

# DIAGNÓSTICO NO INVASIVO DEL RECHAZO CARDÍACO MEDIANTE RNAs NO CODIFICANTES



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

ETSIAMN

**TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA**

Curso académico 2021-2022

**ALUMNA: Nuria Roig Sánchez**

**TUTOR UPV: José Gadea Vacas**

**TUTORAS IIS LA FE: Estefanía Tarazón Melguizo y Esther Roselló Lletí**

**VALENCIA, MARZO DE 2022**

## RESUMEN

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome crónico y progresivo que disminuye la calidad de vida de los pacientes y aumenta la mortalidad por un déficit en el volumen de sangre que se bombea al resto de tejidos corporales. El trasplante de corazón (TC) es el tratamiento de elección para aquellos pacientes que cumplen con determinados criterios, debido a la limitación de órganos de donantes sanos y a las complicaciones posoperatorias, cuando no existen alternativas terapéuticas. Uno de los riesgos más habituales del trasplante es el rechazo celular agudo (RCA) del órgano, que se monitoriza y diagnostica mediante una biopsia endomiocárdica (BEM). Este método *gold standard* es un proceso invasivo cuyas principales limitaciones son la variabilidad interobservador y la heterogeneidad histológica de la biopsia, por lo que uno de los retos actuales es encontrar un método no invasivo capaz de detectar el rechazo cardíaco con fiabilidad y precisión.

Por ello, en este trabajo se estudia la capacidad diagnóstica de los RNAs no codificantes circulantes presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco. Así, se realizó la secuenciación del RNA no codificante de 28 muestras de suero con RCA diagnosticado (12 con RCA grado 1 (leve) y 12 con RCA grado  $\geq 2$  (moderado/grave)) y 12 muestras sin rechazo cardíaco. Las moléculas no codificantes se clasificaron según su biogénesis, su estructura o la función que desempeñan respecto al procesamiento y regulación de otros transcritos en long non-coding y small non-coding RNAs. Se obtuvieron un total de 516 long y 41 small non-coding RNAs alterados en los pacientes con rechazo cardíaco respecto del grupo sin rechazo. Se evaluó la capacidad diagnóstica mediante la construcción de curvas ROC, obteniéndose 107 long non-coding y 5 small non-coding con una excelente capacidad diagnóstica. De estos, destacamos 23 transcritos con una sensibilidad y especificidad superior al 80% en el rechazo moderado/grave y, además, 3 moléculas (*EGFR-AS1*, *AC008649.2* y *AP001652.1*) mantienen buena capacidad diagnóstica incluso en el rechazo leve. Aunque se desconoce la función de estos RNAs no codificantes en el rechazo celular agudo, sus funciones están relacionadas con el espliceosoma, el procesamiento postranscripcional mediante 2'-O-metilación y pseudouridilación de otros non-coding, el ciclo celular y la organización del nucléolo, por lo que estas rutas son importantes a tener en cuenta en futuros estudios para dilucidar mecanismos implicados en el desarrollo de esta patología.

En conclusión, se han identificado numerosas moléculas con excelente capacidad diagnóstica del rechazo celular agudo. Por ello, proponemos estos RNAs no codificantes como potenciales biomarcadores de rechazo cardíaco.

## PALABRAS CLAVE

Rechazo, trasplante cardíaco, diagnóstico no invasivo, RNAs, RNA no codificante, biopsia endomiocárdica, biomarcadores, insuficiencia cardíaca.

## ABSTRACT

Heart failure (HF) is a chronic and progressive syndrome that decreases the quality of life of patients and increases mortality due to a deficit in the volume of blood pumped to the rest of the body tissues. Heart transplantation (HT) is the chosen treatment for those patients who meet certain criteria, due to the limitation of healthy donor organs and postoperative complications, when there are no therapeutic alternatives. One of the most common risks of transplantation is acute cellular rejection (ACR) of the organ, which is monitored and diagnosed by endomyocardial biopsy (EMB). This gold standard method is an invasive process whose main limitations are interobserver variability and histological heterogeneity of the biopsy, so one of the current challenges is to find a noninvasive method capable of detecting cardiac rejection reliably and accurately.

Therefore, in this work we studied the diagnostic capacity of circulating non-coding RNAs present in the serum of patients undergoing cardiac transplantation. Thus, non-coding RNA sequencing of 28 serum samples with diagnosed ACR (12 with RCA grade 1 (mild) and 12 with ACR grade  $\geq 2$  (moderate/severe) and 12 samples without cardiac rejection) was performed. The non-coding molecules were classified according to their biogenesis, their structure or the function they play with respect to the processing and regulation of other transcripts into long non-coding and small non-coding RNAs. A total of 516 long and 41 small non-coding RNAs altered in patients with cardiac rejection with respect to the group without rejection were obtained. The diagnostic capacity was evaluated by constructing ROC curves, obtaining 107 long non-coding and 5 small non-coding RNAs with excellent diagnostic capacity. Of these, we highlight 23 transcripts with a sensitivity and specificity greater than 80% in moderate/severe rejection and 3 molecules (*EGFR-AS1*, *AC008649.2* and *AP001652.1*) maintain good diagnostic capacity even in mild rejection. Although the function of these non-coding RNAs in acute cellular rejection is unknown, their functions are related to the spliceosome, post-transcriptional processing by 2'-O-methylation and pseudouridylation of other non-coding, the cell cycle and the organization of the nucleolus, so these pathways are important to consider in future studies to elucidate mechanisms involved in the development of this pathology.

In conclusion, numerous molecules with excellent diagnostic capacity for acute cellular rejection have been identified. Therefore, we propose these non-coding RNAs as potential biomarkers of cardiac rejection.

## KEY WORDS

Organ rejection, cardiac transplantation, noninvasive diagnosis, RNAs, non-coding RNA, endomyocardial biopsy, biomarkers, heart failure.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. INSUFICIENCIA CARDÍACA (IC)</b>	<b>1</b>
1.1 DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA IC	1
1.2 DIAGNÓSTICO DE LA IC	2
1.3 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA IC	2
<b>2. TRASPLANTE CARDÍACO (TC)</b>	<b>2</b>
<b>3. RECHAZO CELULAR AGUDO (RCA)</b>	<b>4</b>
3.1 DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE RCA	4
3.2 DIAGNÓSTICO DE RCA	5
3.3 TRATAMIENTO DE RCA	7
<b>4. RNAs NO CODIFICANTES</b>	<b>7</b>
4.1 SMALL NON-CODING RNAs	8
4.1.1 snRNAs	8
4.1.2 snoRNAs	10
4.1.3 scaRNAs	11
4.1.4 miscRNAs	11
4.1.5 Otros small non-coding RNAs: miRNAs, piRNAs y siRNAs	12
4.2 LONG NON-CODING RNAs	13
<b>5. BIOMARCADORES SÉRICOS DE RCA</b>	<b>15</b>
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
1. INCLUSIÓN DE MUESTRAS	18
2. SECUENCIACIÓN DEL RNA NO CODIFICANTE	18
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
4. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS TRANSCRITOS ALTERADOS	19
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>20</b>
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	20
2. SELECCIÓN DE LOS NON-CODING RNAs IDENTIFICADOS EN LA SECUENCIACIÓN	20
3. EXPRESIÓN DE NON-CODING RNAs ALTERADOS EN EL SUERO DE PACIENTES TRASPLANTADOS.	23
3.1 SMALL NON-CODING RNAs	23
3.2 LONG NON-CODING RNAs	24
4. CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DE LOS NON-CODING RNAs ALTERADOS EN RCA	29
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>40</b>

<b>VII. REFERENCIAS</b> .....	<b>41</b>
-------------------------------	-----------

<b>ANEXO I</b> .....	<b>48</b>
----------------------	-----------

<b>ANEXO II</b> .....	<b>49</b>
-----------------------	-----------

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Características histológicas de los diferentes grados de RCA.....	6
<b>Figura 2:</b> Estructura del espliceosoma, formado por la interacción de RNAs nucleares y proteínas asociadas (RNPs).....	9
<b>Figura 3:</b> Estructura secundaria de los snRNAs que forman el espliceosoma.....	9
<b>Figura 4:</b> Representación gráfica de la estructura y función típica de los snoRNAs de caja C/D y H/ACA.....	10
<b>Figura 5:</b> Estructura de los scaRNAs del cuerpo de Cajal.....	11
<b>Figura 6:</b> Estructura característica de Y-RNAs en forma de tallo de doble cadena y loop variable monocatenario.....	12
<b>Figura 7:</b> Biogénesis de los diferentes biotipos de RNAs de interferencia: RNAs que interaccionan con PIWI (piRNAs), RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) y microRNAs (miRNAs).....	13
<b>Figura 8:</b> Estructura de Xist, long non-coding RNA implicado en la compensación de dosis génica, una de las múltiples funciones y mecanismos asociados a estos transcritos.....	15
<b>Figura 9:</b> Clasificación de los RNAs no codificantes en dos biotipos principales: small non-coding RNAs y long non-coding RNAs.....	16
<b>Figura 10:</b> Proporción de cada uno de los transcritos no codificantes detectados en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco: los dos biotipos principales (long non-coding RNA y small non-coding RNA) y los diferentes subgrupos de estudio.....	21
<b>Figura 11:</b> Expresión de small miscellaneous non-coding RNAs (miscRNAs) presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco, alterados en comparación al grupo sin rechazo cardíaco - grupo OR.....	23
<b>Figura 12:</b> Expresión relativa de los long non-coding RNAs presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco con un nivel de expresión medio inferior a 7,5 UA, alterados en comparación al grupo sin rechazo cardíaco (OR).....	24
<b>Figura 13:</b> Expresión relativa de los long non-coding RNAs presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco con un nivel de expresión medio medido entre 7,5 – 20 UA, alterados en comparación al grupo sin rechazo cardíaco (OR).....	25
<b>Figura 14:</b> Expresión relativa de los long non-coding RNAs presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco con un nivel de expresión medio medido entre 20-50 UA, alterados en comparación al grupo sin rechazo cardíaco (OR).....	26

<b>Figura 15:</b> Expresión relativa de los long non-coding RNAs presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco con un nivel de expresión medio medido en UA entre 50 y 500, alterados en comparación al grupo sin rechazo cardíaco (OR).....	27
<b>Figura 16:</b> Expresión relativa de los long non-coding RNAs presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco con un nivel de expresión medio medido en UA superior a 500, alterados en comparación al grupo sin rechazo cardíaco (OR).....	28
<b>Figura 17:</b> Curva de características operativas del receptor (ROC) de los long non-coding RNAs más sensibles y específicos presentes en suero para la detección del rechazo cardíaco.....	32
<b>Figura 18:</b> Curvas de características operativas del receptor (ROC) de los long non-coding RNAs (A-M y O) y small non-coding RNAs (N) más sensibles y específicos presentes en suero para la detección del rechazo cardíaco moderado/grave.....	33
<b>Figura 19:</b> Curvas de características operativas al receptor (ROC) de los long non-coding RNAs más representativos presentes en suero para la detección de todos los grados de rechazo cardíaco.....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Características clínicas de los pacientes presentadas en el momento de la BEM y de la extracción sanguínea.....	20
<b>Tabla 2:</b> Análisis de la expresión de los RNAs no codificantes para el diagnóstico no invasivo del rechazo cardíaco.....	22
<b>Tabla 3:</b> Código de la identificación de los Y-RNAs misceláneos.....	22
<b>Tabla 4:</b> Small non-coding RNAs potenciales biomarcadores séricos para el diagnóstico no invasivo del rechazo cardíaco.....	29
<b>Tabla 5:</b> Long non-coding RNAs potenciales biomarcadores para el diagnóstico no invasivo de todos los grados de rechazo cardíaco.....	30
<b>Tabla 6:</b> Long non-coding RNAs potenciales biomarcadores para el diagnóstico no invasivo de del rechazo cardíaco moderado/grave.....	31

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, a mis padres y a mi hermana, por hacer darme la posibilidad de continuar con mis estudios superiores y apoyarme el tiempo que me he dedicado a ellos. En segundo lugar, a mis tutoras de este trabajo de fin de máster, Estefanía y Esther, sin las cuales este trabajo hubiese sido mucho más difícil de sacar adelante.

