inmediatamente anteriores y posteriores a la muestra con rechazo "2R" tuvo que ser desestimada porque sino, no tendríamos más que un episodio que cumpliera con ese requisito. En la mayoría de los pacientes, antes y después de la muestra "2R<sub>S2</sub>" se daban estados intermedios de rechazo celular "1R", lo cual es lo esperado fisiológicamente. No obstante, el propósito final del estudio, de plantear un diseño longitudinal no se ve afectado.

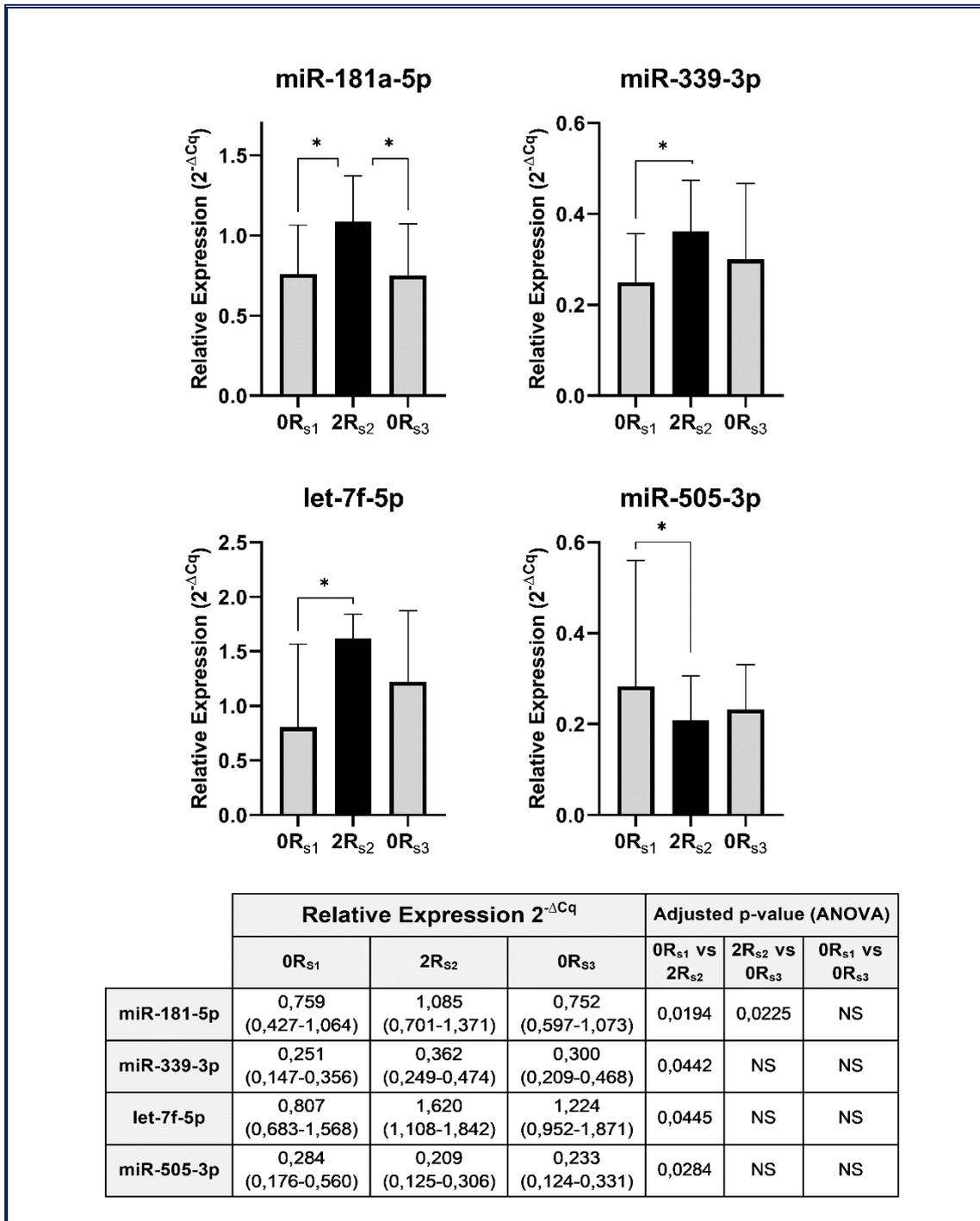
Los 3 grupos "OR<sub>S1</sub>", "2R<sub>S2</sub>", "OR<sub>S3</sub>" fueron comparables en cuanto a niveles de tacrolimus, creatinina sérica, plaquetas, leucocitos totales y neutrófilos. Se detectó una ligera diferencia, aunque significativas ( $p < 0,05$ ), en el recuento de hematíes entre las muestras "OR<sub>S1</sub>" y "OR<sub>S3</sub>", así como para linfocitos entre la muestra "OR<sub>S1</sub>" frente a las otras 2 muestras "2R<sub>S2</sub>" y "OR<sub>S3</sub>". Ningún paciente tenía infección por citomegalovirus (CMV) en el momento del muestreo (carga viral indetectable).

El ciclo de cuantificación  $C_q$  medio de los 179 microRNAs analizados en cada una de las 63 muestras de suero fue  $C_q = 34.7$  (IC 95%: 34.5-35.0) sin diferencias significativas entre los 3 grupos " $OR_{S1}$ ", " $2R_{S2}$ " y " $OR_{S3}$ ". En el grupo " $OR_{S1}$ " el ciclo medio fue  $C_{qOR_{S1}} = 34.7$  (IC 95%: 34.2-35.1), en el grupo " $2R_{S2}$ " fue  $C_{q2R_{S2}} = 34.7$  (IC 95 %: 34.3-35.1), y en el grupo " $OR_{S3}$ " fue  $C_{qOR_{S3}} = 34.8$  (IC 95%: 34.4-35.2). De los 179 microRNAs analizados, 31 de ellos no se expresaron ( $C_q \geq 37$ ) en más del 80% de las muestras, por lo que no fueron incluidos en el posterior análisis de los datos (Anexo IV). De los restantes 148 microRNAs, sólo 10 de ellos se expresaron en todas las muestras analizadas: miR-16-5p, miR-23a-3p, miR-25-3p, miR-30d-5p, miR-92a-3p, miR-150-5p, miR-223-3p, miR-320a, miR-320b y miR-486-5p. Por otro lado, los 10 microRNAs más abundantes se representan en la Figura 10. En la misma figura también se aprecia que hay prácticamente la misma cantidad de microRNAs sobreexpresados ( $n=69$ , 47%) como infraexpresados ( $n=79$ , 53%) cuando se compara el grupo con rechazo " $2R_{S2}$ " frente al grupo sin rechazo " $OR_{S1}$ ". Esto es muy importante porque indica la correcta normalización y tratamiento de los datos en nuestra población de estudio, ya que es lo que se espera desde un punto de vista biológico.



**Figura 10:** Expresión de microRNAs en nuestro estudio, aspectos generales. A) microRNAs más abundantes en suero; B) microRNAs sobre e infraexpresados. Cq: ciclo de cuantificación

De los 148 microARN analizados, sólo 4 de ellos mostraron una diferencia significativa en la expresión relativa ( $2^{-\Delta Cq}$ ) entre los grupos “0R<sub>s1</sub>” y “2R<sub>s2</sub>”: miR-181a-5p, miR- 339-3p, let-7f-5p y miR-505-3p (Figura 11).



**Figura 11:** microRNAs diferencialmente expresados en la fase de búsqueda. NS: no significativo

No obstante, sólo miR-181a-5p mostró también una diferencia significativa entre “2R<sub>S2</sub>” y “0R<sub>S3</sub>” con un patrón de subida y bajada. En los otros tres microRNAs, aunque en las gráficas se observa un patrón también de subida y bajada, no se alcanza la significancia deseada, por lo que no se incluyen en la siguiente fase de validación.

Por otro lado, se estudió si los niveles séricos de miR-181a-5p podrían estar asociados al recuento de linfocitos en sangre más que al RCA. Recordemos que la variable “linfocitos” era la única de las estudiadas donde había diferencia significativa entre las tres muestras del episodio de rechazo “0R<sub>S1</sub> → 2R<sub>S2</sub> → 0R<sub>S3</sub>”. Para ello, se estudió la correlación entre ambas variables (“miR-181a-5p” y “linfocitos”) obteniéndose un “r” de Spearman = 0.170 (IC 95 %: -0.096 a 0.412). Esto implica que no hay correlación entre ambas variables y que la expresión de miR-181a-5p es independiente del recuento de linfocitos en sangre.

### 5.3. Fase de validación

Para el grupo “RCA” ( $BEM \geq 2R$ ) se identificaron 45 muestras de suero, todas ellas correspondían a un grado “2R” excepto una, que era “3R”. Para el grupo control sin rechazo, “NoR”, se buscaron el mismo número de muestras, pero con  $BEM=0R$  y que no pertenecieran a ningún paciente incluido en el grupo “RCA”. Se estudiaron varias variables clínicas en ambos grupos a fin de comprobar que no hubiera diferencias significativas entre ambos. El tiempo (días) transcurrido desde el TxC hasta la fecha de la toma de muestra fue de 51 días (RIQ: 26-99) para el grupo “RCA” y 100 días (RIQ: 44-170) para el grupo “No-R”. El resto de las características de los pacientes se detallan en la Tabla 4 y no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguna de las variables estudiadas.

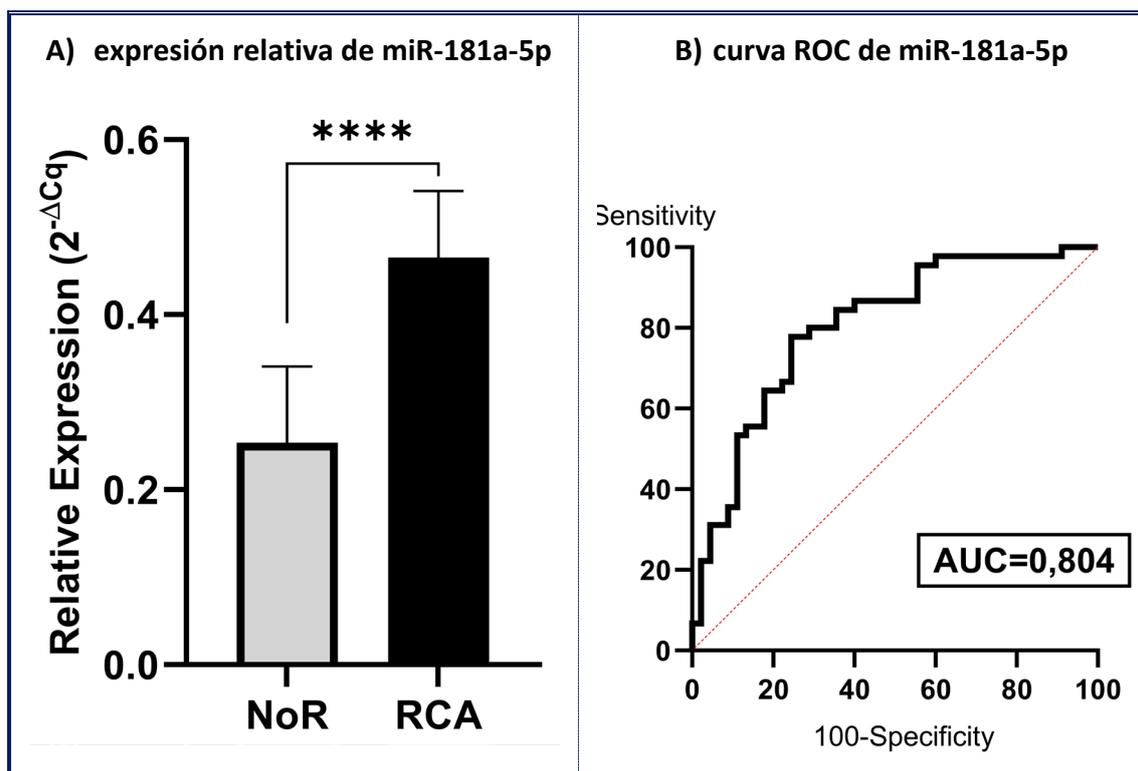
**Tabla 4:** Características basales de los pacientes en la fase de validación

Característica	NoR (n=45)	RCA (n=45)	P-value
<b>Hombres</b>	36 (80%)	36 (80%)	-
<b>Edad</b> (a fecha del TxC)	60 (44-65)	55 (49-63)	NS
<b>días post-TxC</b> (IC 95%)	100 (44-170)	51 (26-99)	< 0.005
<b>Tacrolimus</b> (ng/mL) (RIQ)	11.1 (9.9-12.2)	10.6 (9.4-11.7)	NS
<b>Creatinina</b> ( $\mu\text{mol/L}$ ) (RIQ)	110 (88-133)	98 (77-133)	NS
<b>Hematíes</b> ( $\times 10^{12}/\text{L}$ ) (RIQ)	3.71 (3.52-3.89)	3.60 (3.48-3.73)	NS
<b>Plaquetas</b> ( $\times 10^9/\text{L}$ ) (RIQ)	223 (199-247)	216 (183-249)	NS
<b>Leucocitos</b> ( $\times 10^9/\text{L}$ ) (RIQ)	6.19 (5.35-7.92)	6.68 (4.58-9.17)	NS
<b>Linfocitos</b> ( $\times 10^9/\text{L}$ ) (IC 95%)	1.14 (0.96-1.31)	1.20 (1.03-1.37)	NS
<b>Neutrófilos</b> ( $\times 10^9/\text{L}$ ) (RIQ)	4.52 (3.43-5.93)	4.69 (3.06-7.17)	NS

IC: Intervalo de confianza; NS: no significativo; NoR: no rechazo; RCA: rechazo celular agudo; RIQ: rango intercuartílico; TxC: trasplante cardiaco



Al cuantificar miR-181a-5p en ambos grupos se encontró que estaba sobreexpresado significativamente ( $p < 0.0001$ ) en el grupo "RCA" en comparación con el grupo "NoR". La mediana de los niveles de expresión de miR-181a-5p fue de 0.465 (RIQ: 0.338-0.541) y 0.254 (RIQ: 0.155-0.341) en los grupos "RCA" y "NoR", respectivamente (Figura 12A). El análisis de sensibilidad al desarrollar la curva ROC de miR-181a-5p para detectar RCA, mostró que para un punto de corte " $2^{-\Delta Cq} > 0.33$ ", se obtenía un AUC = 0.804 (IC 95%: 0.707-0.880) ( $p < 0.0001$ ) (Figura 12B). La sensibilidad y especificidad obtenidas para este punto de corte fue 78% y 76%, respectivamente. En nuestro estudio se observó una prevalencia de RCA del 7% ( $BEM \geq 2R$ ), y unas valores de VPN y VPP de 98% y 20%, respectivamente.



**Figura 12:** Resultados principales de miR-181a-5p en la fase de validación. A: expresión relativa de miR-181a-5p en NoR y RCA; B: curva ROC de miR-181a-5p para detección de RCA. AUC: area under the curve; NoR: sin rechazo; RCA: rechazo celular agudo

**Tabla 5:** análisis de los resultados de las curvas ROC obtenidos por miR-181a-5p para detectar RCA en nuestro estudio (obtenidas del software Medcalc)

Variable	miR-181a-5p		
Classification variable	ACR		
Sample size	90		
Positive group <sup>a</sup>	45 (50.00%)		
Negative group <sup>b</sup>	45 (50.00%)		
<sup>a</sup> ACR = 1			
<sup>b</sup> ACR = 0			
<b>Area under the ROC curve (AUC)</b>			
Area under the ROC curve (AUC)	0.804		
Standard Error	0.0466		
95% Confidence interval	0.707 to 0.880		
z statistic	6.522		
Significance level P (Area=0.5)	<0.0001		
<b>Youden index</b>			
Youden index J	0.5333		
Associated criterion	>0.329858889		
Sensitivity	77.78		
Specificity	75.56		
<b>Summary Table</b>			
Estimated specificity at fixed sensitivity			
Sensitivity	Specificity	95% CI <sup>a</sup>	Criterion
80.00	71.11	46.67 to 88.89	>0.310092392
90.00	44.44	24.90 to 66.67	>0.235499366
95.00	44.44	11.11 to 71.02	>0.216587786
97.50	40.00	4.44 to 57.96	>0.197178108
99.00	8.89	0.053 to 40.00	>0.090512926
Estimated sensitivity at fixed specificity			
Specificity	Sensitivity	95% CI <sup>a</sup>	Criterion
80.00	64.44	39.04 to 86.67	>0.377303837
90.00	35.56	9.13 to 62.22	>0.500348699
95.00	31.11	8.89 to 68.89	>0.523168479
97.50	22.22	0.00 to 0.00	>0.571089331
99.00	6.67	0.00 to 0.00	>0.879074395
<sup>a</sup> BC <sub>a</sub> bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).			

## 6. DISCUSIÓN

Desde hace más de 3 décadas la biopsia endomiocárdica (BEM) se considera el *gold standard* para el seguimiento de los pacientes con TxC. Con ella, se puede detectar si el órgano trasplantado está sufriendo rechazo y, en ese caso, ajustar el tratamiento(38-42). No obstante, la BEM es una técnica con muchas limitaciones asociadas . Al ser un procedimiento invasivo no está exento de riesgo (43-44), además, la toma de muestra puede no representar al órgano en su totalidad y no detectar un rechazo en curso (45). Pero la limitación más importante es la subjetividad en la valoración anatómo-patológica que lleva asociada una gran variabilidad en la clasificación correcta del rechazo (46) y, por tanto, de su tratamiento. Son numerosos los estudios buscando biomarcadores no invasivos que sustituyan o complementen la BEM (47). Entre los más prometedores son las técnicas de imagen (ecocardiograma y resonancia magnética cardiaca) (50-53), los perfiles de expresión génica (Allomap®) (54-58) y el DNA libre derivado del donante (dd-cfDNA) (59-67). También los microRNAs se han postulado como potenciales biomarcadores no invasivos en la detección de rechazo y manejo del paciente trasplantado (75-82).

En el estudio que ocupa esta Tesis Doctoral, después de una fase inicial de búsqueda donde se analizaron 179 microRNAs (Anexo IV) en sueros procedentes de pacientes TxC. Sólo miR-181a-5p cumpliría las estrictas condiciones para pasar a la fase siguiente de validación clínica. Así, se objetivó que miR-181a-5p mostraba un patrón de subida y bajada significativas durante los episodios de RCA estudiados. Para ver si miR-181a-5p conseguía replicar estos resultados con una cohorte de pacientes diferentes, se desarrolló una segunda fase de validación. En esta nueva fase, miR-181a-5p constató

## 6. DISCUSIÓN

que estaba sobreexpresado en los sueros de pacientes con RCA ( $BEM \geq 2R$ ), frente a los sueros de pacientes sin rechazo ( $BEM=0R$ ). El área bajo la curva ROC obtenida por nuestro candidato miR-181a-5p fue muy buena,  $AUC = 0.804$  (IC 95%: 0.707-0.880), y una sensibilidad y especificidad del 78% y 76%, respectivamente.

Hasta el año 2022, en base a los resultados de 7 artículos científicos (incluyendo el nuestro)(75-80, 88), pertenecientes a 5 grupos de investigación diferentes, 13 microRNAs diferentes se postulaban como candidatos a biomarcadores de RCA en TxC (Tabla 1). De los 13 microRNAs propuestos sólo dos, miR-92a-5p y miR-144-3p, aparecen en más de un grupo diferente. En nuestro estudio sólo miR-339-3p aparece en alguno de los otros estudios y, aunque diferencialmente expresado, no consiguió cumplir nuestro criterio de subida y/o bajada significativa para pasar a la siguiente fase de validación (88). Esta falta de reproducibilidad entre estudios donde se trabaja con microRNAs no es exclusivo de los que abordan el TxC, sino que es común en todos los estudios con microRNAs, independientemente de la patología estudiada (83). Esta limitación podría explicarse, en parte, por un tamaño muestral limitado, la pobre estandarización de todas las etapas del análisis de los microRNAs y el uso de varias estrategias para la normalización de los datos. En nuestro estudio, se han seguido las últimas y más exigentes recomendaciones para la estandarización de los experimentos realizados con microRNAs circulantes (84-85).

## 6. DISCUSIÓN

El diseño longitudinal de nuestro experimento en la fase de búsqueda de microRNAs candidatos, en donde se estudió al mismo paciente antes, durante y después del episodio de rechazo, proporciona potencia y significancia estadística (al ser cada paciente su propio control). Además se ha conseguido un tamaño muestral bastante bueno. Por otro lado, cuando se realizan experimentos de perfil de expresión de microRNAs, siempre se debería comprobar que el número de microRNAs sobre e infraexpresados sean parecidos, así se demostraría que el método de normalización utilizado es correcto. En nuestro estudio, durante la fase inicial de búsqueda con perfiles de expresión, después de una normalización utilizando la media global, se comprobó que dicha normalización era correcta (Figura 11B). En la fase de validación, la normalización de los resultados de la RT-qPCR, se realizó con 2 genes endógenos de referencia (miR-23b-3p y miR-30c-5p) y el método de la media geométrica.

## 6. DISCUSIÓN

Un hecho muy importante y que apoya los resultados de nuestro estudio la relación entre miR-181a-5p y rechazo celular, es que ya se ha descrito que la familia miR-181 regula el desarrollo de los linfocitos T y B (89-92), principales mediadores del rechazo de un órgano trasplantado. Li *et al.* (90) demostraron que miR-181a modula la sensibilidad de los linfocitos T tanto a antígenos extraños como endógenos a través de la señalización del receptor de linfocitos T. También se demostró que la sobreexpresión de miR-181a aumenta el número de linfocitos B. En el corazón, durante un episodio de RCA, los linfocitos T median un proceso inflamatorio que lleva a la infiltración y lesión del miocardio por células mononucleares (macrófagos activados, linfocitos T y B). El alto grado de evidencia de que miR-181a está involucrado en esta respuesta aloinmune hace que nuestros resultados sean muy plausibles desde el punto de vista biológico. Además, este hecho refuerza no sólo la hipótesis planteada a lo largo de esta Tesis Doctoral de considerar miR-181a-5p como biomarcador no invasivo en la detección de RCA, sino también para la monitorización del tratamiento inmunosupresor e, incluso, como posible diana terapéutica.

## 6. DISCUSIÓN

En la actualidad, sólo hay una prueba no invasiva aprobada por la FDA y recomendada por la ISHLT para el seguimiento del RCA, el Allomap® (CareDx) (55-58). Este test, basado en un perfil de expresión génica de leucocitos sanguíneos, consiguió un AUC= 0.70, inferior al obtenido por miR-181a-5p en nuestro estudio, que fue AUC = 0.80 (Tabla 6). Para poder comparar la capacidad de detección de rechazo de varios biomarcadores no invasivos *versus* miR-181a-5p se eligió para todos una prevalencia de 5% que, aunque arbitraria, está próxima a un escenario real de TxC. Así podemos comparar los VPN y VPP de estos test entre sí (ya que VPN y VPP dependen de la prevalencia). Nuestros resultados mostraron que miR-181a-5p presentó un VPN de 98.5%, mientras que el VPN de Allomap® es ligeramente menor (VPN = 95,7 %). Por lo tanto, los resultados aquí obtenidos para miR-181a-5p son similares, o incluso mejores que los de Allomap® y que el dd-cfDNA o la RMC (53, 58, 66).

**Tabla 6:** Características de los principales biomarcadores no invasivos en la detección de RCA en TxC.

Test	Autor Año (Ref)	Pacientes (BEM≥2R)	Meses post-TxC	AUC (95% CI)	S	E	VPN <sup>†</sup>	VPP <sup>†</sup>
RMC	Marie 2001 (53)	123 (8)	>1	-	89	70	99	13
Allomap	Crespo 2016 (58)	425 (55)	2-6	0.70 (0.67-0.73)	25	89	96	10
dd-cfDNA	Vlaminck 2014 (66)	185 (24)	>1	0.83	58	93	98	30
miR-181a-5p	Constanso 2018 (88)	90 (45)	>1	0.80 (0.71-0.88)	78	76	99	15

AUC: Area Under the Curve; BEM: Biopsia Endomiocárdica; dd-cfDNA: cell-free donor derived DNA; E: especificidad; RCA: rechazo celular agudo; RMC: resonancia magnética cardiaca; S: Sensibilidad; VPN: Valor Predictivo Negativo; VPP: Valor Predictivo Positivo TxC:trasplante cardiaco

†: VPN y VPP calculado para una prevalencia arbitraria de RCA del 5%

## 6. DISCUSIÓN

Lo que se busca, *a priori*, con estos biomarcadores no invasivos es alcanzar altos VPN, que permitan cribar a todos los pacientes en seguimiento de TxC para seleccionar aquellos con más riesgo de padecer RCA. Todo ello con una seguridad muy alta de que no se escape ningún RCA. Cuando estos biomarcadores no invasivos detectan un posible RCA entonces, en principio, sí que habría que realizar la BEM, ya que todos los biomarcadores no invasivos en uso tienen un VPP muy bajo, es decir, su positividad no implica necesariamente RCA. Con esta estrategia de cribado se reducirían el número de biopsias necesarias en el seguimiento del paciente TxC, y con ello, se reducirían los posibles efectos adversos para el paciente y los costes monetarios asociados a las BEM (93). La ventaja de miR-181a-5p frente al resto de biomarcadores no invasivos sería la sencillez de la tecnología necesaria y del proceso de análisis, que no requiere una alta especialización del personal que la realiza, ni laboriosos procedimientos, ni envíos de muestras a laboratorios externos, todo ello a un coste muy ajustado y con grandes posibilidades de estandarización del proceso.

### Limitaciones

Nuestro estudio tiene varias limitaciones, las más relevantes serían su carácter unicéntrico y que no se valoraron el efecto de diferentes tratamientos u otras condiciones clínicas sobre los niveles de miR-181a-5p. No obstante, recientemente se ha llevado a cabo un estudio multicéntrico (4 hospitales españoles) para validar miR-181a-5p como biomarcador no invasivo de RCA. Los resultados han sido positivos, obteniendo una potencia diagnóstica similar a nuestro estudio (pendiente de publicación, ya presentado póster en Congreso Europeo de Cardiología 2023, ver Anexo V).

El miR-181a-5p aunque parece ser un biomarcador de RCA prometedor, queda un largo camino hasta que pueda llegar a un escenario clínico real, siendo conveniente para ello el desarrollo de PCR digital para estandarizar los resultados obtenidos. Cabe destacar que nuestros resultados se han obtenido en condiciones ideales, ya que se dispuso de muestras de pacientes con (EMB  $\geq$ 2R) y sin rechazo.