A mis compañeros de laboratorio, que me han amenizado las mañanas, las comidas y el tiempo transcurrido en el laboratorio. A Isaac por proporcionarme el desayuno y acompañarme en el café de cada día: sin él mi índice glucémico sería un poco menor. A Noelia y su coche tamagochi, por alegrarme cada día con sus historias y su compañía. Sin ella, aún estaría dando vueltas por los pasillos del hospital perdida de camino a buscar una biopsia. A Alejandro, por sus debates que hacían reflexionar a todo el personal del laboratorio y con los que hemos pasado muy buenos ratos. Sin él quizá unas muestras no se habrían extraviado en el hielo del fregadero, pero otras muchas no se habrían procesado correctamente.

A todos los demás compañeros: Lorena, Marta, Yolanda, Miguel, Zaahra y Sandra, cada uno de vosotros me ha aportado distintas cosas y me quedo con un recuerdo bonito de todos vosotros. Por ser más que unos simples compañeros de laboratorio y convertirse en amigos con los que pasear y comer en el Palmar.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Insuficiencia cardíaca (IC)

#### 1.1 Definición y epidemiología de la IC

La enfermedad cardiovascular es una de las patologías más prevalentes en nuestra sociedad, siendo más frecuente en aquellas personas que presentan determinados factores de riesgo como una frecuencia cardíaca elevada, hipertensión, diabetes mellitus, sedentarismo, tabaquismo, mala alimentación o edad avanzada, entre los factores más destacables, situándose como la primera causa de muerte en España (*Turk-Adawi et al., 2018*). Además, la enfermedad cardiovascular es un concepto que engloba multitud de patologías que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos, ocasionando un deterioro del sistema circulatorio y del resto de los órganos que dependen de la sangre perfundida por el corazón para su correcto funcionamiento. Entre las patologías que afectan al corazón, la insuficiencia cardíaca (IC) es una de las más comunes, además de suponer un problema creciente de salud pública debido a su elevada presencia en una población envejecida y con marcadas comorbilidades en el envejecimiento como la población actual, tanto española como el resto de población mundial (*Orso et al., 2017*).

La IC es un síndrome hemodinámico crónico y progresivo que tiene lugar como consecuencia de la remodelación estructural y funcional del tejido cardíaco que se produce de manera secundaria a otras patologías relacionadas con el envejecimiento (*Crespo-Leiro et al., 2018*). Tiene una prevalencia mundial de aproximadamente 40 millones de individuos en el mundo y cada año se diagnostican aproximadamente 1 millón de casos nuevos solo en EE. UU. (*Ziaeian et al., 2016*). Los síntomas más característicos que se asocian a esta patología incluyen la disnea o dificultad respiratoria, fatiga, poca tolerancia al ejercicio suave o moderado, estertores pulmonares, distensión de las venas yugulares y retención de fluidos en los pulmones, el hígado, el tracto gastrointestinal y en las extremidades superiores e inferiores debido a las elevadas presiones de llenado ventricular que se producen en situaciones de reposo. Esto provoca un deterioro de la calidad de vida y un aumento de la morbilidad y de la mortalidad en los pacientes que la sufren, además de liderar las causas de hospitalización en adultos jóvenes y ancianos (*Arrigo et al., 2020; Ziaeian et al., 2016*).

Este síndrome cardíaco complejo se origina por las alteraciones estructurales o funcionales derivadas del llenado ventricular y de la eyección de sangre que pueden producir un déficit en el volumen de sangre bombeado al resto de los tejidos corporales. La *Heart Failure Association* (HFA) en colaboración con la *European Society of Cardiology* (ESC) en una de sus últimas actualizaciones han establecido los criterios que deben de estar presentes en los pacientes afectados para el diagnóstico de IC: síntomas persistentes de IC, disfunción cardíaca definida por la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), anomalías estructurales o valores altos persistentes de biomarcadores bioquímicos como el péptido natriurético cerebral o de tipo B (BNP) y el fragmento N-terminal del pro-péptido natriurético tipo B (NT-proBNP), deterioro severo de la capacidad de ejercicio y episodios de congestión pulmonar o sistémica. Pudiendo estar presentes o no otros síntomas como la caquexia cardíaca (pérdida de peso sin motivo



aparente de origen cardíaco), disfunción hepática o renal o hipertensión pulmonar (*Crespo-Leiro et al., 2018; ESC guideline for the management of adult congenital heart diseases, 2020*).

### **1.2 Diagnóstico de la IC**

El diagnóstico de IC se realiza mediante una evaluación de los síntomas que presenta el paciente y técnicas avanzadas de imagen cardiovasculares combinadas con exámenes bioquímicos de biomarcadores y pruebas invasivas de hemodinámica para medir la FEVI, parámetro expresado en porcentaje que mide el volumen de sangre que eyecta el ventrículo izquierdo con cada latido del corazón (*Pfeffer et al., 2019*). Los valores normales para la FEVI se sitúan entre el 50 y el 70%, y acorde a estos valores se divide la IC en dos subtipos: IC con FEVI preservada (superior al 50%) e IC con FEVI reducida (igual o inferior al 40%) (*Pfeffer et al., 2019; Ziaeian et al., 2016*).

### **1.3 Tratamiento farmacológico de la IC**

El tratamiento de la IC engloba diversas opciones según la edad del paciente, las comorbilidades que presenta o la evolución de la patología ya que se trata de una enfermedad multisistémica. En la actualidad no existe un tratamiento curativo de esta patología, por lo que se ofrece al paciente distintas recomendaciones para controlar los factores de riesgo, como una buena alimentación, limitación de la ingesta de alcohol y tabaquismo y realización de ejercicio suave para mejorar la calidad de vida, combinado con un tratamiento farmacológico.

La terapia farmacológica se dirige a paliar los síntomas que provoca la disfunción cardíaca, sin tener en cuenta la fisiopatología que los provoca, por lo que se centra en fármacos para descongestionar el sistema cardiovascular y devolver el estado hemodinámico alterado del paciente a un estado hemodinámico normal (*Arrigo et al., 2020*). El tratamiento farmacológico más común de la IC consiste en la administración de diuréticos intravenosos para eliminar el exceso de líquidos retenidos en combinación con vasodilatadores de corta acción para dilatar las paredes de los vasos sanguíneos y rebajar el esfuerzo del corazón, además de ventilación mecánica no invasiva. Otras opciones de tratamiento son las terapias quirúrgicas de resincronización cardíaca (TRC) o marcapasos biventricular y la asistencia ventricular temporal o nuevos fármacos como la ivabradina y sacubitrilo / valsartán (*Ziaeian et al., 2016*).

## **2. Trasplante cardíaco (TC)**

La cronicidad de la IC y su asociado mal pronóstico conlleva a la disfunción de otros órganos vitales a corto plazo por hipoperfusión (*Arrigo et al., 2020*), por lo que se acaba desencadenando la necesidad de un TC para aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes. La principal limitación de este tratamiento es el acceso al órgano requerido de donantes, ya que debido al envejecimiento y a las comorbilidades presentes en la población los donantes sanos son limitados.

El trasplante de corazón es un tratamiento que se ofrece a determinados pacientes seleccionados con IC avanzada o en etapa terminal que no responden adecuadamente a los tratamientos farmacológicos existentes. La dificultad de la cirugía, las complicaciones posoperatorias, la limitación de donantes sanos, los costes económicos asociados al trasplante y la necesidad de seguimiento médico de los receptores, entre otros motivos, hacen que este tratamiento no esté disponible para todos los afectados de IC, por lo que existen una serie de indicaciones, consideraciones y contraindicaciones en la evaluación de los pacientes pre-trasplante.

La *Internacional Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) establece como indicaciones para realizar el trasplante del órgano los siguientes criterios (*Mehra et al., 2016*):

- a. Enfermedad cardíaca terminal: paciente con fallo cardíaco refractario al tratamiento médico convencional y sin alternativa de tratamiento.
- b. El paciente debe encontrarse en un rango de edad comprendida entre los 14 y los 65 años, aunque los pacientes mayores de 70 años cuidadosamente seleccionados pueden ser considerados para TC.
- c. Prueba de esfuerzo cardiopulmonar: el consumo máximo de oxígeno debe ser inferior a 10ml/kg/min alcanzando el umbral de anaerobia con o sin presencia de dispositivo de resincronización cardíaca (CRT).
- d. *Heart Failure Survival Scores* (HFSS) de riesgo medio a riesgo alto o una puntuación <80% en el *Seattle Heart Failure Model* (SHFM) se consideran indicaciones para incluir al paciente en lista de TC (estas pruebas se evalúan en conjunto con el esfuerzo cardiopulmonar y no se deben utilizar únicamente estas puntuaciones para guiar la inclusión).
- e. Isquemia severa limitante de las actividades diarias y no susceptible a revascularización quirúrgica ni angioplastia.
- f. Arritmias ventriculares sintomáticas recurrentes refractarias a los tratamientos disponibles aceptados.
- g. *Right-heart catheterization* (RHC): la realización de esta prueba periódicamente ayuda a la evaluación y mantiene la candidatura a TC.
- h. Hospitalizaciones recurrentes por IC congestiva.
- i. Índice de masa corporal (IMC)  $\leq 35$  kg/m<sup>2</sup>. Los pacientes con un IMC superior son reevaluados tras una pérdida de peso previamente recomendada.

Del mismo modo, también existen una serie de contraindicaciones establecidas para la inclusión del paciente en lista de TC (*Mehra et al., 2016*):

- a. Hipertensión arterial pulmonar no reversible tras dispositivo de asistencia ventricular izquierda (LVDA).
- b. Patologías no cardíacas como infección activa, infarto pulmonar reciente (<2 meses), obesidad con IMC >35 kg/m<sup>2</sup>, úlceras gastrointestinales activas, neoplasias en curso, enfermedad cerebrovascular sintomática grave o enfermedad vascular periférica.
- c. Patologías cardíacas sistémicas como colagenosis, sarcoidosis o amiloidosis.

- d. Insuficiencia renal irreversible con FGe (Filtración glomerular estimada) < 30 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.
- e. Diabetes mellitus con daño de órgano blanco (corazón e hígado) o control glucémico deficiente persistente con [HbA1c] > 7,5 % o 58 mmol/mol.
- f. Anticuerpos HLA clase I: una puntuación de cPRA (*calculated Panel Reactive Antibodies*) > 10% se considera una contraindicación por un mayor riesgo de mortalidad, rechazo o vasculopatía del aloinjerto postrasplante.
- g. Historial psicosocial y abuso de sustancias adictivas o tabaquismo: es una contraindicación relativa aquellos pacientes que tienen conductas autolesivas, no cooperan con la atención médica o no siguen las recomendaciones o el tratamiento farmacológico.

Esta serie de criterios, tanto las indicaciones como las contraindicaciones, se subdividen en absolutos y relativos, de forma que los pacientes incluidos en lista para TC no han de cumplir todas las indicaciones mencionadas anteriormente. De igual manera, los pacientes sometidos a evaluación pretrasplante también pueden cumplir una o varias de las contraindicaciones mencionadas, sin que esto sea causa definitiva de su no inclusión en lista para TC. Por último, cabe destacar que los pacientes son reevaluados periódicamente, de forma que la exclusión de la lista es temporal y da al paciente un margen de tiempo para restituir contraindicaciones como el IMC, el tabaquismo, adicciones, neoplasias, infecciones, etc., priorizando, de esta manera, aquellos pacientes con IC avanzada en fase terminal con una mayor necesidad y posibilidad de beneficiarse de este tratamiento disponible.

### **3. Rechazo celular agudo (RCA)**

#### **3.1 Definición y epidemiología de RCA**

Los riesgos a corto plazo de esta complicada cirugía incluyen los riesgos de las cirugías convencionales con anestesia, como problemas respiratorios y reacciones adversas a los fármacos, además de los riesgos de las cirugías cardiovasculares, como trombosis venosa profunda, fallo renal y hepático, ataque cardíaco o cerebrovascular y arritmias cardíacas. Una vez realizada la cirugía y superadas las complicaciones vasculares y hemodinámicas que puedan haber surgido, el paciente permanece ingresado en la unidad de cuidados intensivos (UCI) donde es sometido a un control exhaustivo del correcto funcionamiento del órgano trasplantado. El rechazo del órgano trasplantado es una de las principales causas más comunes de muerte en los pacientes (*Seferović et al., 2021*), junto con las complicaciones posoperatorias, como las infecciones bacterianas y fúngicas y las frecuentes neoplasias malignas debidas al tratamiento inmunosupresor.

Este trabajo se centra en el RCA del injerto, debido a que es una de las complicaciones más comunes postrasplante, su difícil detección, tratamiento y supervivencia. El rechazo del aloinjerto se debe a la respuesta que es desencadenada por el sistema inmune del receptor frente a la presencia de antígenos expresados en el corazón donante. Existen diferentes tipos de rechazo del trasplante según su origen, mediado por anticuerpos o celular, y el tiempo en el que suceden, agudo o crónico. El rechazo hiperagudo consiste en un tipo de rechazo mediado por

anticuerpos preformados contra antígenos del sistema HLA del donante. Este tipo de rechazo es infrecuente en la actualidad debido a las pruebas de anticuerpos reactivos que se realizan para comprobar la compatibilidad donante-receptor antes del trasplante. El rechazo crónico es una complicación que se produce a largo plazo después del TCI que produce un estrechamiento de las arterias coronarias del aloinjerto, produciendo que el paciente sea considerado para retrasplante.

El rechazo agudo es el tipo de rechazo más frecuente que se produce en los primeros 6 - 12 meses posteriores al TC. Se diagnostica entorno al 40% de los pacientes y es la causa principal de mortalidad en este período de tiempo, causando aproximadamente el 12% de los decesos entre los pacientes postrasplante (*Miller et al., 2013*). Se caracteriza por el ataque de los linfocitos T del receptor al órgano trasplantado, acompañado de infiltración de un ambiente inflamatorio que provoca la apoptosis de los miocitos y edema. Con la progresión de la patología se produce una infiltración de leucocitos tipo eosinófilos y neutrófilos, vasculitis del aloinjerto y una progresión de la miocitólisis con necrosis del tejido. El RCA es una patología que cursa sin síntomas clínicos, por lo que el diagnóstico se realiza monitorizando a los pacientes periódicamente mediante una evaluación histológica del miocardio.

### **3.2 Diagnóstico de RCA**

El método *gold standard* para el diagnóstico del rechazo es la biopsia endomiocárdica (BEM) y se trata de un procedimiento invasivo que consiste en la extracción de una porción de ventrículo derecho más comúnmente, de ventrículo izquierdo o biventricular del órgano trasplantado vía cateterismo utilizando las venas yugular, femoral o braquial o las arterias femorales o radiales para el acceso vascular (*Cooper et al., 2007*). La BEM es utilizada de forma periódica para la vigilancia del rechazo del aloinjerto y las complicaciones de esta monitorización se producen entorno al 0,5-1,5% de las biopsias realizadas. Los posibles riesgos incluyen perforación miocárdica, taponamiento pericárdico, arritmias y regurgitación tricúspidea, es decir, un cierre inadecuado de la válvula y retroceso de la sangre a la aurícula (*Miller et al., 2013*).

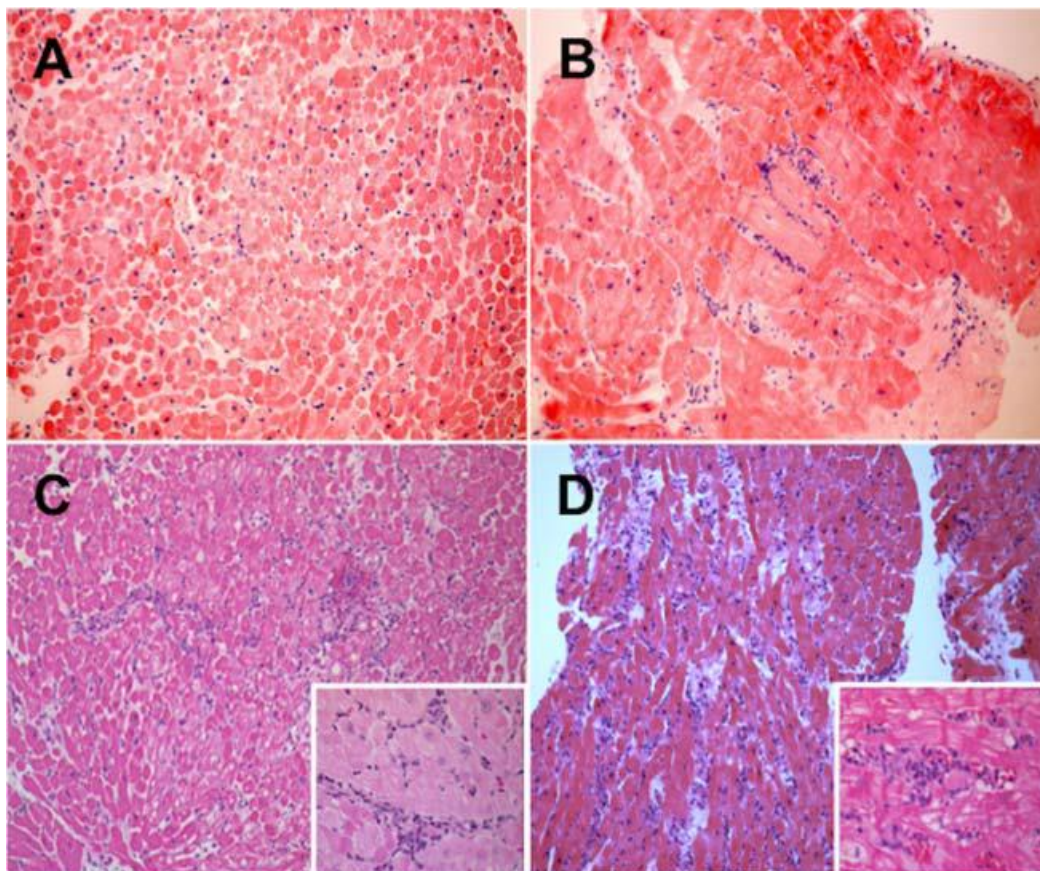
La principal limitación de este método es el error de muestreo, ya que el órgano trasplantado puede no mostrar las mismas características histológicas de manera homogénea en toda su extensión, sumado a la variabilidad interobservador, por lo que puede haber diferencias en el nivel de rechazo cardíaco diagnosticado dependiendo del operador y de su experiencia previa (*Cooper et al., 2007; Seferović et al., 2021*).

Por tanto, debido a la invasividad del proceso, al coste económico de la cirugía y del posterior tratamiento, al riesgo y las complicaciones asociadas al proceso que supone para los pacientes y a las limitaciones técnicas del procedimiento, uno de los retos actuales de la ciencia es desarrollar un método no invasivo capaz de diagnosticar y monitorizar el rechazo del aloinjerto cardíaco de una manera eficaz.

El diagnóstico de RCA permite clasificar a los pacientes trasplantados en diferentes niveles o grados según las alteraciones anatomopatológicas detectadas en las muestras histológicas del miocardio siguiendo los criterios establecidos por la ISHLT (*Berry et al., 2013*):

- a. Grado 0 (0R) o sin rechazo celular: no se detectan lesiones en el miocardio.
- b. Grado 1 (1R) o rechazo leve: se detecta infiltración linfocitaria focal o multifocal disperso sin miocitólisis.
- c. Grado 2 (2R) o rechazo moderado: Infiltración de linfocitos agresiva con miocitólisis y presencia de miocardio no alterado entre los infiltrados.
- d. Grado 3 (3R) o rechazo grave: Inflamación difusa y densa con miocitólisis, infiltración de eosinófilos y neutrófilos, endotelitis, vasculitis y hemorragia.

Podemos observar estas características clínicas en el análisis histológico de las muestras de miocardio extraídas a los receptores del trasplante (**Figura 1**). Debido al progreso del rechazo celular, se observa una mayor inflamación, infiltración de leucocitos y miocitólisis conforme aumenta la gravedad del diagnóstico.



**Figura 1. Características histológicas de los diferentes grados de RCA.** (A) Grado 0R: Miocardio normal sin evidencia de infiltrados inflamatorios (hematoxilina-eosina, aumento original  $\times 100$ ). (B) Grado 1R: Se observan escasos infiltrados intersticiales entre los miocitos, sin expansión intersticial ni daños claros en los miocitos (hematoxilina-eosina, aumento original  $\times 100$ ). (C) Grado 2R: Infiltrado inflamatorio más prominente, con expansión intersticial y daño miocárdico multifocal (hematoxilina-eosina, aumento original  $\times 100$ ; inserto con aumento  $\times 250$ ). (D) Grado 3R: Densos infiltrados inflamatorios mixtos, incluyendo eosinófilos y neutrófilos, con hemorragia y edema intersticial que separa los miocitos dañados (hematoxilina-eosina, aumento original  $\times 100$ ; inserto con aumento  $\times 250$ ). Adaptada de Miller *et al.*, 2013.

### 3.3 Tratamiento de RCA

Prevenir, diagnosticar correctamente y detener el desarrollo de rechazo celular es crucial para aumentar la supervivencia de los pacientes trasplantados y evitar la progresión a formas más graves de rechazo agudo o el paso a rechazo crónico. Con un correcto tratamiento de esta patología, se podría evitar la necesidad de un retrasplante, evitando también lo que este proceso supondría: supervivencia comprometida a la espera de un donante compatible, reevaluación del paciente para su inclusión en la lista de espera, mortalidad durante la cirugía, entre otros. Ante una biopsia negativa en RCA, con una apariencia histológica sin lesiones, hay aproximadamente un 20% de pacientes con signos que sugieren la existencia de RCA. Es por ello que el tratamiento tardío, o la falta de él, aumenta el daño miocárdico y empeora el pronóstico de esta patología (Miller et al., 2013).

El tratamiento actual para el RCA consiste en un tratamiento inmunosupresor para evitar el ataque del sistema inmune del receptor al órgano donado, ya que no hay un tratamiento contra las causas que inician el rechazo, puesto que estas no están esclarecidas. Siguiendo las pautas de la ISHLT, el tratamiento inmunosupresor consta de la administración de uno o de la combinación de varios de los siguientes fármacos: corticoides como la metilprednisolona o la prednisona, estatinas, tacrolimus, sirolimus, ciclosporina y everolimus. Ante la progresión del RCA, las pautas que se recomienda seguir son el ingreso del paciente sintomático y un ajuste de la terapia inmunosupresora, con un aumento de dosis de los fármacos administrados, la adición de un nuevo fármaco o un cambio de terapia inmunosupresora, en combinación con la administración de otros fármacos para el control de la hemodinámica y de las posibles infecciones (Constanzo et al., 2010).

## 4. RNAs no codificantes

En los últimos años, con el auge de la tecnología de secuenciación y las ciencias ómicas, se ha destacado la relevancia de los RNAs circulantes como potenciales biomarcadores de disfunción o de progreso en multitud de procesos celulares y enfermedades. Con este descubrimiento también se ha observado que el genoma se transcribe de forma generalizada, de manera que un 98% del genoma eucariota que se transcribe tiene lugar en forma de RNAs que no codifican para péptidos (Watson et al., 2019), pero contienen información genética y desarrollan una función importante en la biorregulación de otras moléculas, interviniendo en procesos como la señalización inter e intracelular, la regulación de la expresión génica a través de interferencia, la compactación de la cromatina, la regulación de las marcas epigenéticas, la impronta genética, la compensación de dosis, la transcripción y la traducción, el splicing y el procesamiento de los transcritos (Mattick et al., 2006). Cabe destacar que a medida que aumenta la complejidad de los organismos pluricelulares se reduce la proporción de genoma que codifica péptidos y aumenta el número de secuencias no codificantes, reforzando así la teoría del papel que juegan estas moléculas en las entramadas vías de la señalización y de la regulación génica y constituyendo una fuente importante de variabilidad génica tanto entre como dentro de la misma especie (Mattick et al., 2006; Watson et al., 2019).

Este grupo de moléculas no codificantes está constituido por los transcritos resultantes de la transcripción por intrones, secuencias intergénicas, pseudogenes, repeticiones en tándem, regiones promotoras y elementos reguladores en cis y en trans (Watson et al., 2019), por lo que

su papel en la regulación génica se está estudiando cada día más. Por tanto, los RNAs no codificantes podrían ser fundamentales para entender los mecanismos causantes y de progresión de diferentes procesos patológicos, entre los que se sitúa el rechazo cardíaco tras un trasplante, por lo que cobra importancia la necesidad de cuantificar los cambios y diferencias entre las diferentes poblaciones de estudio, permitiendo así el desarrollo futuro de biomarcadores.