Finalmente, y aunque realizamos un ambicioso estudio donde se estudiaron los 179 microRNAs más expresados en suero, otros microRNAs no incluidos también podrían tener un papel en el RCA.

## 6. DISCUSIÓN

## 7. CONCLUSIONES

En el presente estudio, desarrollado a través de esta Tesis Doctoral, se ha postulado la hipótesis del uso de los microRNAs como biomarcadores no invasivos para la detección de rechazo celular agudo en el seguimiento del paciente trasplantado cardiaco. Para ello, tras un fase inicial de búsqueda donde se han analizado 179 microRNAs en el suero de 63 muestras, 21 de ellas con RCA ( $BEM \geq 2R$ ), se selecciona sólo un microRNA, el miR-181a-5p, como biomarcador no invasivo para detectar RCA. Este microRNA candidato se validó en la siguiente fase donde se analizaron 45 muestras de suero con RCA ( $BEM \geq 2R$ ) y 45 sueros sin rechazo asociado ( $BEM = 0R$ ). Finalmente, se obtuvieron las siguientes resultados y conclusiones:

1. El microRNA miR-181a-5p está sobreexpresado en los sueros de los pacientes que presentan RCA asociado ( $BEM \geq 2R$ ).
2. miR-181a-5p permitió detectar RCA ( $BEM \geq 2R$ ) frente a un grupo sin rechazo ( $BEM = 0R$ ) con una sensibilidad = 78%, una especificidad = 76% y un AUC = 0.804 (IC 95%: 0.707-0.880).
3. En un escenario real en TxC de prevalencia del RCA en torno al 5% de las BEM, miR-181a-5p consigue un alto valor predictivo negativo VPN = 98.5% . Esto lo convierte en una buena herramienta de cribado de RCA, con poca probabilidad de falsos negativos, permitiendo una importante reducción de BEMs en el seguimiento del TxC.
4. La simplicidad, bajo coste, posibilidad de estandarización y similar rendimiento diagnóstico que otros biomarcadores no invasivos para la detección del RCA en el TxC, parece justificado considerar a miR-185a-5p como potencial herramienta en el seguimiento post-TxC.



## ÍNDICE DE TABLAS

	Pag
<b>Tabla 1:</b> estudios con microRNAs circulantes asociados a RCA en TxC.....	43
<b>Tabla 2:</b> tiempo transcurrido desde el TxC hasta la BEM.....	63
<b>Tabla 3:</b> características por grupo de muestras “OR <sub>S1</sub> ”, “2R <sub>S2</sub> ”, “OR <sub>S3</sub> ” de la fase de búsqueda.....	67
<b>Tabla 4:</b> características basales de los pacientes en la fase de validación.....	73
<b>Tabla 5:</b> análisis de los resultados de las curvas ROC obtenidos por miR-181a-5p para detectar RCA en nuestro estudio.....	76
<b>Tabla 6:</b> Características de los principales biomarcadores no invasivos en la detección de RCA en TxC.....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
<b>Figura 1:</b> mortalidad absoluta para la IC y el IAM entre 2007-2022.....	15
<b>Figura 2:</b> número de TxC entre 1984-2022 totales y por edad.....	17
<b>Figura 3:</b> comparación de las curvas de supervivencia de TxC entre 2013-2022 y 1984-2012.....	19
<b>Figura 4:</b> principales causas de muerte por periodods post-TxC entre 2013-2022.....	21
<b>Figura 5:</b> biología de los microRNA, síntesis y función.....	36
<b>Figura 6:</b> Tipos de secreción de los microRNAs del interior celular a la circulación.....	38
<b>Figura 7:</b> principales resultados del estudio de Blanco-Domínguez et al donde buscan un microRNA candidato para la detección de miocarditis aguda.....	40
<b>Figura 8:</b> pasos de la RT (Reverse Transcription) del kit “RT miRCURY” (Qiagen).....	56
<b>Figura 9:</b> estudio RCA en función del tiempo post-TxC y en función del patólogo.....	64
<b>Figura 10:</b> expresión de microRNAs en nuestro estudio, aspectos generales.....	70
<b>Figura 11:</b> microRNAs diferencialmente expresados en la fase de búsqueda.....	71
<b>Figura 12:</b> resultados principales de miR-181a-5p en la fase de validación.....	75



## BIBLIOGRAFÍA

1. <https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es>
2. Roger VL, Weston SA, Redfield MM, *et al.* Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* 2004;292:344\_350
3. Barasa A, Schaufelberger M, Lappas G, *et al.* Heart failure in young adults: 20-year trends in hospitalization, aetiology, and case fatality in Sweden. *Eur Heart J* 2014;35:25\_32.
4. Jhund PS, Macintyre K, Simpson CR, *et al.* Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation* 2009;119:515\_523.
5. Dunlay SM, Redfield MM, Weston SA, *et al.* Hospitalizations after heart failure diagnosis a community perspective. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:1695\_1702.
6. Taylor CJ, Ordonez-Mena JM, Roalfe AK, *et al.* Trends in survival after a diagnosis of heart failure in the United Kingdom 2000-2017: population based cohort study. *BMJ* 2019;364:l223.
7. Savarese G, Lund LH. Global public health burden of heart failure. *Card Fail Rev* 2017;3:7\_11.
8. Al-Mohammad A, Mant J, Laramée P, *et al.* Chronic Heart Failure Guideline Development Group. Diagnosis and management of adults with chronic heart failure: summary of updated NICE guidance. *BMJ* 2010;341:c4130.
9. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, *et al.* ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2022 Jan;24(1):4-131.

10. Conrad N, Judge A, Tran J, *et al.* Temporal trends and patterns in heart failure incidence: a population-based study of 4 million individuals. *Lancet* 2018;391:572\_580.
11. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018;392:1789\_1858.
12. van Riet EE, Hoes AW, Limburg A, *et al.* Prevalence of unrecognized heart failure in older persons with shortness of breath on exertion. *Eur J Heart Fail* 2014;16:772\_777.
13. van Riet EE, Hoes AW, Wagenaar KP, *et al.* Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. *Eur J Heart Fail* 2016;18:242\_252.
14. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics— 2018 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2018;137:e67\_e492.
15. Ceia F, Fonseca C, Mota T, *et al.*, EPICA Investigators. Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study. *Eur J Heart Fail* 2002;4:531\_539.
16. Macintyre K, Capewell S, Stewart S, *et al.* Evidence of improving prognosis in heart failure: trends in case fatality in 66 547 patients hospitalized between 1986 and 1995. *Circulation*.2000; 102:1126-1131.
17. Crespo-Leiro MG, Metra M, Lund LH, *et al.* Advanced heart failure: a position statement of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*. 2018 Nov;20(11):1505-1535.
18. Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med*.2003;348:2007-2018

19. Davis MK, Hunt SA. State of the art: cardiac transplantation. *Trends Cardiovasc Med.* 2014 Nov; 24(8): 341-9.
20. Khush KK, Hsich E, Potena L, *et al.* International Society for Heart and Lung Transplantation. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-eighth adult heart transplantation report - 2021; Focus on recipient characteristics. *J Heart Lung Transplant.* 2021 Oct;40(10):1035-1049.
21. González-Vílchez F, Hernández-Pérez F, Almenar-Bonet L, *et al.*; Spanish Heart Transplant Teams. Spanish heart transplant registry. 34th official report of the Heart Failure Association of the Spanish Society of Cardiology. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2023 Nov;76(11):901-909. English, Spanish.
22. Almenar L y grupos Españoles de Trasplante Cardíaco. Registro Español de Trasplante Cardíaco. XIX Informe Oficial de la Sección de Insuficiencia Cardíaca, Trasplante Cardíaco y Otras Alternativas Terapéuticas de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2007). *Rev Esp Cardiol.* 2008; 61:1178-90.
23. Organización Nacional de Trasplantes (ONT). Trasplante cardíaco. Criterios de distribución 2023. Available from: <https://www.ont.es/wp-content/uploads/2023/06/Criterios-Distribucion-Corazon-2023.pdf>. Accessed 8 May 2023.
24. Gil-Jaurena JM, Camino M, Calle C, *et al* Trasplante cardíaco con incompatibilidad de grupo. *Cir Cardio.* 2022;29:307–311.
25. Al-Adhami A, Avtaar Singh SS, De SD, *et al.* Primary graft dysfunction after heart transplantation - unravelling the enigma. *Curr Probl Cardiol.* 2021;100941
26. Dengler TJ, Pober JS. Cellular and molecular biology of cardiac transplant rejection. *J Nucl Cardiol.* 2000 Nov-Dec;7(6):669-85
27. Davis MK, Hunt SA. State of the art: cardiac transplantation. *Trends Cardiovasc Med.* 2014 Nov;24(8):341-9.

28. Ventura HO, Muhammed K. Historical perspectives on cardiac transplantation: the past as prologue to challenges for the 21st century. *Curr Opin Cardiol*. 2001 Mar;16(2):118-23.
29. Lund LH, Khush KK, Cherikh WS, *et al*. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report—2017; Focus Theme: allograft ischemic time. *J Hear Lung Transplant*. 2017;36(10):1037-1046
30. Julius BK, Attenhofer Jost CH, Sutsch G, *et al*. Incidence, progression and functional significance of cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *Transplantation* 2000;69:847–53.
31. Raichlin E, Edwards BS, Kremers WK, *et al*. Acute cellular rejection and the subsequent development of allograft vasculopathy after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Apr;28(4):320-7
32. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, *et al*. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *CircRes* 2006;99: 801–15.
33. Colvin-Adams M, Agnihotri A. Cardiac allograft vasculopathy: current knowledge and future direction. *ClinTransplant* 2011;25:175–84.
34. Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, *et al*. Frequency and characteristics of coronary thrombosis in the epicardial coronary arteries after cardiac transplantation. *Am J Cardiol* 1996; 78:795
35. Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Ruf A, *et al*. Changes in surface expression of platelet membrane glycoproteins and progression of heart transplant vasculopathy. *Circulation* 2000; 102:890.
36. Torres HJ, Merello L, Ramos SA, *et al*. Prevalence of cardiac allograft vasculopathy assessed with coronaryangiography versus coronary vascular ultrasound and virtual histology. *Transplant Proc*2011;43:2318–21.

37. Kobashigawa JA, Miller LW, Russell SD, *et al.* Tacrolimus with mycophenolate mofetil (MMF) or sirolimus vs. cyclosporine with MMF in cardiac transplant patients: 1-year report. *Am J Transplant.* 2006 Jun;6(6):1377-86.
38. Baran DA, Taylor DO, Kobashigawa JA. Immunosuppression and heart transplantation: how do we define success? *Am J Transplant* 2010; 10: 205.
39. Gradek WQ, D'Amico C, Smith AL, *et al.* Routine surveillance endomyocardial biopsy continues to detect significant rejection late after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20:497
40. Stehlik J, Starling RC, Movsesian MA, *et al.* Utility of long-term surveillance endomyocardial biopsy: a multi-institutional analysis. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25:1402
41. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, *et al.* Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24:1710
42. Kobashigawa J, Crespo-Leiro MG, Ensminger SM, *et al.* Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30:252.
43. Yilmaz A, Kindermann I, Kindermann M, *et al.* Comparative evaluation of left and right ventricular endomyocardial biopsy: differences in complication rate and diagnostic performance. *Circulation* 2010; 122:900
44. Alharethi R, Bader F, Kfoury AG, *et al.* Tricuspid valve replacement after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25:48
45. Bennett MK, Gilotra NA, Harrington C, *et al.* Evaluation of the role of endomyocardial biopsy in 851 patients with unexplained heart failure from 2000–2009. *Circ Heart Fail.* 2013;6:676–84.

46. Crespo-Leiro MG, Zuckermann A, Bara C, *et al.* Concordance among pathologists in the second Cardiac Allograft Rejection Gene Expression Observational Study (CARGO II). *Transplantation* 2012;94:1172-7.
47. Crespo-Leiro MG, Barge-Caballero G, Couto-Mallon D. Noninvasive monitoring of acute and chronic rejection in heart transplantation. *Curr Opin Cardiol.* 2017 May;32(3):308-315
48. Fitzsimons SJ, Evans JDW, Rassl DM, *et al.* High-sensitivity Cardiac Troponin Is Not Associated With Acute Cellular Rejection After Heart Transplantation. *Transplantation.* 2022 May 1;106(5):1024-1030.
49. Ahn KT, Choi JO, Lee GY, *et al.* Usefulness of high-sensitivity troponin I for the monitoring of subclinical acute cellular rejection after cardiac transplantation. *Transplant Proc.* 2015 Mar;47(2):504-10.
50. Badano LP, Miglioranza MH, Edvardsen T, *et al.* European Association of Cardiovascular Imaging/Cardiovascular Imaging Department of the Brazilian Society of Cardiology recommendations for the use of cardiac imaging to assess and follow patients after heart transplantation. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2015; 16:919–948.
51. Almenar L, Osa A, Martinez-Dolz L, *et al.* Echocardiographic evaluation of the evolutionary changes after heart transplantation. *Transplant Proc* 2006;38:2575–6.
52. Goirigolzarri Artaza J, Mingo Santos S, Larrañaga JM, *et al.* Validation of the usefulness of 2-dimensional strain parameters to exclude acute rejection after heart transplantation: a multicenter study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2021 Apr;74(4):337-344.
53. Marie PY, Angioi M, Carteaux JP, *et al.* Detection and prediction of acute heart transplant rejection with the myocardial T2 determination provided by a black-blood magnetic resonance imaging sequence. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:825–31.

54. Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, *et al.* The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29:914–956.
55. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, *et al.* Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant* 2006; 6:150–160.
56. Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG, *et al.* Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 2010; 362:1890–1900.
57. Kobashigawa J, Patel J, Azarbal B, *et al.* Randomized pilot trial of gene expression profiling versus heart biopsy in the first year after heart transplant: early invasive monitoring attenuation through gene expression trial. *Circ Heart Fail* 2015; 8:557–564
58. Crespo-Leiro MG, Stypmann J, Schulz U, *et al.* Clinical usefulness of gene expression profile to rule out acute rejection after heart transplantation: CARGO II. *Eur Heart J* 2016; 37:2591–2601.
59. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, *et al.* Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med* 2015; 372:1589
60. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, *et al.* Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10:472.
61. Snyder TM, Khush KK, Valentine HA, *et al.* Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Apr 12;108(15):6229-34.
62. Beck J, Bierau S, Balzer S, *et al.* Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury. *Clin Chem.* 2013 Dec;59(12):1732-41

63. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, *et al.* Circulating Donor-Derived Cell-Free DNA in Blood for Diagnosing Active Rejection in Kidney Transplant Recipients (DART) Study Investigators. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Jul;28(7):2221-2232.
64. Schütz E, Fischer A, Beck J, *et al.* Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: A prospective, observational, multicenter cohort study. *PLoS Med.* 2017 Apr 25;14(4):e1002286.
65. Grskovic M, Hiller DJ, Eubank LA, *et al.* Validation of a Clinical-Grade Assay to Measure Donor-Derived Cell-Free DNA in Solid Organ Transplant Recipients. *J Mol Diagn.* 2016 Nov;18(6):890-902
66. De Vlaminck I, Valantine HA, Snyder TM, *et al.* Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. *Sci Transl Med* 2014;6:241ra77.
67. Khush KK, Patel J, Pinney S, *et al.* Noninvasive detection of graft injury after heart transplant using donor-derived cell-free DNA: A prospective multicenter study. *Am J Transplant.* 2019 Oct;19(10):2889-2899.
68. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Jan;20(1):21-37.
69. Chen X, Liang H, Zhang J, *et al.* Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* 2012 Mar;22(3):125-32.
70. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *J Cell Physiol* 2016;231:25-30.
71. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 29;105(30):10513-8.

72. Cho JA, Park H, Lim EH, Lee KW. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol.* 2012 Jan;40(1):130-8.
73. Dieckmann KP, Radtke A, Spiekermann M, *et al.* Serum Levels of MicroRNA miR-371a-3p: A Sensitive and Specific New Biomarker for Germ Cell Tumours. *Eur Urol.* 2017 Feb;71(2):213-220.
74. Blanco-Domínguez R, Sánchez-Díaz R, de la Fuente H, *et al.* A Novel Circulating MicroRNA for the Detection of Acute Myocarditis. *N Engl J Med.* 2021 May 27;384(21):2014-2027.
75. Sukma Dewi I, Torngren K, Gidlof O, *et al.* Altered serum miRNA profiles during acute rejection after heart transplantation: potential for non-invasive allograft surveillance. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:463-6.
76. Sukma Dewi I, Celik S, Karlsson A, *et al.* Exosomal miR-142-3p is increased during cardiac allograft rejection and augments vascular permeability through down-regulation of endothelial RAB11FIP2 expression. *Cardiovasc Res* 2017;113:440-52.
77. Sukma Dewi I, Hollander Z, Lam KK, *et al.* Association of serum miR-142-3p and miR-101-3p levels with acute cellular rejection after heart transplantation. *PLoS One* 2017;12: e0170842.
78. Duong Van Huyen JP, Tible M, Gay A, *et al.* MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection. *Eur Heart J* 2014; 35:3194-202.
79. Guo S, Guo X, Wang S, *et al.* Role of miR-29 as marker of risk of acute rejection after heart transplant. *Br J Biomed Sci* 2017;74:187-92.
80. Pérez-Carrillo L, Sánchez-Lázaro I, Triviño JC, *et al.* Diagnostic value of serum miR-144-3p for the detection of acute cellular rejection in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant.* 2022 Feb;41(2):137-147.

81. Van Aelst LNL, Summer G, Li S, *et al.* RNA profiling in human and murine transplanted hearts: identification and validation of therapeutic targets for acute cardiac and renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2016;16:99-110.
82. Di Francesco A, Fedrigo M, Santovito D, *et al.* MicroRNA signatures in cardiac biopsies and detection of allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2018;37:1329-40.
83. Leidner RS, Li L, Thompson CL. Dampening enthusiasm for circulating microRNA in breast cancer. *PLoS One* 2013;8:e57841.
84. de Ronde MWJ, Ruijter JM, Moerland PD, *et al.* Study design and qPCR data analysis guidelines for reliable circulating miRNA biomarker experiments: a review. *Clin Chem* 2018;64:1308-18.
85. Marzi MJ, Montani F, Carletti RM, *et al.* Optimization and Standardization of Circulating MicroRNA Detection for Clinical Application: The miR-Test Case. *Clin Chem*. 2016 May;62(5):743-54.
86. Kitchen RR, Kubista M, Tichopad A. Statistical aspects of quantitative real-time PCR experiment design. *Methods* 2010;50:231-6.
87. Kok MGM, de Ronde MWJ, Moerland PD, *et al.* Small sample sizes in high-throughput miRNA screens: A common pitfall for the identification of miRNA biomarkers. *Biomol Detect Quantif*. 2017 Dec 18;15:1-5.
88. Constanso-Conde I, Hermida-Prieto M, Barge-Caballero E, Núñez L, Pombo-Otero J, Suárez-Fuentetaja N, Paniagua-Martín MJ, Barge-Caballero G, Couto-Mallón D, Pan-Lizcano R, Vázquez-Rodríguez JM, Crespo-Leiro MG. Circulating miR-181a-5p as a new biomarker for acute cellular rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2020 Oct;39(10):1100-1108.
89. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303:83-6.

90. Li QJ, Chau J, Ebert PJR, *et al.* miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 2007;129:147-61.
91. Lwin T, Lin J, Choi YS, *et al.* Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood* 2010;116:5228-36.
92. Vitalone MJ, Sigdel TK, Salomonis N, *et al.* Transcriptional perturbations in graft rejection. *Transplantation* 2015;99:1882-93.
93. Evans RW, Williams GE, Baronc HM, *et al.* The economic implications of noninvasive molecular testing for cardiac allograft rejection. *Am J Transplantation*. 2005;5:1553–1558.



## ANEXO I: publicación en revista científica

Resultados parciales de la investigación que nuclea en esta Tesis Doctoral han dado lugar a un artículo científico publicado en Octubre de 2020 en la revista ***Journal of Heart and Lung Transplantation***. Se trata de una publicación indexada, que sigue proceso de revisión por pares y cuyo factor de impacto Journal Citation Report (JCR) correspondiente al año 2022 es de 8.9. El artículo, cuya referencia se muestra a continuación:

**Constanso-Conde I**, Hermida-Prieto M, Barge-Caballero E, Núñez L, Pombo-Otero J, Suárez-Fuentetaja N, Paniagua-Martín MJ, Barge-Caballero G, Couto-Mallón D, Pan-Lizcano R, Vázquez-Rodríguez JM, Crespo-Leiro MG. Circulating miR-181a-5p as a new biomarker for acute cellular rejection in heart transplantation. J Heart Lung Transplant. 2020 Oct;39(10):1100-1108. doi: 10.1016/j.healun.2020.05.018. Epub 2020 Jun 7. PMID: 32654912.



## ORIGINAL CLINICAL SCIENCE Circulating miR-181a-5p as a new biomarker for acute cellular rejection in heart transplantation

Ignacio Constanso-Conde, BSc,<sup>a,1</sup> Manuel Hermida-Prieto, BSc, PhD,<sup>a,1</sup>  
Eduardo Barge-Caballero, MD, PhD,<sup>b</sup> Lucía Núñez, BPharm, PhD,<sup>a</sup>  
Jorge Pombo-Otero, MD,<sup>c</sup> Natalia Suárez-Fuentetaja, BSc, PhD,<sup>a</sup>  
María Jesús Paniagua-Martín, MD,<sup>b</sup> Gonzalo Barge-Caballero, MD,<sup>b</sup>  
David Couto-Mallón, MD,<sup>b</sup> Ricardo Pan-Lizcano, BSc,<sup>a</sup>  
José Manuel Vázquez-Rodríguez, MD, PhD,<sup>b</sup> and  
María Generosa Crespo-Leiro, MD, PhD<sup>b</sup>

From the <sup>a</sup>Grupo de investigación en Cardiología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, Universidade da Coruña (UDC), Spain.; <sup>b</sup>Servicio de Cardiología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), CIBERCV, SERGAS, Universidade da Coruña (UDC), Spain; and the <sup>c</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) SERGAS, A Coruña, Spain.

### KEYWORDS:

heart transplantation;  
acute rejection;  
microRNA;  
miR-181a-5p;  
biomarker

**BACKGROUND:** Acute cellular rejection (ACR) is a major complication in heart transplantation (HTx). Endomyocardial biopsy is the reference method for early detection of ACR, but a new non-invasive approach is needed. Tentative candidates could be circulating microRNAs. This study aimed to discover and validate microRNAs in serum for ACR detection after HTx.

**METHODS:** This prospective, observational, single-center study included 121 HTx patients. ACR was graded according to International Society of Heart and Lung Transplantation classification (0R–3R). First, in the discovery phase, microRNA expression profile was carried out in serum samples from patients at pre-rejection, during, and post-rejection time (0R<sub>S1</sub> → 2R<sub>S2</sub> → 0R<sub>S3</sub>). Relative expression (2<sup>-ΔCq</sup>) of 179 microRNAs per sample was analyzed by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. Second, a microRNA with a significant rise and fall pattern during ACR was selected for the next validation phase, where it was analyzed (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) in serum samples from 2 groups of patients: the no-ACR group (0R grade) and the ACR group (≥2R grade). Finally, a sensitivity analysis (receiver operating characteristic curve) was done to assess microRNA accuracy for ACR detection in HTx.

**RESULTS:** A total of 21 ACR episodes (0R<sub>S1</sub> → 2R<sub>S2</sub> → 0R<sub>S3</sub>) with their respective serum samples (n=63) were included in the discovery phase. Among the 179 microRNAs analyzed, only miR-181a-5p met the rise and fall criteria. In the validation phase, miR-181a-5p relative expression (2<sup>-ΔCq</sup>) in the ACR group (n=45) was significantly overexpressed (p < 0.0001) vs the no-ACR group (n=45). miR-181a-5p showed an area under the curve of 0.804 (95% confidence interval: 0.707-0.880); sensitivity and specificity of 78% and 76%, respectively; and a negative predicted value of 98%.

<sup>1</sup>These authors have contributed equally to this work.

Reprint requests: Lucía Núñez, BPharm, PhD, Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad de A Coruña, CHUAC-Universidad de A Coruña, As Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain. Telephone: 981-

17-81-50. Fax: 981-17-63-98.

E-mail address: [lucia.nunez@udc.es](mailto:lucia.nunez@udc.es)

**CONCLUSIONS:** miR-181a-5p in serum is a candidate as a non-invasive ACR biomarker (area under the curve = 0.80 and negative predicted value = 98%). Thus, this biomarker could reduce the need for endomyocardial biopsies and the associated risks and costs of this invasive procedure.

J Heart Lung Transplant 2020;39:1100–1108

© 2020 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.

Heart transplantation (HTx) is the preferred option for patients with end-stage heart failure who are eligible. However, patients are at risk for developing several complications during the post-transplant period.<sup>1</sup> One of the most frequent complications is acute cellular rejection (ACR),<sup>1</sup> an alloimmune response where T-cell activation plays a central role. In fact, up to 25% of patients will present any grade of ACR during the first year after transplantation, and a significant minority of these patients will require treatment.<sup>1</sup> The gold standard method to detect ACR has been the endomyocardial biopsy (EMB), which is an invasive and uncomfortable procedure for the patients with the potential risk of serious complications.<sup>2</sup> Moreover, the possibility of sampling error with false negative results, as well as a pathological grading system with substantial observer dependency,<sup>3</sup> make EMB a technique with important limitations.

Non-invasive methods<sup>4</sup> (e.g., echocardiography, cardiac magnetic resonance imaging, and nuclear imaging) and the newest molecular techniques (e.g., gene expression<sup>5,6</sup> and donor-derived cell-free DNA<sup>7</sup>) are being investigated to improve the diagnostic of ACR. In the last years, microRNAs have emerged as a potential biomarker.<sup>8,9</sup>

MicroRNAs are small 21–25 single-stranded RNAs that regulate gene expression by binding to a complementary nucleotide sequence in messenger RNA.<sup>10</sup> MicroRNAs possess many natural characteristics that make them excellent

potential clinical biomarkers, as they are present in circulation and they are remarkably stable.<sup>8</sup> Unique microRNA fingerprints that identify disease states ranging from cardiovascular disease to diabetes and cancer have been identified.<sup>9,11</sup> In the field of HTx, at least 7 studies were performed trying to elucidate the possible role of microRNAs as ACR biomarkers (Table 1).<sup>12–18</sup> Five studies analyzed the presence of circulating microRNAs,<sup>12,13,15–17</sup> whereas the other 2 focus on the expression of microRNAs in EMB.<sup>14,18</sup> However, the low replicability observed between these studies, with 12 different microRNAs reported as potential ACR biomarkers (Table 1), has been the main reason why many promising microRNA biomarkers have never reached the clinical setting.<sup>19</sup> A possible explanation for the poor reproducibility in these studies could be the microRNA biological variation, the different microRNA profiles studied, and a deficient analytic standardization.<sup>20</sup> Thus, in recent years, numerous recommendations have been emerging to standardize the entire microRNA analytic process.<sup>20</sup> Moreover, the biological variation could be minimized with an appropriate study design.<sup>21</sup> These last considerations were carefully taken into account in this study that aimed to evaluate the potential of circulating microRNAs as biomarkers of ACR detection in HTx.