Los RNAs no codificantes circulantes son un amplio grupo de moléculas variadas que contiene muchos subtipos de diferente origen y función. Se ha establecido un criterio arbitrario según el cual se subdividen en dos grandes grupos las moléculas no codificantes circulantes según su longitud principalmente, pero teniendo en cuenta su función y su localización subcelular (*Wang et al., 2015, Xing et al., 2018*). De esta manera, los RNAs con una longitud menor a 200 nucleótidos se denominan small RNAs y tienden a localizarse en el núcleo celular realizando funciones de mantenimiento y de procesamiento de otros RNAs, mientras que los que tienen una longitud nucleotídica mayor se denominan long non-coding RNAs y se localizan selectivamente tanto en el núcleo celular como en el citoplasma (*Xing et al., 2018*).

#### 4.1 Small non-coding RNAs

Según su biogénesis, estructura y la función del small RNA, podemos encontrar diferentes biotipos: en primer lugar, los RNAs nucleares (snRNA) y RNAs nucleolares (snoRNA), pequeñas moléculas que se encuentran dentro del núcleo celular y están asociadas al splicing y a la modificación de otros RNAs respectivamente. Por otro lado, encontramos los RNAs específicos del cuerpo de Cajal (scaRNA), grupo en el cual se encuentran los RNA asociados a este orgánulo nuclear involucrado en la biogénesis de pequeñas ribonucleoproteínas, seguido del RNA misceláneo (miscRNA), término general que se refiere a los small RNA que no encajan en ningún grupo definido hasta el momento. Por último, otros RNAs de interferencia como los RNAs pequeños de interferencia (siRNAs), que intervienen en el silenciamiento de productos víricos, microRNAs (miRNAs), que inducen o reprimen la traducción de mRNAs, y RNAs que interactúan con PIWI (piRNAs), que interfieren en la expansión de los elementos repetitivos, además de otros RNAs de mantenimiento, donde se incluyen los tRNAs y los rRNAs, cuya función está implicada en la traducción de los RNAs codificantes.

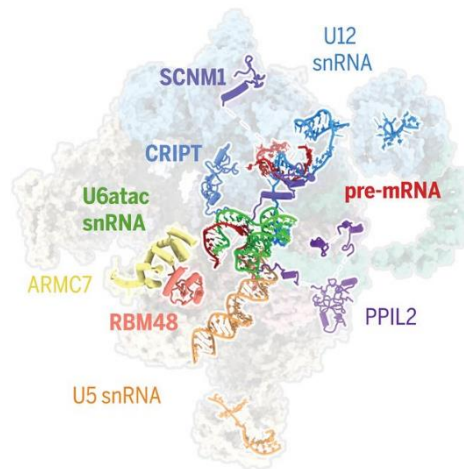
En este estudio nos centraremos en el papel que juegan en el rechazo cardíaco los cuatro primeros grupos: RNA nuclear, RNA nucleolar, RNAs del cuerpo de Cajal y RNAs misceláneos, ya que las funciones de los otros RNAs de interferencia, principalmente los miRNAs, han sido ampliamente estudiadas en el rechazo cardíaco y en otras patologías como el cáncer.

##### 4.1.1 snRNAs

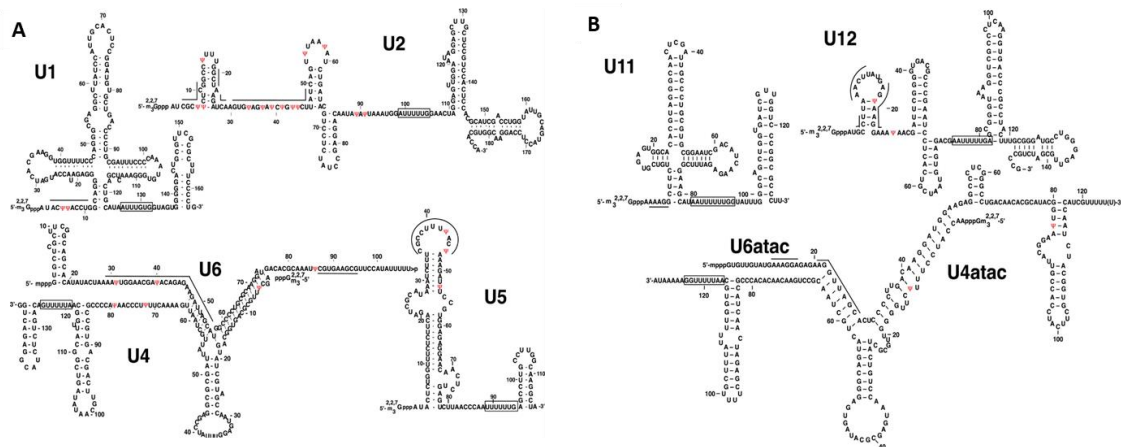
Los RNAs localizados en el núcleo celular tienen una longitud aproximada de 150 nucleótidos y su secuencia, altamente conservada en la evolución, es rica en uridina modificada. Además, este biotipo no codificante forma parte del complejo de splicing o espliceosoma, un ribonucleocomplejo llamado snRNP formado por combinaciones de los diferentes snRNAs interactuando con proteínas asociadas (RNPs), por lo que juegan un papel fundamental en la eliminación de las regiones no codificantes y en el empalme de los pre-mRNAs para dar lugar al mRNA maduro capaz de codificar péptidos funcionales (**Figura 2**). Existen dos espliceosomas diferentes: el snRNP mayor formado por los snRNAs U1-U6 que reconocen los lugares de splicing intrónicos donantes y aceptores con secuencia GT/AG, mientras que el snRNP menor reconoce

los lugares de splicing donadores y aceptores no canónicos AT/AC y está formado por los snRNAs U5, U11, U12, U4atac y U6atac (Guiró *et al.*, 2017). La estructura de los snRNAs que forman el snRNP mayor se muestran en la **Figura 3A** y los que forman el snRNP menor se muestran en la **Figura 3B**.

También se han relacionado algunos snRNAs con la regulación del inicio de la transcripción a través de su papel en la formación del complejo *Mediator*, de su interacción con el factor de iniciación TFIIF de la RNA polimerasa II y con el complejo CDK/Ciclina T, además de estar relacionados con el proceso de elongación (Guiró *et al.*, 2017, Mattick *et al.*, 2006). Por tanto, debido al papel que desarrollan en el procesamiento y maduración de los mRNAs codificantes y en otros procesos celulares, una desregulación de estas moléculas puede tener un gran impacto en la homeostasis y el correcto funcionamiento celular.



**Figura 2: Estructura del espliceosoma, formado por la interacción de RNAs nucleares y proteínas asociadas (RNPs).** Este complejo ribonucleoproteico se une al pre-mRNA para su procesamiento y correcta maduración. Figura adaptada de Bai *et al.*, 2021.



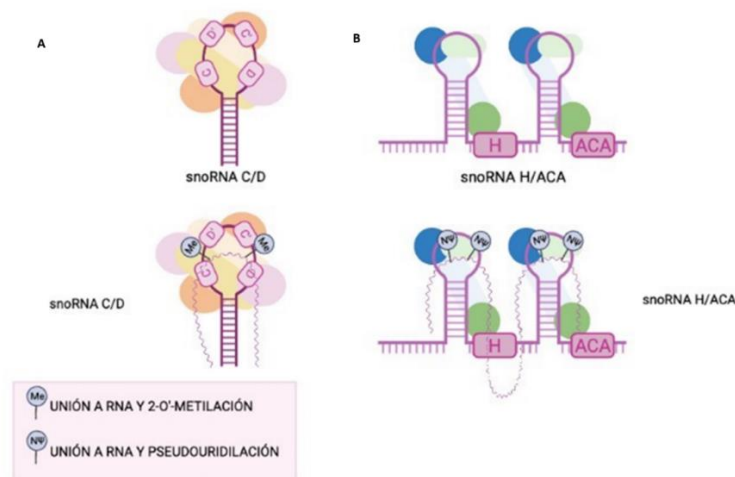
**Figura 3: Estructura secundaria de los snRNAs que forman el espliceosoma.** (A) snRNAs del snRNP mayor, formado por los snRNAs U1-6, de los cuales se muestran todos excepto U3. (B) snRNAs del snRNP menor, formado por U5, U11, U12, U4atac y U6atac, de los cuales se muestran todos excepto U5 por ser estar en común con el snRNP mayor. Figura extraída de Zhao *et al.*, 2018.



#### 4.1.2 snoRNAs

Los RNAs que se localizan en el nucléolo celular tienen una longitud de entre 60 y 140 nucleótidos y se subdividen en dos subgrupos, RNAs de caja C/D y RNAs de caja H/ACA, según la estructura característica de cada grupo y la función que realicen dentro de la biogénesis y modificación de otros non-coding RNAs e incluso en el procesamiento de mRNAs (*Mattick et al., 2006*). Los snoRNAs en general intervienen en el mantenimiento de los cromosomas y en la segregación, además de en el procesamiento y maduración de otros RNAs mediante el apareamiento nucleotídico de pequeñas regiones o motivos conservados de su estructura, pero cada subgrupo está especializado en una modificación particular. Las moléculas que pertenecen a la caja C/D nucleolar tienen una estructura típica de una sola horquilla y cumplen la función de 2'-O-metilación característica de este grupo implicada en el procesamiento de otros RNAs, principalmente no codificantes como snRNAs, tRNAs o rRNAs, regulatorios como miRNAs y piRNAs y codificantes (mRNAs) (**Figura 4A**) (*Liang et al., 2019; Motorin et al., 2018*). Esta metilación guiada por los motivos funcionales o cajas C y D consiste en la adición de un grupo metilo en el grupo 2'-OH de la ribosa a modificar, independientemente del ribonucleósido que se modifique.

Por otro lado, los RNAs de caja H/ACA desarrollan una función y tienen una estructura ligeramente diferente a las que presentan los RNAs de caja C/D, estando compuesta su estructura secundaria por dos horquillas unidas por una cadena monocatenaria de nucleótidos siguiendo un patrón de horquilla-bisagra-horquilla-cola (**Figura 4B**). La función que realizan los snoRNAs H/ACA consiste en el procesamiento mediante una reacción de pseudouridilación de otros RNAs codificantes y no codificantes (**Figura 4B**), es decir la isomerización del nucleósido uridina a su forma isomérica de pseudouridina guiada por los motivos funcionales H y ACA, que constituye la forma más habitual de modificación post-transcripcional y procesamiento de los RNAs no codificantes nucleares. El hecho de que esta modificación se vea desregulada impacta directamente en la estructura y en las propiedades bioquímicas de los small RNAs, afectando a los procesos mediados por estas moléculas, a la señalización intra e intercelular y al procesamiento de otros mRNAs y ncRNAs llevado a cabo por estos snoRNAs (*Zhao et al., 2018*).

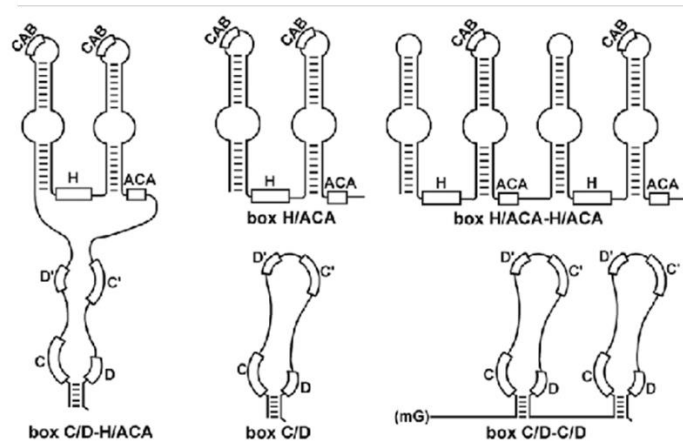


**Figura 4: Representación gráfica de la estructura y función típica de los snoRNAs de caja C/D y H/ACA.** A: Estructura secundaria característica de los snoRNAs de caja C/D, constituida por una sola horquilla de RNA e interacción RNA-RNA y función de 2'-O-metilación de los RNAs unidos a los RNAs de caja C/D. B: Estructura secundaria característica de los snoRNAs de caja H/ACA, constituida por dos horquillas unidas por un fragmento monocatenario de RNA, interacción RNA-RNA y función de pseudouridilación de los RNAs unidos a los RNAs de caja H/ACA.

#### 4.1.3 scaRNAs

Los cuerpos de Cajal son uno de los orgánulos celulares más caracterizados, formados por nucleoproteínas y RNAs asociados a nucleoproteínas, formando complejos RNP. Los RNAs que forman parte del cuerpo de Cajal tienen como origen RNAs nucleolares, pero con especialización en este orgánulo, por lo que además de los motivos funcionales de guía H/ACA o C/D tienen motivos cortos de localización subcelular. Por tanto, la principal función de estas moléculas es la modificación post-transcripcional de otros transcritos no codificantes mediante pseudouridilación y 2'-O-metilación, principalmente de los snRNAs y rRNAs (Nostramo et al., 2019).

Otra característica que permite diferenciar estos scaRNAs de los snoRNAs es que los scaRNAs pueden tener los motivos funcionales guía H/ACA o C/D en tándem, teniendo hasta dos repeticiones y 4 motivos en serie, además de poder formar moléculas híbridas C/DH/ACA (Figura 5). Actualmente se han identificado 5 transcritos híbridos, 1 tándem H/ACA y 4 tándem C/D, además de múltiples scaRNAs H/ACA o C/D sin tándem (Meier, 2017).



**Figura 5: Estructura de los scaRNAs del cuerpo de Cajal.** Se muestra la de una molécula híbrida H/ACA-C/D (izquierda), de los scaRNAs H/ACA y C/D (centro) y de los tándems H/ACA y C/D (derecha). Figura extraída de Kiss et al., 2006.

#### 4.1.4 miscRNAs

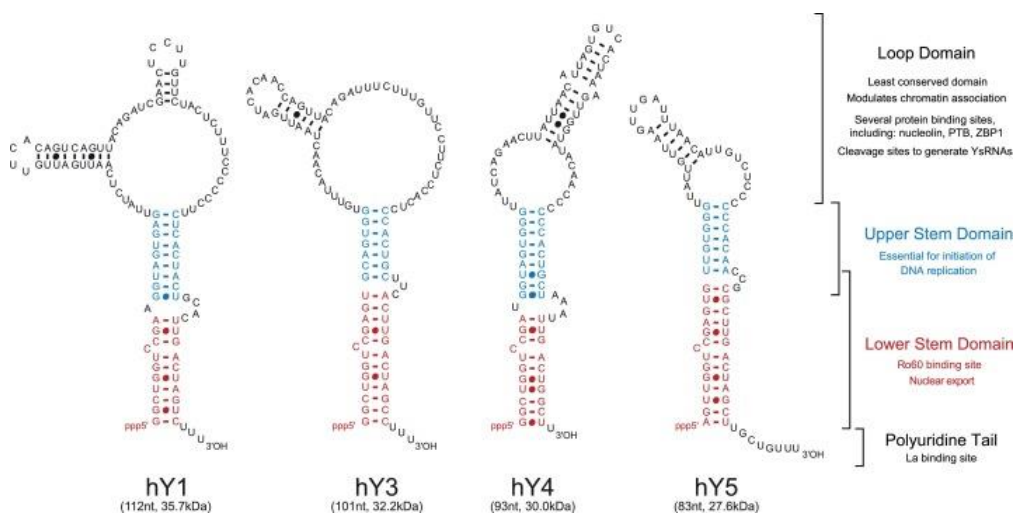
Dentro del último grupo de estudio podemos encontrar los Y-RNA, un grupo de RNAs pequeños cuya estructura y función está siendo cada vez más estudiada debido a su fuerte asociación con procesos autoinmunes, gracias a los cuales fueron descubiertos cuando se estudiaban los autoanticuerpos presentes en pacientes afectados por lupus eritematoso sistémico, a su creciente presencia en estudios que describen la alteración de este RNA misceláneo en diferentes tipos de cáncer debido al papel que desempeña el Y-RNA en el inicio de la replicación del DNA, aunque aún no se conocen los mecanismos por los cuales es partícipe, y su creciente asociación con patologías cardíacas debido a la desregulación de proteínas que se unen a los Y-RNA y están presentes en el tejido cardíaco, como la calcineurina (Valkov et al., 2020).

Los genes que codifican para los transcritos de Y-RNA son cuatro (*RNY1*, *RNY3*, *RNY4* y *RNY5*) y se agrupan en el brazo largo del cromosoma 7, aunque a lo largo de la evolución han aparecido multitud de pseudogenes derivados de estos que se reparten a lo largo de todo el genoma eucariota, siendo estos el origen de los Y-RNAs no codificantes (Gulia et al., 2020). Una observación sobre esta familia es que únicamente uno de los casi 1000 pseudogenes descritos

se encuentra en el cromosoma sexual Y, pese a que el nombre de los transcritos pueda dar lugar a la confusión, estos están presentes en ambos sexos de la población humana y se encuentran altamente conservados en vertebrados (Cambier et al., 2017).

La estructura característica de estas moléculas se divide en un tallo de doble cadena y un loop variable de cadena sencilla (Figura 6). Mientras que la parte superior del tallo se ha relacionado con el inicio de la replicación del DNA, la parte variable del loop es la encargada reconocer e interactuar con otros complejos como el snRNP (Cambier et al., 2017; Gulia et al., 2020), relacionándose así este grupo de moléculas no codificantes con los RNAs nucleares. Por último, los Y-RNAs también se han relacionado con un efecto cardioprotector ya que se han encontrado enriquecidos en los exosomas de pacientes controles en el infarto de miocardio. Se ha estudiado, a través de un modelo en ratas, los mecanismos implicados en la cardioprotección y se ha observado que los beneficios surgen de la estrecha comunicación que mantienen los Y-RNA con el sistema inmune (Cambier et al., 2017; Driedonks et al., 2019).

Por otra parte, la familia de los RNAs 7SL también forma parte de este grupo heterogéneo y aparece en la literatura como un componente del core de la partícula ribonucleoproteica de reconocimiento de señal (SRP), cuya principal función es la interacción con el ribosoma durante la síntesis de proteínas nacientes para su correcta señalización y transporte desde el citoplasma al orgánulo de destino (Massenet, 2019; Mattick et al., 2006). El estudio de esta partícula de reconocimiento de señales ha desvelado nuevas funciones no canónicas de este complejo, entre las que se encuentran la regulación transcripcional y la modulación de la apoptosis en procesos mediados por el sistema inmunitario y debido a su imprescindible papel en la señalización de proteínas necesaria para la homeostasis y supervivencia celular, estas moléculas se encuentran desreguladas en multitud de patologías por lo que la variación de su expresión podría convertirse en un buen biomarcador (Faoro et al., 2021).



**Figura 6: Estructura característica de Y-RNAs en forma de tallo de doble cadena y loop variable monocatenario.** La parte superior del tallo se ha relacionado con la replicación del DNA mientras que el loop interactúa con otras proteínas. Figura extraída de Kowalski & Krude, 2015.

#### 4.1.5 Otros small non-coding RNAs: miRNAs, piRNAs y siRNAs

Existen otros small non-coding RNAs que, aunque no son objeto de estudio en este trabajo, no son menos importantes y deben de ser mencionados. Estos son los biotipos miRNAs, siRNAs y piRNAs. Estas moléculas son transcritos pequeños de RNA, con una longitud entre 21 y 30

nucleótidos, cuya función principal es la regulación de la expresión de otros genes mediante silenciamiento génico. Esta función la realizan formando un complejo con la proteína PIWI (piRNAs) o con proteínas de la familia Ago: los siRNAs se unen a Ago 2 y los miRNAs, a Ago1. (Figura 7) (Carthew & Sontheimer, 2009; Fablet, 2014).

Los piRNAs se diferencian del resto de RNAs de interferencia, además de por la proteína a la que se unen para llevar a cabo el silenciamiento génico, porque provienen de un cluster de genes que codifica específicamente para ellos y son ligeramente más largos. Se trata de RNAs exclusivos de células germinales y actúan específicamente inhibiendo los transcritos procedentes de elementos repetitivos y transposones (Fablet, 2014).

Los siRNAs se diferencian de los piRNAs y de los miRNAs por su biogénesis, ya que provienen de un precursor bicatenario que es procesado por la proteína Dicer y actúa en conjunto con el complejo RISC produciendo una inhibición de la traducción o la degradación de mRNAs víricos (Fablet, 2014).

Por último, los miRNAs tienen características únicas que los diferencian de los restantes biotipos: provienen de locus genómicos específicos que codifican para estos RNAs, posteriormente son procesados por la proteína Drosha seguidamente de la proteína Dicer1. El mecanismo de silenciamiento mediante el cual estos RNAs actúan es la unión con el complejo RISC, inhibiendo la traducción o catalizando la degradación de mRNAs por la formación de un dímero RNA-RNA (Carthew & Sontheimer, 2009).

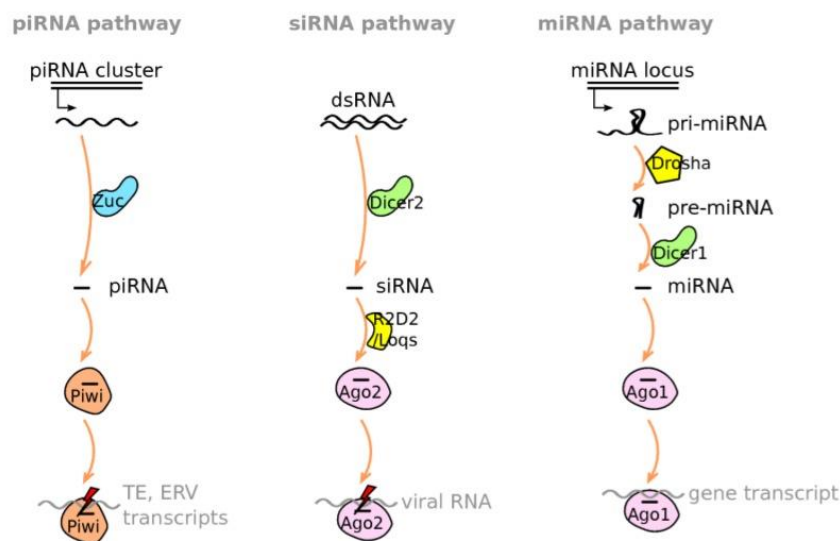


Figura 7: Biogénesis de los diferentes biotipos de RNAs de interferencia: RNAs que interactúan con PIWI (piRNAs), RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) y microRNAs (miRNAs). Figura extraída de Fablet, 2014.

#### 4.2 long non-coding RNAs

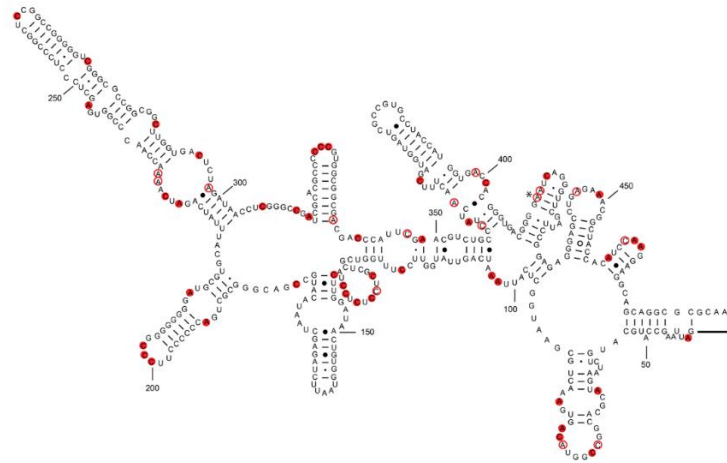
Este grupo de RNAs no codificantes agrupa un conjunto heterogéneo de numerosas moléculas con biogénesis, longitud y estructuras diversas que se corresponden a las diferentes funciones que realizan. Mientras que los RNAs pequeños no codificantes se han subdividido según un claro criterio dependiendo de la función específica en la que están involucrados, en este grupo encontramos que la clasificación que se suele realizar no es fija y algunas moléculas encajan en diferentes grupos, por lo que los aspectos que se comentan a continuación son atribuidos al

grupo en general. Entre las agrupaciones que se realizan encontramos los lincRNA, long non-coding antisentido, long non-coding asociados a promotores y RNAs circulares (Kung et al., 2013).