## Methods

### Study design

This prospective, observational, single-center study included patients who underwent HTx between April 2013 and August 2018 in the Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (A Coruña, Spain). The EMB protocol to monitor rejection was every 10 to 15 days in the first 2 months, every 20 days in Months 3 and 4, and monthly in Months 5 and 6. After the sixth month, in stable patients and without any episode of treated rejection, the next EMB was at 12 months; in those patients who had an episode of rejection treated or needed to reduce immunosuppression because of complications, EMBs were performed every 2 months up to 12 months. On the same day, before the EMB procedure, blood samples were drawn to monitor laboratory parameters according to the standard clinical practice of the HTx program, and the remaining serum volume was aliquoted and sent to the research laboratory. EMBs were graded according to the International Society of Heart and Lung Transplantation 2005 criteria for ACR: no rejection, 0R; mild rejection, 1R; moderate rejection, 2R; and severe rejection, 3R.<sup>22</sup> In this study, rejection was considered when EMB grade was  $\geq 2R$  (because in asymptomatic patients without graft dysfunction, it is usually the threshold for rejection treatment) and no rejection when EMB grade was 0R. The study was approved by the local Ethics Committee (Comité ético de investigación de Galicia, reference: 2015/311). The standard immunosuppression protocol was triple therapy with tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone. Patients received induction therapy mostly with basiliximab and, in certain cases such as sensitized patients, thymoglobulin. Treatment of rejection episodes was with intravenous steroid bolus, 250 mg to 1,000 mg depending on severity, for 3 days. Written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki.

The study was performed in 2 phases. First, in the discovery phase, a microRNA expression profile was carried out to identify and select circulating microRNAs differentially expressed during ACR. Then, a microRNA with a significant rise and fall pattern during ACR was included in the later validation phase to assess their diagnostic value to detect ACR in HTx patients.

The study was performed in 2 phases. First, in the discovery phase, a microRNA expression profile was carried out to identify and select circulating microRNAs differentially expressed during ACR. Then, a microRNA with a significant rise and fall pattern during ACR was included in the later validation phase to assess their diagnostic value to detect ACR in HTx patients.

### Discovery phase

In the discovery phase, the patients included were those in whom a Grade  $\geq 2R$  EMB and a previous and a subsequent Grade 0R EMB (not necessarily the one that preceded or followed the Grade  $\geq 2R$  EMB, but the nearest ones) were reported. Serum samples matched in time with those EMBs were selected and called 0R<sub>S1</sub> (pre-rejection), 2R<sub>S2</sub> (rejection), and 0R<sub>S3</sub> (post-rejection). The entire episode, named as 0R<sub>S1</sub>  $\rightarrow$  2R<sub>S2</sub>  $\rightarrow$  0R<sub>S3</sub>, and their 3 serum samples were always processed in the same run to minimize analytic variability.

RNA was isolated from 200  $\mu$ l of serum using miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA was eluted in 21  $\mu$ l of RNase-free water, and complementary DNA synthesis was performed following miRCURY LNA

**Table 1** MicroRNA Studies Associated with Cellular Rejection in Serum and/or Blood from Heart Transplantation Patients

Article	Discovery phase				Validation phase				
	Sample type	Case vs control	N° of miRNAs	Normalized method	miRNAs differentially expressed ( $p < 0.05$ )	Case vs control	Normalized method	miRNAs differentially expressed ( $p < 0.05$ )	AUC
Present study	Serum	21 (BACR, DACR, AACR)	179	Global Mean	miR-181a-5p	45 ACR vs 45	Reference Gene (miR-23b-3p + miR-30c-5p Geometric mean)	miR-181a-5p	0.80
Sukma Dewi et al. <sup>12,17</sup>	Serum	10 (BACR, DACR, AACR)	175	Global Mean	miR-27a-3p miR-101-3p miR-142-3p miR-144-3p miR-326 miR-339-3p miR-424-5p	?	Reference Gene (miR-451)	miR-142-3p miR-326	0.80 0.86
Duong Van Huyen et al. <sup>13</sup>	Serum	In this study, the previous discovery phase was used (Sukma Dewi et al., 2013)				26 ACR vs 37 NR	Spike-in (UmiSp6)	miR-27a-3p miR-101-3p miR-142-3p miR-144-3p miR-326 miR-339-3p miR-424-5p	0.72 0.75 0.78 0.70 0.69 0.71 0.73
Sukma Dewi et al. <sup>16</sup>	Exosomal from serum	30 (11 DACR + 19 AMR) vs 30 NR	miR-10a miR-21 miR-31 miR-92a miR-142-3p miR-155 miR-451	Reference Gene (RNU48)	miR-10a miR-31 miR-92a miR-155	31 (14 ACR + 17 AMR) vs 22 NR	Reference Gene (RNU48)	miR-10a miR-31 miR-92a miR-155	0.98 0.87 0.96 0.97
Guo et al. <sup>15</sup>	Blood	5 ACR vs 5 NR	175	Reference Gene (miR-451)	miR-92a-3p miR-142-3p miR-339-3p	No discovery phase was performed, miR-29 was chosen according bibliography	Reference Gene (RNU6)	miR-29	0.79

AACR, after acute cellular rejection; ACR, acute cellular rejection; AMR, antibody-mediated rejection; AUC, area under the curve; BACR, before acute cellular rejection; DACR, during acute cellular rejection; NR, no rejection.

RT Kit (Qiagen) instructions. A total of 179 microRNAs per serum sample (Supplementary Table S1, available online at [www.jhltonline.org](http://www.jhltonline.org)) were analyzed with the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) kit miRCURY LNA miRNA Serum/Plasma Focus PCR Panel Kit (Qiagen) in a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Basel, Switzerland). Roche LC software was used for acquiring the quantification cycle (Cq) by the second derivative method. Detailed steps to perform RNA isolation, reverse transcription (RT), and qPCR are described in the Supplementary Material (available online).

A cut-off for unspecific amplification was set at Cq = 37. In the case of undetectable microRNA, Cq was set to 37. Those microRNAs that were not detected in more than 80% of samples were excluded for further analysis to reduce statistical noise. The global mean method was used to normalize qPCR results expressed as relative expression ( $2^{-\Delta Cq}$ ). The fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) method was used to compare the relative expression between samples.

MicroRNAs were selected for the next validation phase if they fitted the following 3 conditions:

1. Significant difference in microRNA relative expression ( $2^{-\Delta Cq}$ ) between OR<sub>S1</sub> and 2R<sub>S2</sub>;
2. Significant difference in ( $2^{-\Delta Cq}$ ) between 2R<sub>S2</sub> and OR<sub>S3</sub>; and
3. A rise and fall pattern in ( $2^{-\Delta Cq}$ ).

### Validation phase

Serum samples matched in time with Grade  $\geq 2R$  biopsies and not used in the discovery phase were selected to form the ACR group. The same number of serum samples matched in time with OR grade biopsies and not used in the discovery phase were randomly selected to form the no-ACR group. All selected samples were processed in duplicate. RNA isolation, RT reaction, qPCR reaction, and data analysis were carried out as in the discovery phase. In this phase, the qPCR reactions were performed using individual primers and the miRCURY LNA miRNA PCR Assay Kit (cat: 339306, Qiagen). Cq geometric mean from previously selected reference genes, miR-23b-3p, and miR-30c-5p was used to normalize results as in the global mean method (more details in Supplementary Material online).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0 software. Continuous variables are presented as mean (95% CI) when

normally distributed and as median (interquartile range, <25–75>) when non-normally distributed. Categorical data are displayed as count and percentage (*n*, %). The normality distribution was tested by D'Agostino–Pearson and the Shapiro–Wilk test. Analysis of differences among 3 groups (discovery phase) was performed using one-way analysis of variance with matched data and post-hoc Tukey test (normally distributed) or Friedman's test with Dunn's correction (non-normally distributed). Unpaired Student's *t*-test (normally distributed) or Mann–Whitney U-test (non-normally distributed) was performed to compare the differences between 2 groups (validation phase). Relative microRNA expression levels ( $2^{-\Delta Cq}$ ) were log-transformed (base2) before they were analyzed statistically. Pearson's correlation was used to measure the strength of a linear association between 2 variables and was denoted by *r*. A receiver operating characteristic (ROC) curve was generated for selected microRNAs with MedCalc software. Areas under the curve (AUCs) and their respective 95% CIs were calculated to evaluate the sensitivity and specificity for detecting ACR. Negative predicted value (NPV) and positive predicted value (PPV) were calculated for the cut-off with maximum AUC (Youden index) and the prevalence for ACR obtained (% EMB  $\geq 2R$ ). A two-sided *p*-value < 0.05 was considered statistically significant for all calculations.

## Results

### Study population

A total of 121 patients were included in the study and their primary heart diseases were dilated cardiomyopathy (*n* = 45; 37%), ischemic cardiomyopathy (*n* = 44; 36%), hypertrophic cardiomyopathy (*n* = 13; 11%), congenital cardiomyopathy (*n* = 6; 5%), valvular cardiomyopathy (*n* = 5; 4%), and others (*n* = 8; 7%). The median age of the recipients was 59 (interquartile range [IQR]: 49–65) years and 82% of them were males. After excluding 4 patients (perioperative death), a total of 1,113 EMBs were performed in the remaining 117 patients, with a median number of EMBs per patient of 9 (IQR: 8–11). The number of EMBs according to ACR International Society of Heart and Lung Transplantation 2005 classification grading criteria was OR = 565 (51%), 1R = 461 (41%), 2R = 75 (7%), 3R = 2 (0.2%), and not valid = 10 (0.9%). Biopsies where antibody-mediated rejection (AMR) were detected, either isolated AMR (*n* = 3, 0.3%) or

**Table 2** Patient Characteristics at Sampling in OR, 2R, and OR During the Discovery Phase

N = 21(OR <sub>S1</sub> → 2R <sub>S2</sub> → OR <sub>S3</sub> )	OR <sub>S1</sub>	2R <sub>S2</sub>	OR <sub>S3</sub>	<i>p</i> -value
Tacrolimus levels, ng/mL (95% CI)	11.2 (9.8–12.7)	9.4 (8.1–10.7)	9.3 (8.2–10.4)	all NS.
Serum creatinine, $\mu\text{mol/L}$ (IQR)	149 (130–170)	133 (120–146)	144 (124–164)	all NS.
Red blood cells, $\times 10^{12}/\text{L}$ (IQR)	3.46 (3.27–3.66)	3.57 (3.30–3.84)	3.81 (3.59–4.03)	OR <sub>S1</sub> vs OR <sub>S3</sub> < 0.005
Blood platelets, $\times 10^9/\text{L}$ (IQR)	176 (146–206)	166 (138–193)	173 (143–203)	all NS.
White blood cells, $\times 10^9/\text{L}$ (IQR)	7.35 (6.06–8.64)	6.19 (5.02–7.37)	7.05 (5.91–8.20)	all NS.
Blood lymphocytes, $\times 10^9/\text{L}$ (95% CI)	0.82 (0.60–1.05)	1.06 (0.84–1.29)	1.18 (0.98–1.37)	OR <sub>S1</sub> vs 2R <sub>S2</sub> < 0.05 OR <sub>S1</sub> vs OR <sub>S3</sub> < 0.05
Blood neutrophils, $\times 10^9/\text{L}$ (IQR)	5.99 (4.71–7.27)	4.48 (3.50–5.46)	5.17 (4.13–6.20)	all NS.
CMV viral load		Undetectable		—

CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; IQR, interquartile range; NS, not significant.

concomitant with ACR ( $n = 17$ , 1.5%), were excluded from the study.

### Discovery phase

Eleven patients with a  $0R_{S1} \rightarrow 2R_{S2} \rightarrow 0R_{S3}$  episode and 5 patients with  $2R_{S1} \rightarrow 2R_{S2} \rightarrow 0R_{S3}$  episodes were included. Thus, 21  $0R_{S1} \rightarrow 2R_{S2} \rightarrow 0R_{S3}$  episodes and their respective serum samples ( $n = 63$ ) were selected. Patient characteristics at sampling in  $0R_{S1}$ ,  $2R_{S2}$ , and  $0R_{S3}$  are detailed in Table 2. The time (days) elapsed from HTx to serum sample collection was 58 (IQR: 35-80) days for  $0R_{S1}$ , 102 (IQR: 79-125) days for  $2R_{S2}$ , and 178 (IQR: 139-216) days for  $0R_{S3}$ . It is important to note that the  $0R_{S3}$  corresponds to the first OR biopsy after the  $2R$  rejection. However, it does not have to be necessarily the following biopsy after the  $2R_{S2}$  because, in most of the patients, before the  $0R_{S3}$  biopsy, there were several  $2R$  or  $1R$  biopsies. The immunosuppression regimen was tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone in 93.8% of patients and cyclosporine, mycophenolate mofetil, and prednisone in 6.2%. Induction therapy with basiliximab was used in 93.8% of patients and with thymoglobulin in 6.2%. Rejection episodes were treated with a 3-day intravenous bolus of methylprednisolone, 250 mg/day (52.4%), 500 mg/day (38.1%), or 1 g/day (9.5%). The 3 groups were comparable regarding tacrolimus levels, serum creatine, blood platelets, white blood cells, and blood neutrophils. A slight difference, although significant, was detected for red blood cell count between samples  $0R_{S1}$  and  $0R_{S3}$  and for blood lymphocyte count between sample  $0R_{S1}$  and the other 2 samples. No patient had cytomegalovirus infection at the time of sampling (undetectable viral load).