La biogénesis y la estructura de los long non-coding RNAs es similar a la de los transcritos codificantes, ya que principalmente han sido transcritos por la RNA polimerasa II (pol II) y procesados con modificaciones post-transcripcionales como la poliadenilación en el extremo 3' y la 7-metilguanosina en el extremo 5' (CAP). Sin embargo, una característica que los diferencia es que los long non-coding RNAs restantes se transcriben a partir de las otras polimerasas existentes o de regiones intergénicas formando los lincRNAs y el procesamiento de estos transcritos es deficiente en comparación con el de los transcritos codificantes, por lo que se retienen en el núcleo (Quinn & Chang, 2016; Statello et al., 2021). Por otro lado, las últimas evidencias señalan que, además de estar localizados en el núcleo y en el citoplasma, podrían localizarse en mitocondrias y en otros orgánulos como exosomas (Statello et al., 2021).

Se ha estimado que la cantidad de estos transcritos en el organismo supera al número de transcritos codificantes, hecho que refuerza la complejidad y la diversidad existente entre los organismos superiores, dado que esta no puede ser explicada únicamente con la diversidad de transcritos codificantes identificados (Quinn & Chang, 2016). Además, el número de RNAs largos identificados sigue al alza con la mejora de las técnicas de secuenciación de RNA y se han descrito diversos modos de actuación con los que estos transcritos regulan la expresión de otros elementos codificantes y no codificantes: promoción de la transcripción mediante la formación de un loop cromosómico, represión de la transcripción antisentido mediante impedimento estérico con la pol II o autoinhibición mediante la formación de un loop DNA-RNA entre otros mecanismos. Además, se ha establecido que estos transcritos son los únicos capaces de regular la expresión del propio locus genómico o regulación en cis, ya que otros elementos como los genes que codifican proteínas autorregulables, por ejemplo, los factores de transcripción, la proteína que lleva a cabo esta regulación se traduce y madura en un compartimento subcelular diferente, por lo que para llevar a cabo la regulación debe ser importada y difundida a su lugar de actuación (Quinn & Chang, 2016).

Se ha observado que la transcripción de los lncRNAs muestra un patrón de especificidad dependiente del tejido y del subtipo celular, por lo que tienen unas dianas específicas dentro de cada tejido e intervienen en procesos como el desarrollo embrionario temprano, la regulación transcripcional: tanto la represión como la promoción de la transcripción, la estructura y organización de los cromosomas, la compactación de la cromatina, el mantenimiento de los telómeros, la organización de los orgánulos celulares y el citoesqueleto, la regulación de los genes codificadores de proteínas adyacentes y su traducción y la compensación de dosis génica entre otros muchos mecanismos biológicos (**Figura 8**) (Bergmann et al., 2014; Statello et al., 2021), aunque cada día nuevas funciones son atribuidas a esta parte de RNAs no codificantes (Romero-Barrios et al., 2018). Por tanto, los long non-coding RNAs juegan un papel fundamental en la integridad del genoma, en la correcta regulación de la transcripción y en la estabilidad de los mRNAs, por lo que la variación en los niveles de expresión de estas moléculas puede ser un indicador de disfunción cada día más presente y estudiado en multitud de procesos biológicos y en enfermedades relacionadas con el envejecimiento como el cáncer, la senescencia (Wang et al., 2015) o las patologías cardiovasculares (Vausort et al., 2015).



**Figura 8: Estructura de Xist, long non-coding RNA implicado en la compensación de dosis génica, una de las múltiples funciones y mecanismos asociados a estos transcritos.** Figura extraída de Fang *et al.*, 2015.

## 5. Biomarcadores séricos de RCA

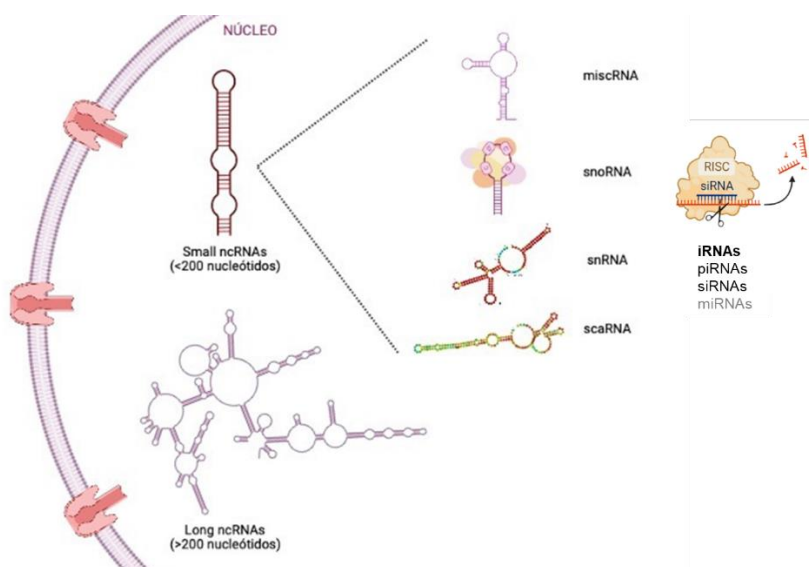
Uno de los retos de la medicina actual es identificar una molécula o un conjunto de moléculas con una precisión, especificidad y sensibilidad suficiente con el objetivo de poder predecir el riesgo de sufrir un evento patológico, para realizar un diagnóstico correcto o bien para estimar la progresión, el pronóstico o la supervivencia de una patología. Un biomarcador ideal, según la definición proporcionada por la *Food and Drug Administration* (FDA), es aquella molécula con características bioquímicas que se pueden medir, capaz de identificar procesos fisiológicos, patológicos o de respuesta farmacológica a un tratamiento administrado de una forma específica a una patología concreta, con una relación definida al grado de desarrollo de la enfermedad, sensible, rápida, económica y con una relevancia clínica demostrable (*FDA-NIH Biomarker Working Group, 2016*). Otras características que deben cumplir los biomarcadores es que sean estables tanto *in vitro* como *in vivo*, ser reproducibles, deben reflejar un cambio clínico y reversible, de forma que si se revierte el proceso fisiológico o patológico que predicen, el rango de valores del biomarcador refleje el cambio producido, además de que puedan ser detectados de una forma no invasiva para los pacientes (*Califf, 2018*). Debido a estos estrictos criterios, la búsqueda de moléculas predictoras es un proceso lento y arduo que comienza con una larga lista de potenciales biomarcadores y culmina, de media, con tan solo uno o dos candidatos validados después de un largo proceso.

Actualmente, para la monitorización no invasiva del RCA se han estudiado diversos biomarcadores de distinta naturaleza. Por ejemplo, el porcentaje de DNA libre derivado de células del donante (%ddcfDNA) proviene de la apoptosis de los miocitos del aloinjerto. Los miocitos dañados liberan el DNA a la circulación y mediante genotipado de polimorfismos únicos se cuantifica y se obtiene el porcentaje donante-receptor (*Agbor-Enoh et al., 2021*). Otros biomarcadores séricos estudiados son de origen proteico como la troponina cardíaca T y el extremo N-terminal del péptido natriurético, cuya detección en la circulación reflejan cambios en la estructura y en la función cardíaca (*Dyer et al., 2012*). SERCA2a es una ATPasa encargada del transporte del ion calcio desde el citosol hacia el interior del retículo sarcoplásmico, donde es utilizado por los miocitos durante la contracción muscular. Se ha observado un descenso de esta proteína en pacientes con rechazo cardíaco, convirtiéndose en un posible biomarcador para el diagnóstico del rechazo cardíaco (*Tarazón et al. 2017*). Otras proteínas alteradas en el suero

de pacientes trasplantados son CD5L, un antígeno de superficie expresado por los macrófagos que actúan inhibiendo la apoptosis de estas células inmunes, y el complejo transmembrana MCU, encargado del transporte de calcio citosólico al interior mitocondrial (Tarazón *et al.*, 2020; Tarazón *et al.*, 2021). Por otra parte, las vesículas extracelulares, entre las que se incluyen los exosomas y las vesículas apoptóticas, han ganado importancia en los últimos tiempos. Estos pequeños orgánulos juegan un papel imprescindible en la comunicación entre el organismo y el sistema inmune, interviniendo en procesos como la tolerancia o el rechazo frente a la exposición antígenos nuevos, claves en el proceso de RCA (Benichou *et al.*, 2020). Por último, se han estudiado los mRNAs y los RNAs no codificantes que intervienen en la regulación de otros mRNAs, centrándose en el estudio de miRNAs. En este grupo encontramos numerosas moléculas desreguladas en el rechazo cardíaco, como *miR-181a-3p* y *miR-144-3p* entre otras (Constanso-Conde *et al.*, 2021; Pérez-Carrillo *et al.*, 2022).

Además, se ha desarrollado AlloMap, un panel de expresión génica a partir de sangre periférica que incluye 20 genes seleccionados por su relación con el pronóstico del rechazo del aloinjerto. En este panel se emplea un algoritmo que pretende determinar, según una puntuación de 0 a 40, el riesgo de desarrollar rechazo. Las principales limitaciones que presenta el panel en la clínica es que se posee una mayor capacidad para descartar pacientes con bajo riesgo de rechazo (si la puntuación es baja se ha considerado razonable evitar BEM innecesarias) que para diagnosticar RCA si los valores son elevados (Crespo-Leiro *et al.*, 2016).

A pesar de haber identificado un número considerable de moléculas circulantes de distinta naturaleza para el diagnóstico no invasivo del RCA, estos no han sido aplicados a la clínica o su uso es limitado, bien porque se encuentran en fase de ensayo clínico o porque tienen limitaciones, por lo que la investigación para encontrar nuevas moléculas con una buena capacidad diagnóstica para la monitorización no invasiva del RCA continua. Por tanto, este estudio se centra en el estudio de las moléculas no codificantes circulantes cuyo papel en el rechazo cardíaco aún no ha sido investigado, por lo que se discute el potencial diagnóstico de los dos biotipos principales: long y los diferentes subgrupos descritos anteriormente de small non-coding RNAs (Figura 9).



**Figura 9: Clasificación de los RNAs no codificantes en dos biotipos principales: small non-coding RNAs y long non-coding RNAs.** Se muestra la subdivisión del primer biotipo en los diferentes subgrupos en los que se centra este estudio: RNAs misceláneos (miscRNAs), RNAs nucleolares (snoRNAs), RNAs nucleares (snRNAs), RNAs del cuerpo de Cajal (scaRNAs) y RNA de interferencia (iRNAs).

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las moléculas circulantes en el suero de los pacientes han tomado una gran relevancia clínica con el auge de la secuenciación y de las ciencias ómicas, cobrando una gran importancia como biomarcadores de inicio, progresión, pronóstico o diagnóstico de diversas patologías. Dentro de estas moléculas circulantes se encuentran los RNAs no codificantes, un campo recientemente descubierto con un elevado potencial biomédico.

Por otro lado, las causas subyacentes al RCA del trasplante son aún poco conocidas, por lo que el tratamiento de la patología se centra en el aumento de los inmunosupresores, con los efectos negativos que estos conllevan para los pacientes. A este hecho, se añaden las limitaciones técnicas que presenta el método *gold standard* para la detección del RCA, el error de muestreo por la heterogeneidad histológica de las muestras y la variabilidad interobservador, y las complicaciones derivadas de la biopsia. Derivado de esta situación, surgen dos necesidades correlacionadas: la necesidad de esclarecer las causas del inicio del rechazo celular del aloinjerto explorando los mecanismos moleculares subyacentes a su progresión y la necesidad de un método de diagnóstico del RCA no invasivo que sea preciso, fiable y reproducible.

Es por ello que, combinando ambas necesidades, se analizan las muestras histológicas y séricas de pacientes sometidos a trasplante cardíaco en el Hospital Politécnico la Fe de Valencia con el fin de alcanzar los siguientes objetivos:

1. Detección y clasificación de los diferentes biotipos de RNAs no codificantes detectados en el suero de los pacientes trasplantados mediante RNA-seq.
2. Análisis de la expresión diferencial de los RNAs no codificantes circulantes en pacientes con RCA.
3. Evaluación de la capacidad diagnóstica de los RNAs no codificantes presentes en el suero de los pacientes como potenciales biomarcadores para la detección no invasiva del rechazo celular leve (grado 1R) o moderado/grave (grado  $\geq 2R$ ).
4. Estudio de la implicación con el sistema cardiovascular que presenten aquellos transcritos circulantes alterados en el RCA.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Inclusión de muestras

En este estudio se han incluido muestras de suero procedentes de pacientes sometidos a trasplante cardíaco (> 18 años) que fueron remitidos para la realización de una BEM como cribado rutinario programado. Las muestras séricas y los datos clínicos asociados se han recogido en las visitas de seguimiento realizadas en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe. En el momento de la BEM, se recogieron muestras de sangre para su análisis en el laboratorio. El suero se separó por centrifugación a 1500g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, se realizaron alícuotas de la fase superior y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta el análisis de secuenciación. Se incluyeron un total de 40 muestras, de las cuales 28 tenían un diagnóstico de rechazo del aloinjerto probado por biopsia: 16 tenían un diagnóstico de rechazo celular leve (Grado 1R), 12 tenían rechazo celular moderado/grave (Grado 2R, n=11; Grado 3R, n=1). Estas muestras se compararon con 12 muestras que no experimentaron rechazo del aloinjerto (Grado 0R).

Los pacientes se mantuvieron en un régimen de inmunosupresión estándar, y los episodios de rechazo se evaluaron según el informe de consenso de la ISHLT. La histología de las biopsias endocárdicas fue evaluada por un patólogo experto, ciego a la información clínica. Para cada muestra, se registró la edad, el sexo, el índice de masa corporal, la cardiopatía primaria, el intervalo de tiempo transcurrido entre el trasplante y la inclusión en el estudio, los marcadores bioquímicos, los parámetros ecocardiográficos y otras características clínicas en el momento de cada biopsia. Los investigadores fueron ciegos a la asignación de grupos, para todos los experimentos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética (Comité de Ética de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, España) y se llevó a cabo de acuerdo con los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Antes de la recogida de muestras, se obtuvo un consentimiento informado de cada paciente.

#### 2. Secuenciación del RNA no codificante

La extracción de RNA se llevó a cabo utilizando el kit NucleoSpin® miRNA Plasma de Macherey Nagel (Dürer, Alemania), siguiendo el protocolo y las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La cuantificación del RNA se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 y el fluorímetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.). La pureza y la integridad de las muestras de RNA se determinaron utilizando el kit RNA 6000 Nano y el kit Small RNA con gel de agarosa al 0,8% y el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies CA, EE. UU.). Los RNAs extraídos sólo se consideraron muestras válidas con una relación de absorbancia 260/280 superior a 2,0 y un número de integridad del RNA (algoritmo del software RIN)  $\geq 7$ .

Las librerías de cDNA se obtuvieron siguiendo las recomendaciones de Illumina. Los adaptadores 3' y 5' se ligaron secuencialmente al RNA antes de la transcripción inversa y la síntesis del ADNc. La selección de tamaño se realizó utilizando un gel de poliacrilamida al 6%. La calidad y la cantidad de las librerías de cDNA se analizaron utilizando el ensayo de alta sensibilidad D1000 ScreenTape y el sistema 4200 TapeStation (Agilent Technologies, CA, EE.UU.). A continuación, se agruparon las librerías de cDNA y se secuenciaron mediante dos carriles de secuenciación *paired-end* de 100 pb utilizando un secuenciador Illumina HiSeq 2500. El control de calidad de

los datos de la secuencia en bruto se realizó con el software FastQC. El sesgo se evitó mediante la identificación y eliminación de adaptadores utilizando Trim Galore [[http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)]. A continuación, las lecturas crudas *paired-end* se mapearon contra la última versión del genoma humano hg38 utilizando el algoritmo *bowtie* (Langmead et al., 2009). Después, las lecturas mapeadas de calidad insuficiente, utilizando como umbral de calidad de mapeo la puntuación phred  $\leq 20$ , se eliminaron mediante el método SAMtools (Li et al., 2009).

Por último, el análisis de la expresión diferencial entre condiciones se evaluó mediante el método DESeq2 (versión 3.4) (Love et al., 2014). El método de la tasa de falsos descubrimientos (FDR) ajusta el valor p original utilizando el número de pruebas. Una interpretación de este método se implementa en DESeq2 en la que los genes se clasifican en función del valor p y luego se multiplican por un valor de rango de corrección, similar al método FDR original. Se incluyeron los RNA expresados diferencialmente con valores de p valor  $\leq 0,05$  ajustados por FDR para evitar la identificación de falsos positivos en los datos de expresión diferencial (Love et al., 2014). Las variables se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (DE).

### 3. Análisis estadístico

Las características clínicas de los pacientes incluidos se expresaron como media  $\pm$  DE para las variables continuas y porcentajes para las variables discretas. En los resultados de la secuenciación de RNA se evaluó la normalidad de la expresión de cada variable mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas que no seguían una distribución normal se compararon mediante la prueba de Mann-Whitney. Las variables continuas con una distribución normal se compararon mediante la prueba t de Student. Los resultados de la secuenciación se representaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). La capacidad diagnóstica de los marcadores séricos para la presencia de rechazo del trasplante se evaluó mediante la construcción de curvas de características operativas del receptor (ROC). Se obtuvo la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de los transcritos seleccionados. Una  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativa. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS (versión 20.0; SPSS Inc.).

### 4. Criterios de selección de los transcritos alterados

Para la selección de los transcritos candidatos se han establecido una serie de criterios: (1) expresión diferencial con fold change  $\pm 1,5$ , (2) área bajo la curva (AUC) en grado  $\geq 2R \geq 0,900$  y (3) AUC en Grado 1R significativa sin considerar el valor de la AUC. De este modo, se ha conseguido seleccionar aquellos transcritos más relevantes para el diagnóstico no invasivo del rechazo cardíaco moderado/grave, además de aquellos que son también capaces de detectar el rechazo cardíaco en el grado más leve.

Para la representación de las curvas ROC, se han ordenado los transcritos seleccionados según su especificidad y sensibilidad. Se ha establecido un corte, por lo que se han representado aquellos transcritos que muestran simultáneamente una sensibilidad y especificidad  $\geq 80\%$  en el diagnóstico de RCA moderado/grave y los transcritos que muestran una sensibilidad y especificidad  $\geq 60\%$  tanto en el diagnóstico de RCA leve como moderado/grave. Los transcritos seleccionados se representan como AUC  $\pm$  SEM.

## IV. RESULTADOS

### 1. Características clínicas de los pacientes

Se obtuvo una muestra de sangre de los pacientes incluidos en el estudio en el momento de la realización de una BEM programada dentro de la monitorización del rechazo cardíaco. Además, se obtuvieron parámetros ecocardiográficos, hemodinámicos, farmacológicos y bioquímicos de los pacientes que se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes presentadas en el momento de la BEM y de la extracción sanguínea.

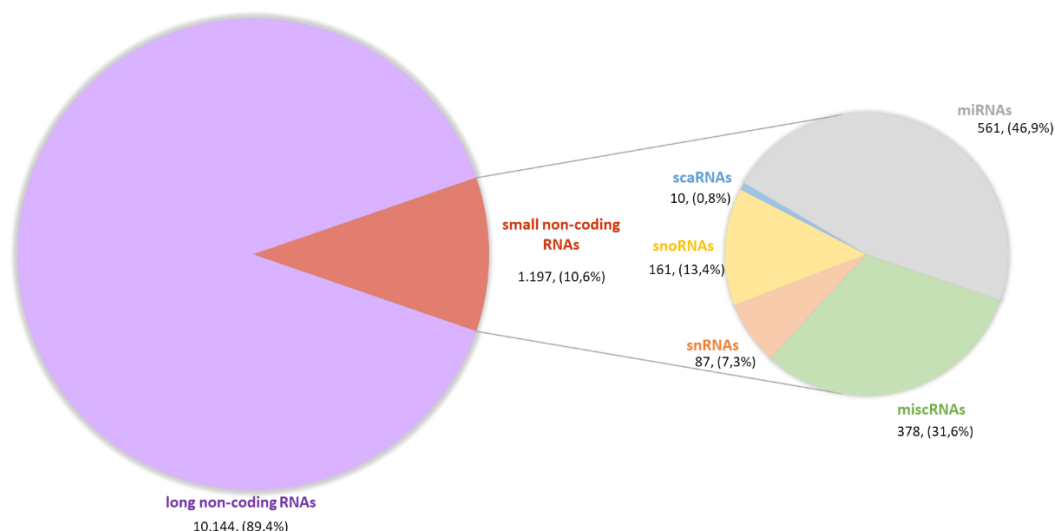
Características	sin RCA n = 12	con RCA (n = 28)		
		RCA (1R) n= 16	RCA (≥2R) n=12	p valor (*)
Edad (años)	48 ± 15	51 ± 10	42 ± 15	0,328
Sexo masculino (%)	75	94	75	1,000
Indicación para el trasplante cardíaco				
Cardiomiopatía isquémica (%)	25	50	25	1,000
Cardiomiopatía dilatada idiopática (%)	42	31	58	0,684
Otros (%)	33	19	17	0,320
Tiempo entre el TC y la incorporación al estudio (meses)	8,1 ± 3,8	6,4 ± 3,2	3,8 ± 4,2	<b>0,019</b>
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	25 ± 5	25 ± 3	24 ± 3	0,615
Hipertensión (%)	58	31	42	0,684
Diabetes mellitus (%)	58	63	50	0,930
Dislipemia (%)	42	56	25	0,667
Estudio Eco-Doppler				
Fracción de eyección (%)	60 ± 8	64 ± 9	70 ± 10	0,826
Diámetro sistólico final del VI (mm)	25 ± 3	28 ± 4	31 ± 3	<b>0,019</b>
Diámetro diastólico final del VI (mm)	41 ± 3	44 ± 5	45 ± 4	0,133
Parámetros hemodinámicos				
Presión media de la AD (mmHg)	3,6 ± 1,8	5,9 ± 3,2	7,7 ± 1,5	0,018
Presión sistólica del VD (mmHg)	33 ± 5	36 ± 7	42 ± 4	<b>0,037</b>
Presión diastólica del VD (mmHg)	4,2 ± 1,6	5,9 ± 3,3	8,7 ± 3,8	0,054
Terapia inmunosupresora				
Tacrólimus (%)	100	100	100	1,000
Ácido micofenólico (%)	100	95	100	1,000
Esteroides (%)	100	95	100	1,000
Terapia de inducción				
Basiliximab (%)	100	100	100	1,000
Neutrófilos (miles/mm <sup>3</sup> )	4,8 ± 4,1	3,7 ± 1,7	8,2 ± 6,3	0,158
Leucocitos (miles/mm <sup>3</sup> )	7,1 ± 3,8	6,2 ± 2,1	11,0 ± 6,3	0,087
Linfocitos (miles/mm <sup>3</sup> )	1,5 ± 0,5	1,8 ± 0,6	2,0 ± 0,8	0,075
Hemoglobina (mg/dL)	11,6 ± 2,4	12,6 ± 1,4	11,9 ± 1,7	0,752
Hematócrito (%)	37 ± 8	40 ± 4	37 ± 4	0,923
NT-proBNP (pg/mL)	152 (113-467)	280 (122-572)	1209 (736-2382)	<b>0,016</b>
Troponina T (ng/L)	19 (11-66)	15 (10-21)	25 (13-40)	0,840

BEM: Biopsia endomiocárdica; RCA: Rechazo celular agudo; VI: Ventrículo izquierdo; VD: Ventrículo derecho; AD: Aurícula derecha; NT-proBNP: fragmento N-terminal del péptido natriurético tipo B; TC: trasplante de corazón.  
(\*): sin RCA diagnosticado vs RCA ≥ 2R.

### 2. Selección de los non-coding RNAs identificados en la secuenciación

Se detectaron un total de 11.341 moléculas de los dos biotipos principales, long y small non-coding RNA. El grupo mayoritario está compuesto por el biotipo long non-coding RNA, siendo el 90% de los transcritos detectados, mientras que los RNAs pequeños componen aproximadamente el 10% de las moléculas detectadas. Debido a que este estudio se centra en los RNAs no codificantes cuya función está menos investigada y a que la alteración de los miRNAs en el rechazo cardíaco ya ha sido estudiada anteriormente por el grupo de Disfunción Miocárdica y Trasplante cardíaco (*Pérez-Carillo et al., 2022*), estos no aparecen en los resultados

del análisis de la expresión. Tampoco forman parte del estudio los piRNAs ni los siRNAs, ya que el análisis de RNA-seq no detectó ninguna molécula de estos biotipos. De los biotipos de small non-coding RNAs en los nos centramos, los RNAs misceláneos son el subgrupo más abundante (31,6%), seguido de los RNAs nucleolares (13,4%), los RNAs nucleares (7,3%) y, por último, de los RNAs del cuerpo de Cajal (0,8%) (**Figura 10**).