The mean Cq of the 63 serum samples was 34.71 (95% confidence interval [CI]: 34.47-34.95) with no significant differences among the 3 groups ( $Cq_{0R_{S1}} = 34.65$  [95% CI: 34.20-35.10],  $Cq_{2R_{S2}} = 34.69$  [95% CI: 34.26-35.13], and  $Cq_{0R_{S3}} = 34.80$  [95% CI: 34.36-35.24]). Of the 179 microRNAs analyzed, 31 were not expressed ( $Cq \geq 37$ ) in more than 80% of the samples, so they were eliminated for further analysis (Supplementary Table S1 online). Of the remaining 148 microRNAs, only 10 of them were expressed in 100% of the samples: miR-16-5p, miR-23a-3p, miR-25-3p, miR-30d-5p, miR-92a-3p, miR-150-5p, miR-223-3p, miR-320a, miR-320b, and miR-486-5p. After data normalization, Supplementary Figure S1a online shows the 10 microRNAs with the highest relative expression ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ). MicroRNA fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) of the rejection group ( $2R_{S2}$ ) compared with the no rejection group ( $0R_{S1}$ ) showed 79 (53%) microRNAs underexpressed and 69 (47%) microRNAs overexpressed, with fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) values between -1.67 and 1.43 (Supplementary Figure S1b online).

Among the 148 microRNAs analyzed, 4 of them showed a significant difference in relative expression ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) between the  $0R_{S1}$  and  $2R_{S2}$  groups: miR-181a-5p, miR-339-3p, let-7f-5p, and miR-505-3p (Figure 1). However, only miR-181a-5p showed a significant difference in  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  between  $2R_{S2}$  and  $0R_{S3}$  and a rise and fall pattern.

To investigate whether the serum levels of miR-181a-5p could reflect blood lymphocyte count, a correlation was performed between both variables. There was no statistical correlation between miR-181a-5p and blood lymphocyte count. The Spearman's  $r = 0.170$  (95% CI: -0.096 to 0.412) demonstrated that miR-181a-5p expression is independent of blood lymphocyte count. Therefore, miR-181a-5p was chosen to be evaluated in the next validation phase.

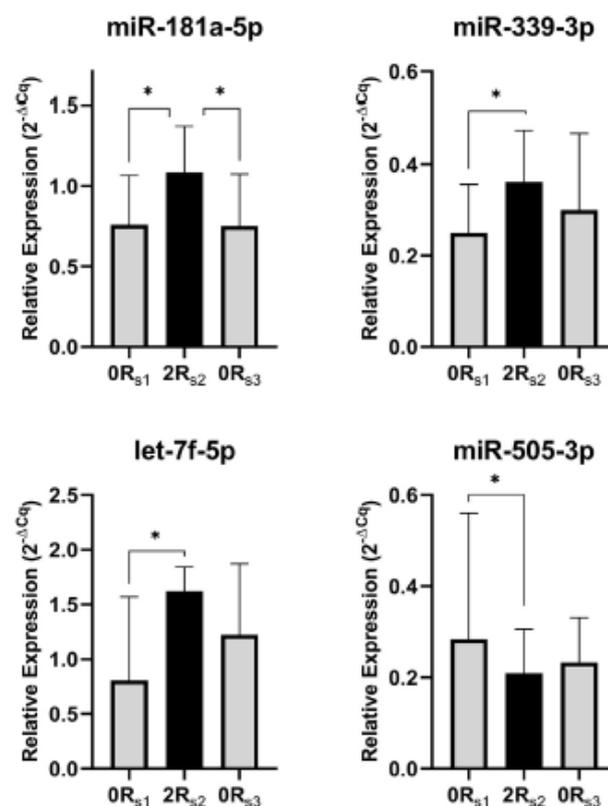
### Validation phase

For the ACR group, 45 serum samples were found, 44 EMB = 2R and 1 EMB = 3R. Therefore, the no-ACR group was completed with 45 random serum samples from patients with EMB = 0R. The time (days) elapsed from HTx to serum sample collection was 51 (IQR: 26-99) days for the ACR group and 100 (IQR: 44-170) days for the no-ACR group. Patients' characteristics are detailed in Table 3. The immunosuppression regimen was tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone in 93% of patients; cyclosporine, azathioprine, and prednisone in 4.7%; and cyclosporine, mycophenolate mofetil, and prednisone in 2.3%. Induction therapy with basiliximab was used in 93.5% of patients and with thymoglobulin in 6.5%. Rejection episodes were treated with a 3-day intravenous bolus of methylprednisolone: 250 mg/day (51.5%), 500 mg/day (36.4%), or 1 g/day (6.1%). There were no significant differences between both groups. miR-181a-5p was significantly overexpressed ( $p < 0.0001$ ) in the ACR group compared with the no-ACR group. Median miR-181a-5p expression levels were 0.465 (IQR: 0.338-0.541), and 0.254 (IQR: 0.155-0.341) in the ACR and no-ACR groups, respectively (Figure 2). Sensitivity analysis (ROC curve) showed that for a miR-181a-5p cut-off of ( $2^{-\Delta\Delta Cq} > 0.33$ ), an AUC of 0.804 (95% CI: 0.707-0.880) was obtained ( $p < 0.0001$ ) (Figure 2, Supplementary Table S2 online). The sensitivity and the specificity for this cut-off were 78% and 76%, respectively. For the prevalence obtained of 7% in this study (EMB  $\geq$  2R), NPV and PPV were 98% and 20%, respectively.

### Discussion

MicroRNAs have been postulated as new potential non-invasive biomarker candidates for heart transplant rejection.<sup>12-18</sup> In this study, after evaluating 179 serum microRNAs in the initial discovery phase, the circulating miR-181a-5p showed a rise and fall pattern that make it a potential non-invasive biomarker to detect ACR in HTx. These results were confirmed in the discovery phase using a new cohort of patients with ACR and where miR-181a-5p was found to be overexpressed compared with those with no rejection. Thus, as a non-invasive biomarker for ACR detection in HTx, miR-181a-5p showed promising results, with an AUC of 0.804 (95% CI: 0.707-0.880) and a sensitivity and specificity of 78% and 76%, respectively.

To our knowledge, 12 microRNAs has been previously described<sup>12,13,15-17</sup> associated with cardiac graft rejection (Table 1). In this study, we tested 10 of these microRNAs



	Relative Expression $2^{-\Delta Cq}$			Adjusted p-value (ANOVA)		
	0R <sub>s1</sub>	2R <sub>s2</sub>	0R <sub>s3</sub>	0R <sub>s1</sub> vs 2R <sub>s2</sub>	2R <sub>s2</sub> vs 0R <sub>s3</sub>	0R <sub>s1</sub> vs 0R <sub>s3</sub>
miR-181-5p	0.759 (0.427-1.064)	1.085 (0.701-1.371)	0.752 (0.597-1.073)	0.0194	0.0225	NS
miR-339-3p	0.251 (0.147-0.356)	0.362 (0.249-0.474)	0.300 (0.209-0.468)	0.0442	NS	NS
let-7f-5p	0.807 (0.683-1.568)	1.620 (1.108-1.842)	1.224 (0.952-1.871)	0.0445	NS	NS
miR-505-3p	0.284 (0.176-0.560)	0.209 (0.125-0.306)	0.233 (0.124-0.331)	0.0284	NS	NS

**Figure 1** Significant differentially expressed microRNAs during ACR episode. Data are presented as median relative expression ( $2^{-\Delta Cq}$ ) (bars) and interquartile range (whiskers). All adjusted *p*-values were obtained by one-way ANOVA and post-hoc Tukey test. NS if  $p \geq 0.05$ ,  $\times$  if  $p < 0.05$ , and  $**$  if  $p < 0.005$ . ACR, acute cellular rejection; ANOVA, analysis of variance; NS, not significant.

(miR-101-3p, miR-142-3p, miR-144-3p, miR-326, miR-339-3p, miR-424-5p, miR-92a, miR-155, miR-29, and miR-27-3p) and none of them presented a rise and fall pattern expression during the rejection event in the cohort studied. The other 2 microRNAs previously described, miR-10a and miR-31, only were associated with ACR in 1 out of the 5 studies previously published.<sup>13</sup> This lack of reproducibility between the studies could be in part explained by the different designs, the poor standardization, and the use of several normalization methods of the data. In this study, the latest recommendations to standardize the experiments

were followed.<sup>20</sup> First, the longitudinal design of the experiment in the discovery phase, where the same patient is studied before, during, and after the ACR episode, together with an adequate sample size, gave the study a reliable statistical power. Second, in microRNA expression profile experiments, provided the normalization method is correct, there should be as many overexpressed as underexpressed microRNAs. In the discovery phase of this study, after global mean normalization, microRNAs under- and overexpressed were fairly similar, 50% each (Supplementary Figure S1b online). Finally, in the validation phase, the

**Table 3** Validation Phase Patients' Baseline Characteristics

Patient characteristics	No-R n = 45	ACR n = 45	p-value
Males	36 (80%)	36 (80%)	—
Age at HTx	60 (44-65)	55 (49-63)	NS.
Tacrolimus levels, ng/mL (95% CI)	11.1 (9.9-12.2)	10.6 (9.4-11.7)	NS.
Serum creatinine, $\mu\text{mol/L}$ (IQR)	110 (88-133)	98 (77-133)	NS.
Red blood cells, $\times 10^{12}/\text{L}$ (IQR)	3.71 (3.52-3.89)	3.60 (3.48-3.73)	NS.
Blood plate- lets, $\times 10^9/\text{L}$ (IQR)	223 (199-247)	216 (183-249)	NS.
White blood cells, $\times 10^9/\text{L}$ (IQR)	6.19 (5.35-7.92)	6.68 (4.58-9.17)	NS.
Blood lympho- cytes, $\times 10^9/\text{L}$ (95% CI)	1.14 (0.96-1.31)	1.20 (1.03-1.37)	NS.
Blood neutro- phils, $\times 10^9/\text{L}$ (IQR)	4.52 (3.43-5.93)	4.69 (3.06-7.17)	NS.

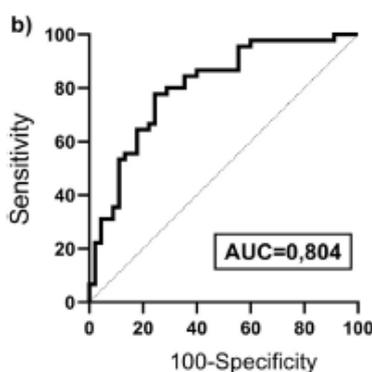
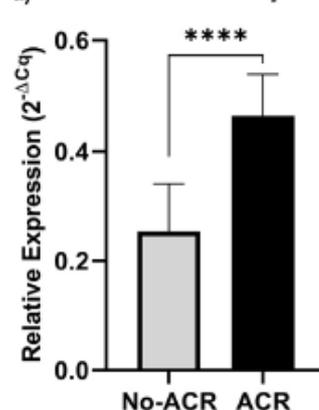
ACR, acute cellular rejection; CI, confidence interval; HTx, heart transplantation; IQR, interquartile range; No-R, no rejection; NS, not significant.

normalization of RT-qPCR data was performed first, using 2 endogenous reference genes (miR-23b-3p and miR-30c-5p) and the geometric mean method.

Sukna Dewi et al.<sup>12</sup> is the only study where samples before, during, and after cellular rejection were used. Significantly increased levels of miR-326 and miR-142-3p during ACR and an AUC of 0.86 and 0.80, respectively, were described.<sup>12</sup> This was a small pilot study with only 10 patients included, and later the same authors increased the cohort (ACR = 26).<sup>17</sup> However, the most promising microRNA in the previous study,<sup>12</sup> miR-326, in the new approach presented a lower AUC, 0.69 versus 0.86. On the other hand, in the study of Duong van Huyen et al.,<sup>13</sup> 4 microRNAs (miR-10a, miR-31, miR-92a, and miR-155) differentially expressed in rejection patients with almost perfect ROC curves (AUC  $\approx$  1) were identified. However, the

cohort studied was formed by 14 ACR and 17 AMR patients, and thus the results obtained were not exclusively of cellular rejection after HTx. Thus, although the number of microRNA studies for the detection of ACR is small, all these results suggest that microRNAs could be candidates as biomarkers.