**Figura 10:** Proporción de cada uno de los transcritos no codificantes detectados en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco: los dos biotipos principales (long non-coding RNA y small non-coding RNA) y los diferentes subgrupos de estudio.

Se analizó la expresión de todas las moléculas no codificantes detectadas, identificando aquellos transcritos no codificantes que muestran un cambio estadísticamente significativo en uno o en ambos grados de rechazo cardíaco. Los resultados del análisis de expresión comprenden un total de 41 small non-coding RNAs y 516 long non-coding RNAs alterados, mostrados en el **anexo I** y el **anexo II** de este trabajo, respectivamente.

A continuación, se construyeron las curvas ROC de aquellos transcritos cuya expresión se encuentra alterada con un fold change  $\pm 1,5$ . Las curvas ROC del grado 1R y del Grado  $\geq 2R$  se muestran en los anexos de este trabajo: las curvas ROC de los RNAs no codificantes cortos se muestran en el **anexo I** y las curvas ROC de los long non-coding RNAs, en el **II**. De todas estas moléculas, 107 long non-coding RNAs y 5 miscRNAs cumplen con los criterios establecidos en el apartado de material y métodos. La **Tabla 2** muestra el diagrama de flujo llevado a cabo para la selección de los RNAs más relevantes con capacidad diagnóstica del RCA de Grado 2R y de aquellos que además son capaces de detectar el Grado 1R.

Tabla 2. Análisis de la expresión de los non-coding RNAs para el diagnóstico no invasivo del rechazo cardíaco.

	long non-coding RNAs	small non-coding RNAs				
		snc TOTAL	miscRNAs	snRNAs	snoRNAs	scaRNAs
◦ Detectados	10 144	636	378	87	161	10
◦ Diferencialmente expresados (RCA $\geq$ 2R vs 0R)	516	41	27	5	9	0
◦ FC $\pm$ 1,5	244	31	22	4	5	0
◦ Cumplen los criterios: AUC ( $\geq$ 2R) $\geq$ 0,9 + [AUC ( $\geq$ 2R) $\geq$ 0,8 y AUC (1R) significativa]	107	5	5	0	0	0

Esquema de la selección de los transcritos no codificantes detectados en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco con capacidad diagnóstica de RCA, donde se muestra el número de transcritos que superan el filtro de fold change y los criterios de selección establecidos.

A diferencia del resto de subclases de RNAs no codificantes, los Y-RNA pertenecientes al grupo de RNAs misceláneos no tienen una nomenclatura que nos permita diferenciar cada uno de ellos. En el estudio de RNA-seq se detectaron 173 Y-RNA, de los cuales 13 presentaban una expresión diferencial en el rechazo del órgano trasplantado. Con el objetivo de poder diferenciar en los siguientes apartados estos Y-RNA misceláneos, se ha creado una tabla dónde cada molécula lleva asignado un número del 1 al 13 según el orden que ocupan de menor a mayor nivel de expresión media y su correspondiente código Ensembl para su correcta identificación (**Tabla 3**).

Tabla 3. Código de indentificación de los Y-RNAs misceláneos

small miscellaneous non-coding RNA	CÓDIGO ENSEMBL
Y_RNA[1]	ENSG00000201218
Y_RNA[2]	ENSG00000201432
Y_RNA[3]	ENSG00000201370
Y_RNA[4]	ENSG00000206911
Y_RNA[5]	ENSG00000283691
Y_RNA[6]	ENSG00000207032
Y_RNA[7]	ENSG00000199884
Y_RNA[8]	ENSG00000223302
Y_RNA[9]	ENSG00000199676
Y_RNA[10]	ENSG00000201724
Y_RNA[11]	ENSG00000202273
Y_RNA[12]	ENSG00000201483
Y_RNA[13]	ENSG00000265961

Small non-coding Y-RNAs presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco ordenados de manera ascendente según su nivel de expresión media medido en UA (Unidades Arbitrarias), de manera que [1] está asignado al Y-RNA con un nivel de expresión inferior y [13] está asignado al Y-RNA con un nivel de expresión mayor.

### 3. Expresión de non-coding RNAs alterados en el suero de pacientes trasplantados.

El análisis de la expresión de los non-coding RNAs incluye 5 small non-coding RNAs cuya expresión se encuentra alterada en el rechazo cardíaco (3 RNAs solo en moderado/grave y 2 RNAs distinguen también el rechazo leve) en comparación con los pacientes sin rechazo cardíaco diagnosticado y 107 long non-coding RNAs cuya expresión varía significativamente a través de los diferentes grados del rechazo cardíaco.

#### 3.1 Small non-coding RNAs

El grupo de small non-coding RNAs se subdivide en diferentes subgrupos según el biotipo y la localización subcelular de las diferentes moléculas: RNA misceláneo, RNA nuclear, RNA nucleolar o RNA perteneciente a los cuerpos de Cajal. Cabe destacar es que no se ha encontrado ninguna molécula perteneciente al RNA de cuerpos de Cajal cuya expresión se haya visto alterada en el rechazo cardíaco.

Todas las moléculas que cumplen los criterios previamente mencionados forman parte de los small RNAs misceláneos, el grupo más heterogéneo y numeroso formado por aquellos RNAs que no encajan en los otros biotipos. En la **Figura 11**, se representan gráficamente los 5 RNAs alterados entre pacientes sin rechazo cardíaco y rechazo cardíaco leve o moderado/grave:

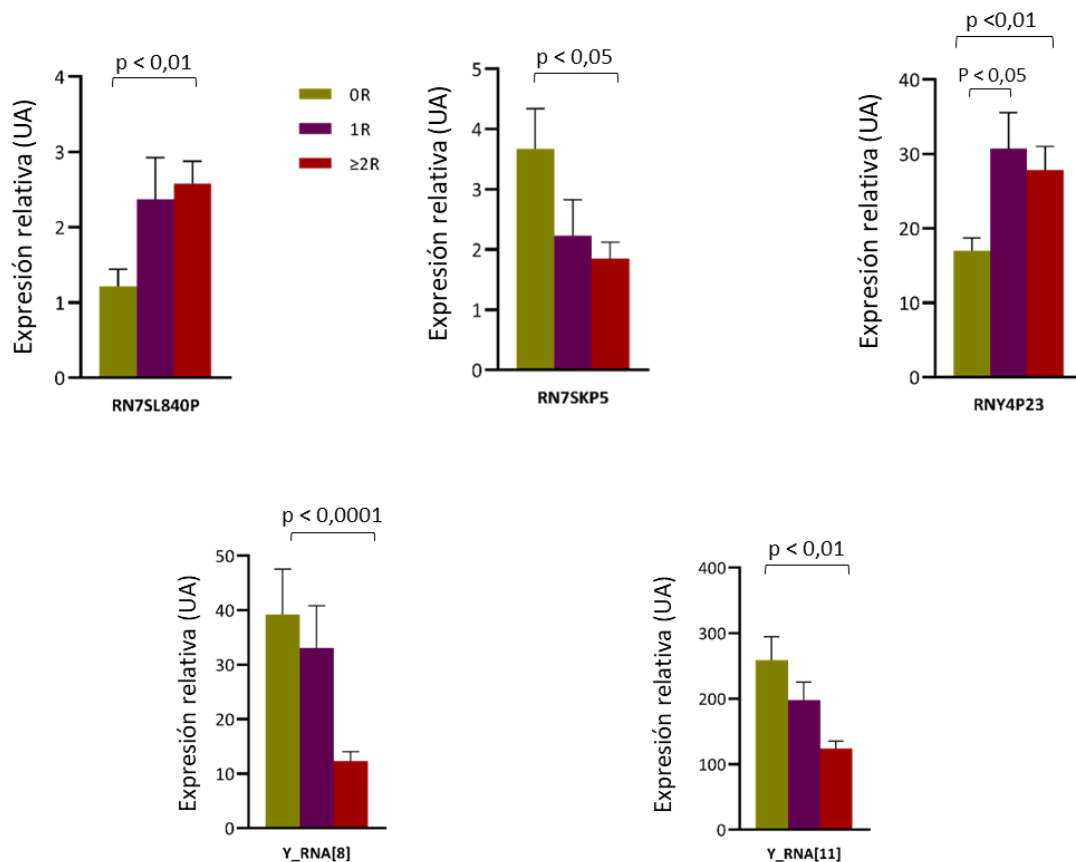
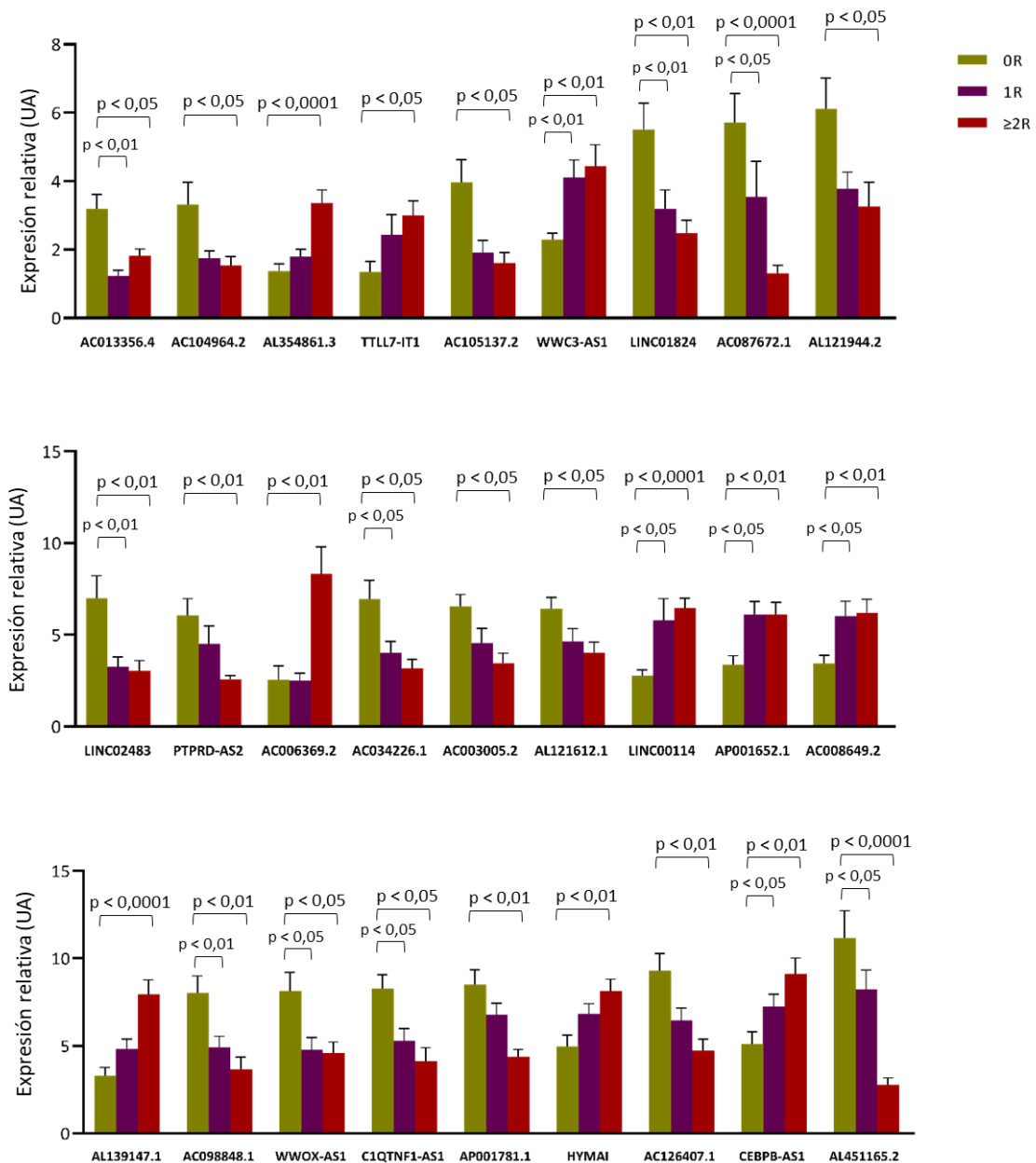


Figura 11: Expresión de small miscellaneous non-coding RNAs (miscRNAs) presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco alterados en comparación con el grupo sin rechazo cardíaco (OR). Medido en unidades arbitrarias (UA).

### 3.2 Long non-coding RNAs