Currently, there is only 1 non-invasive test approved by FDA for monitoring ACR, Allomap (CareDx),<sup>6,23,24</sup> Allomap, a gene expression profiling test in blood leukocytes, showed an AUC of 0.70, lower than the AUC here obtained for miR-181a-5p (Table 4). Because the estimation of NPVs and PPVs varies based on the disease prevalence of the screened population, an estimated prevalence of 5% was established to compare results (Table 4). Our results

**a) miR-181a-5p**

**Figure 2** miR-181a-5p expression in validation phase (a) miR-181a-5p relative expression ( $2^{-\Delta C_t}$ ) in no-ACR and ACR groups presented as median (bars) and interquartile range (whiskers); \*\*\*\* if  $p < 0.0001$ . (b) ROC curve for evaluation of serum miR-181a-5p as biomarker to detect ACR. ACR, acute cellular rejection; ROC, receiver operating characteristic.

showed that miR-181a-5p presented an NPV of 98.5%, whereas the NPV for Allomap was lower (NPV = 95.7%). Thus, the results here obtained for miR-181a-5p are similar to or even better than, in terms of AUC and NPV, those of Allomap and other biomarkers under investigation (T regu-

latory cells to endothelial progenitor cells, troponin I, and donor-derived cell-free DNA) (Table 4).<sup>7,25,26</sup> So, although our results were obtained analyzing 61 EMB blood samples from patients with Grade  $\geq 2R$  EMB from only 1 hospital and under ideal conditions (no EMB = IR were included), our data led us to hypothesize that miR-181a-5p may become a useful biomarker for monitoring ACR, using an inexpensive, robust, and feasible technology, which may lead to a reduction in the number of EMBs.

Moreover, it has been described that the miR-181 family regulates T- and B-cell development,<sup>27-30</sup> and this function could explain this important role in ACR. Li et al.<sup>28</sup> demonstrated that miR-181a modulates the sensitivity of T cells to foreign and endogenous antigens through T-cell receptor

**Table 4** Characteristics of Biomarkers for ACR Detection Post-HTx

Biomarker	Ref	Year	Norejection	Acuterejection	Months	AUC(95% CI)	S	SP	NPV <sup>a</sup>	PPV <sup>a</sup>
					post-HTx					
Allomap	Crespo-Leiro et al. <sup>3,6</sup>	2016	425	55 EMB ≥ 2R	2–6	0.70 (0.67–0.73)	25	89	95.7	10.4
Troponin I	Patel et al. <sup>26</sup>	2014	383	19 EMB ≥ 2R 8 AMR 5 Mixed 3 HC	>1	0.82 (0.76–0.88)	94	60	99.5	11
cfDNA	De Vlaminck et al. <sup>7</sup>	2014	185	24 EMB ≥ 2R or AMR	>1	0.83	58	93	97.7	30.4
Treg/EPC	Choi et al. <sup>25</sup>	2018	91	19 EMB ≥ 2R 8 HC	—	0.71 (0.59–0.84)	—	—	—	—
miR-181a-5p	This study	—	45	45 EMB ≥ 2R	1–6	0.80 (0.71–0.88)	78	76	98.5	14.6

ACR, acute cellular rejection; AMR, antibody-mediated rejection; AUC, area under the curve; cfDNA, cell-free donor-derived DNA; EMB, endomyocardial biopsy; HC, hemodynamic compromise; HTx, heart transplantation; NPV, negative predicted value; PPV, positive predicted value; S, sensitivity; SP, specificity; Treg/EPC, T regulatory cells to endothelial progenitor cells.

<sup>a</sup>NPV and PPV calculated for an arbitrary prevalence of 5% for acute rejection.

signaling. It was also demonstrated that miR-181a overexpression increases the number of B cells.<sup>27–29</sup> In HTx, during an ACR episode, T cells mediate an inflammatory response that leads to infiltration and lesion of the myocardium by mononuclear cells (activated macrophages, T cells, and B cells). The high grade of evidence that miR-181a is strongly involved in this alloimmune response makes our results very plausible from the biological point of view. This biological evidence supports the idea that miR-181a might be a promising biomarker not only for ACR detection but also for microRNA-based therapies and monitoring the immunosuppressive treatment.

### Limitations

Our study has several limitations and, although miR-181a-5p seems to be a promising ACR biomarker, it is a long pathway until it can reach its clinical application. First, because of the design of the study, the diagnostic accuracy of miR-181a-5p should be assessed in a larger multicenter prospective cohort with randomly selected patients. It would also be necessary to assess miR-181a-5p in patients with Grade 1R ACR to study if miR-181a-5p correlates with the severity of the rejection episode. Moreover, the effect of different treatments on the levels of miR-181a-5p post-rejection should also be analyzed. Finally, although we performed an ambitious study where 179 microRNAs were studied, other microRNAs not included may also have a role in ACR.

### Conclusions

miR-181a-5p in serum is a candidate as a non-invasive ACR biomarker with an AUC of 0.80 and an NPV of 98%. Thus, this biomarker could reduce the need for EMBs and the associated risks and costs of this invasive procedure.

### Disclosure statement

The authors have no conflicts of interest to disclose.

This study received financial support from Instituto de Salud Carlos III (PI15/02224), is part of the research activities of the Centro de investigación Biomédica en Red Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), and was cofinanced with FEDER Funds.

### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.05.018>.

### References

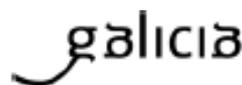
1. Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-sixth adult heart transplantation report - 2019; focus theme: donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant* 2019;38:1056-66.
2. Hamour IM, Burke MM, Bell AD, Panicker MG, Banerjee R, Banner NR. Limited utility of endomyocardial biopsy in the first year after heart transplantation. *Transplantation* 2008;85:969-74.
3. Crespo-Leiro MG, Zuckermann A, Bara C, et al. Concordance among pathologists in the second Cardiac Allograft Rejection Gene Expression Observational Study (CARGO II). *Transplantation* 2012;94:1172-7.
4. Miller CA, Fildes JE, Ray SG, et al. Non-invasive approaches for the diagnosis of acute cardiac allograft rejection. *Heart* 2013;99:445-53.
5. Kobashigawa J, Patel J, Azarbal B, et al. Randomized pilot trial of gene expression profiling versus heart biopsy in the first year after heart transplant: early invasive monitoring attenuation through gene expression trial. *Circ Heart Fail* 2015;8:557-64.
6. Crespo-Leiro MG, Stypmann J, Schulz U, et al. Clinical usefulness of gene-expression profile to rule out acute rejection after heart transplantation: CARGO II. *Eur Heart J* 2016;37:2591-601.
7. De Vlaminck I, Valantine HA, Snyder TM, et al. Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. *Sci Transl Med* 2014;6:241ra77.

8. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *J Cell Physiol* 2016;231:25-30.
9. Shah P, Bristow MR, Port JD. MicroRNAs in heart failure, cardiac transplantation, and myocardial recovery: biomarkers with therapeutic potential. *Curr Heart Fail Rep* 2017;14:454-64.
10. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 2012;13:358-69.
11. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18:997-1006.
12. Sukma Dewi I, Torngren K, Gidlöf O, Kornhall B, Ohman J. Altered serum miRNA profiles during acute rejection after heart transplantation: potential for non-invasive allograft surveillance. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:463-6.
13. Duong Van Huyen JP, Tible M, Gay A, et al. MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection. *Eur Heart J* 2014;35:3194-202.
14. Van Aelst LNL, Summer G, Li S, et al. RNA profiling in human and murine transplanted hearts: identification and validation of therapeutic targets for acute cardiac and renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2016;16:99-110.
15. Guo S, Guo X, Wang S, Nie Q, Ni G, Wang C. Role of miR-29 as marker of risk of acute rejection after heart transplant. *Br J Biomed Sci* 2017;74:187-92.
16. Sukma Dewi I, Celik S, Karlsson A, et al. Exosomal miR-142-3p is increased during cardiac allograft rejection and augments vascular permeability through down-regulation of endothelial RAB11FIP2 expression. *Cardiovasc Res* 2017;113:440-52.
17. Sukma Dewi I, Hollander Z, Lam KK, et al. Association of serum miR-142-3p and miR-101-3p levels with acute cellular rejection after heart transplantation. *PLoS One* 2017;12:e0170842.
18. Di Francesco A, Fedrigo M, Santovito D, et al. MicroRNA signatures in cardiac biopsies and detection of allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2018;37:1329-40.
19. Leidner RS, Li L, Thompson CL. Dampening enthusiasm for circulating microRNA in breast cancer. *PLoS One* 2013;8:e57841.
20. de Ronde MWJ, Ruijter JM, Moerland PD, Creemers EE, Pinto-Sietsma SJ. Study design and qPCR data analysis guidelines for reliable circulating miRNA biomarker experiments: a review. *Clin Chem* 2018;64:1308-18.
21. Kitchen RR, Kubista M, Tichopad A. Statistical aspects of quantitative real-time PCR experiment design. *Methods* 2010;50:231-6.
22. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1710-20.
23. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, et al. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant* 2006;6:150-60.
24. Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG, et al. Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 2010;362:1890-900.
25. Choi DH, Chmura SA, Ramachandran V, et al. The ratio of circulating regulatory cluster of differentiation 4 T cells to endothelial progenitor cells predicts clinically significant acute rejection after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2018;37:496-502.
26. Patel PC, Hill DA, Ayers CR, et al. High-sensitivity cardiac troponin I assay to screen for acute rejection in patients with heart transplant. *Circ Heart Fail* 2014;7:463-9.
27. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303:83-6.
28. Li QJ, Chau J, Ebert PJR, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 2007;129:147-61.
29. Lwin T, Lin J, Choi YS, et al. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood* 2010;116:5228-36.
30. Vitalone MJ, Sigdel TK, Salomonis N, Sarwal RD, Hsieh SC, Sarwal MM. Transcriptional perturbations in graft rejection. *Transplantation* 2015;99:1882-93.

## ANEXO II: dictamen favorable del comité de ética de A Coruña



Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel: 881 546425; celo@sergas.es



### DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE A CORUÑA-FERROL

Carlos Rodríguez Moreno, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol

#### CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 5/20/2015 el estudio:

**Título:** Estudio de micro-RNA y long-noncoding RNA como biomarcadores no invasivos de rechazo post-trasplante cardiaco  
**Promotor:** M.ª Generosa Crespo Leiro  
**Tipo de estudio:** Outros  
**Version:**  
**Código del Promotor:**  
**Código de Registro:** 2015/311

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y el la Circular nº 07 / 2004, investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

Centros	Investigadores Principales
C.H. Universitario de A Coruña	M.ª Generosa Crespo Leiro

En Santiago de Compostela, a  
El secretario

carlos.rodriguez.moreno@sergas.es  
65



## **ANEXO III: aplicación informática Simon**

La aplicación informática Simon (Sistema de Monitorización Inteligente) es un gestor de datos sanitarios desarrollado por el Servicio de Informática del CHUAC con fines asistenciales y de explotación de información clínica. Una variante de dicha aplicación se ha adaptado específicamente a las necesidades de seguimiento y monitorización de los receptores de TC.

La aplicación informática SiMon comparte información con aplicaciones de gestión de historia clínica de la Estructura de Xestión Integrada del Área Sanitaria de A Coruña y ha servido de base para la obtención de la mayoría de los datos analizados y presentados en la presente Tesis Doctoral.

A continuación se muestran, a modo de ejemplo, algunas de las pantallas de la aplicación informática Simon.

Figura 30. Aplicación SiMon: Pantalla inicio.

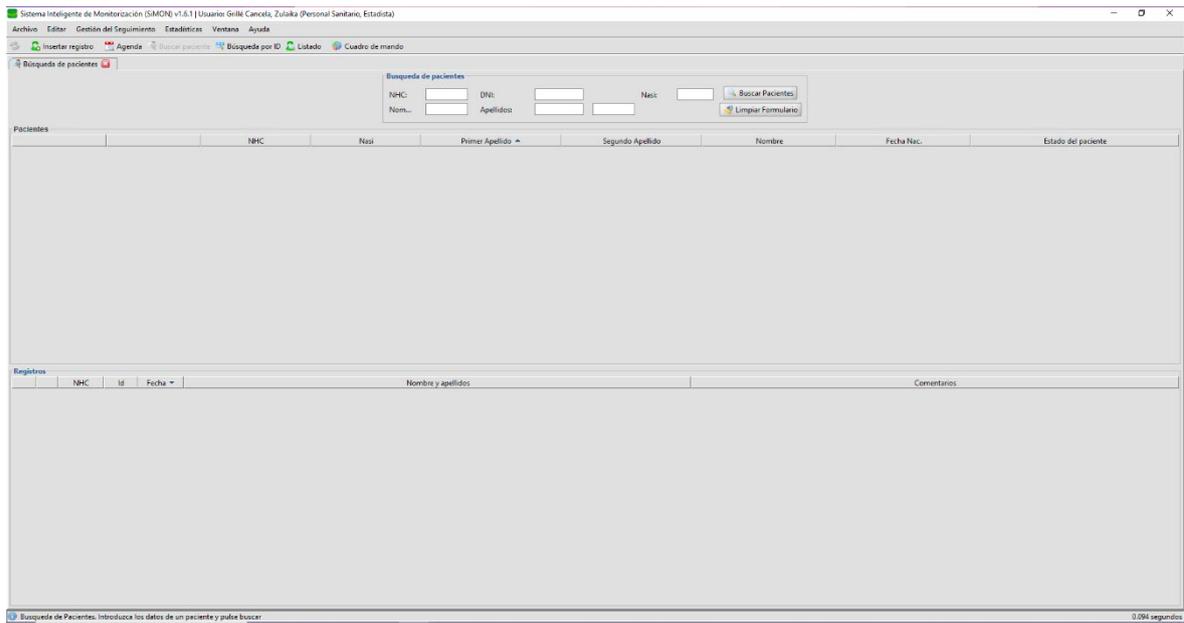
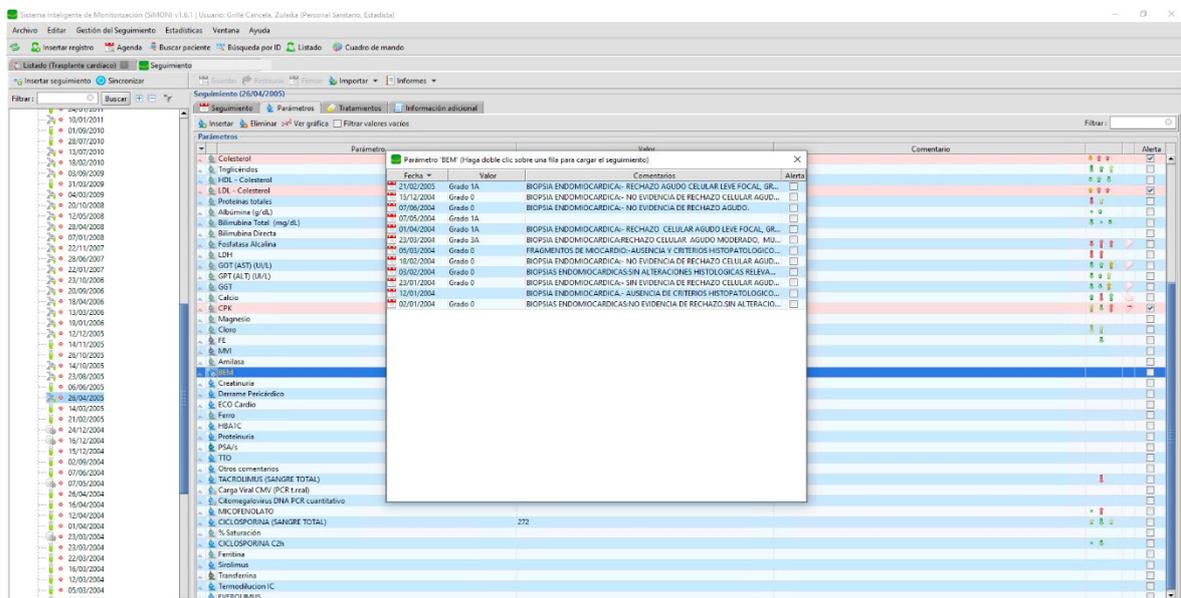


Figura 31. Plataforma SiMon: Pantalla de datos de anatomía patológica correspondiente a una visita clínica.



## ANEXO IV: lista de los 179 micrnas estudiados en la fase de búsqueda y porcentaje de muestras donde se encontró

microRNA	% muestras	secuencia diana microRNA
hsa-let-7a-5p	93.9	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7b-3p	42.4	CUAUACAACCUACUGCCUCCCC
hsa-let-7b-5p	98.5	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
hsa-let-7c-5p	87.9	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
hsa-let-7d-3p	84.8	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU
hsa-let-7d-5p	83.3	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
hsa-let-7e-5p	40.9	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7f-5p	89.4	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
hsa-let-7g-5p	83.3	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
hsa-let-7i-5p	90.9	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU
hsa-miR-1	5.0	UGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUAU
hsa-miR-100-5p	21.2	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG
hsa-miR-101-3p	77.3	UACAGUACUGUGUAACUGAA
hsa-miR-103a-3p	87.9	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
hsa-miR-106a-5p	92.4	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
hsa-miR-106b-3p	14.3	CCGCACUGUGGGUACUUGCUGC
hsa-miR-106b-5p	89.4	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU
hsa-miR-107	77.3	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
hsa-miR-10b-5p	72.7	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG
hsa-miR-122-5p	90.9	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
hsa-miR-125a-5p	87.9	UCCCUGAGACCCUUAACCUUGUGA
hsa-miR-125b-5p	60.6	UCCCUGAGACCCUAAUUGUGA
hsa-miR-1260a	95.4	AUCCCACCUCUGCCACCA
hsa-miR-126-3p	98.5	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
hsa-miR-126-5p	86.4	CAUUAAUACUUUUGGUACGCG

hsa-miR-127-3p	15.3	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU
hsa-miR-128-3p	9.1	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU
hsa-miR-130a-3p	86.4	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU
hsa-miR-130b-3p	59.1	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU
hsa-miR-132-3p	56.1	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG
hsa-miR-133a-3p	6.8	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
hsa-miR-133b	7.1	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA
hsa-miR-136-3p	2.3	CAUCAUCGUCUCAAUGAGUCU
hsa-miR-136-5p	5.5	ACUCCAUUUGUUUUGAUGAUGGA
hsa-miR-139-5p	83.3	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU
hsa-miR-140-3p	90.9	UACCACAGGGUAGAACCACGG
hsa-miR-140-5p	37.9	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG
hsa-miR-141-3p	14.5	UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG
hsa-miR-142-3p	81.8	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
hsa-miR-142-5p	78.8	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
hsa-miR-143-3p	42.4	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
hsa-miR-144-3p	74.2	UACAGUAUAGAUGAUGUACU
hsa-miR-144-5p	87.9	GGAUAUCAUCAUAUACUGUAAG
hsa-miR-145-5p	90.9	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU
hsa-miR-146a-5p	72.7	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
hsa-miR-146b-5p	63.6	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU
hsa-miR-148a-3p	53.0	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
hsa-miR-148b-3p	43.9	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU
hsa-miR-150-5p	100.0	UCUCCAACCCUUGUACCAGUG
hsa-miR-151a-3p	82.3	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG
hsa-miR-151a-5p	86.4	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU
hsa-miR-152-3p	60.6	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG
hsa-miR-154-5p	19.4	UAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCG
hsa-miR-155-5p	15.2	UUAAUGCUAUUCGUGAUAGGGGU
hsa-miR-15a-5p	86.4	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG

hsa-miR-15b-3p	62.1	CGAAUCAUUUUUGCUGCUCUA
hsa-miR-15b-5p	90.9	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA
hsa-miR-16-2-3p	37.5	CCAAUAAUACUGUGCUGCUUUA
hsa-miR-16-5p	100.0	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
hsa-miR-17-5p	89.4	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
hsa-miR-181a-5p	83.3	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
hsa-miR-185-5p	86.4	UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA
hsa-miR-186-5p	11.3	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU
hsa-miR-18a-5p	74.2	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG
hsa-miR-18b-5p	71.2	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG
hsa-miR-191-5p	98.5	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG
hsa-miR-192-5p	93.9	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
hsa-miR-193a-5p	65.2	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA
hsa-miR-194-5p	92.4	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA
hsa-miR-195-5p	33.3	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC
hsa-miR-197-3p	97.0	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC
hsa-miR-199a-3p	69.7	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA
hsa-miR-199a-5p	20.4	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC
hsa-miR-19a-3p	83.3	UGUGCAAUUCUAUGCAAACUGA
hsa-miR-19b-3p	89.4	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA
hsa-miR-200a-3p	0.0	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
hsa-miR-200c-3p	28.8	UAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGA
hsa-miR-205-5p	5.1	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG
hsa-miR-208a-3p	0.0	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU
hsa-miR-20a-5p	97.0	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG
hsa-miR-20b-5p	1.5	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG
hsa-miR-210-3p	33.3	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
hsa-miR-2110	34.8	UUGGGGAAACGGCCGCUGAGUG
hsa-miR-215-5p	87.9	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC
hsa-miR-21-5p	78.8	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA

hsa-miR-221-3p	48.5	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
hsa-miR-222-3p	66.7	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
hsa-miR-223-3p	100.0	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
hsa-miR-223-5p	48.5	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU
hsa-miR-22-3p	75.8	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU
hsa-miR-22-5p	11.5	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA
hsa-miR-23a-3p	100.0	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC
hsa-miR-23b-3p	98.5	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC
hsa-miR-24-3p	95.5	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
hsa-miR-25-3p	100.0	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA
hsa-miR-26a-5p	97.0	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
hsa-miR-26b-5p	78.8	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU
hsa-miR-27a-3p	90.9	UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG
hsa-miR-27b-3p	90.9	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
hsa-miR-28-3p	63.6	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA
hsa-miR-28-5p	54.5	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG
hsa-miR-29a-3p	59.1	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
hsa-miR-29b-3p	1.7	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
hsa-miR-29c-3p	75.8	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
hsa-miR-301a-3p	71.2	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAGC
hsa-miR-30a-5p	68.2	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
hsa-miR-30b-5p	95.5	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU
hsa-miR-30c-5p	97.0	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC
hsa-miR-30d-5p	100.0	UGUAAACAUCCCGACUGGAAG
hsa-miR-30e-3p	52.3	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC
hsa-miR-30e-5p	83.3	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG
hsa-miR-320a	100.0	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA
hsa-miR-320b	100.0	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA
hsa-miR-320c	98.5	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU
hsa-miR-320d	97.0	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA

hsa-miR-324-3p	49.0	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG
hsa-miR-324-5p	40.9	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU
hsa-miR-32-5p	32.3	UAUUGCACAUAACUAAGUUGCA
hsa-miR-326	8.3	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG
hsa-miR-328-3p	66.7	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU
hsa-miR-331-3p	37.1	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA
hsa-miR-335-3p	27.7	UUUUUCAUUAUUGCUCUGACC
hsa-miR-335-5p	27.3	UCAAGAGCAAUAACGAAAAUGU
hsa-miR-338-3p	12.9	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG
hsa-miR-339-3p	43.9	UGAGCGCCUCGACGACAGAGCCG
hsa-miR-339-5p	71.2	UCCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG
hsa-miR-33a-5p	28.6	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA
hsa-miR-342-3p	95.5	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU
hsa-miR-34a-5p	18.0	UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU
hsa-miR-361-5p	81.8	UUAUCAGAAUCUCCAGGGGUAC
hsa-miR-362-3p	8.3	AACACACCUAUUCAAGGAUUCA
hsa-miR-363-3p	45.5	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA
hsa-miR-365a-3p	12.1	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU
hsa-miR-374a-5p	90.9	UUAUAAUACAACCUGAUAAAGUG
hsa-miR-374b-5p	74.2	AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG
hsa-miR-375	47.0	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
hsa-miR-376a-3p	30.3	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU
hsa-miR-376c-3p	42.4	AACAUAGAGGAAAUUCCACGU
hsa-miR-382-5p	27.3	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG
hsa-miR-409-3p	31.8	GAAUGUUGCUCGGUGAACCCCU
hsa-miR-421	30.3	AUCAACAGACAUUAAUUGGGCGC
hsa-miR-423-3p	66.7	AGCUCGGUCUGAGGCCCUUCAGU
hsa-miR-423-5p	89.4	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU
hsa-miR-424-5p	45.2	CAGCAGCAAUCAUGUUUUGAA
hsa-miR-425-3p	65.6	AUCGGGAAUGUCGUGUCCGCC

hsa-miR-425-5p	90.9	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA
hsa-miR-451a	98.5	AAACCGUUACCAUACUGAGUU
hsa-miR-454-3p	65.2	UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGGGU
hsa-miR-483-5p	63.6	AAGACGGGAGGAAAGAAGGGAG
hsa-miR-484	97.0	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU
hsa-miR-485-3p	12.9	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU
hsa-miR-486-5p	100.0	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG
hsa-miR-495-3p	3.3	AAACAAACAUGGUGCACUUCUU
hsa-miR-497-5p	11.5	CAGCAGCACACUGUGGUUUGU
hsa-miR-501-3p	16.7	AAUGCACCCGGGCAAGGAUUCU
hsa-miR-502-3p	28.8	AAUGCACCUGGGCAAGGAUUCA
hsa-miR-505-3p	25.8	CGUCAACACUUGCUGGUUUCU
hsa-miR-532-3p	78.8	CCUCCCACACCCAAGGCUUGCA
hsa-miR-532-5p	53.0	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU
hsa-miR-543	7.5	AAACAUUCGCGGUGCACUUCUU
hsa-miR-574-3p	63.6	CACGCUCAUGCACACCCACA
hsa-miR-584-5p	25.8	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG
hsa-miR-590-5p	74.2	GAGCUUAUUCAUAAAAGUGCAG
hsa-miR-629-5p	48.5	UGGGUUUACGUUGGGAGAACU
hsa-miR-652-3p	60.6	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG
hsa-miR-660-5p	66.7	UACCCAUUGCAUUCGGAGUUG
hsa-miR-7-1-3p	12.1	CAACAAUCACAGUCUGCCAUA
hsa-miR-7-5p	58.5	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU
hsa-miR-766-3p	87.9	ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC
hsa-miR-874-3p	5.5	CUGCCCUGGCCGAGGGACCGA
hsa-miR-877-5p	28.8	GUAGAGGAGAUGGCGCAGGG
hsa-miR-885-5p	50.0	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU
hsa-miR-92a-3p	100.0	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
hsa-miR-92b-3p	36.4	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC
hsa-miR-93-3p	60.9	ACUGCUGAGCUAGCACUCCCG

hsa-miR-93-5p	92.4	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG
hsa-miR-99a-5p	54.5	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG
hsa-miR-99b-5p	87.9	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG
mmu-miR-378a-3p	5.5	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG

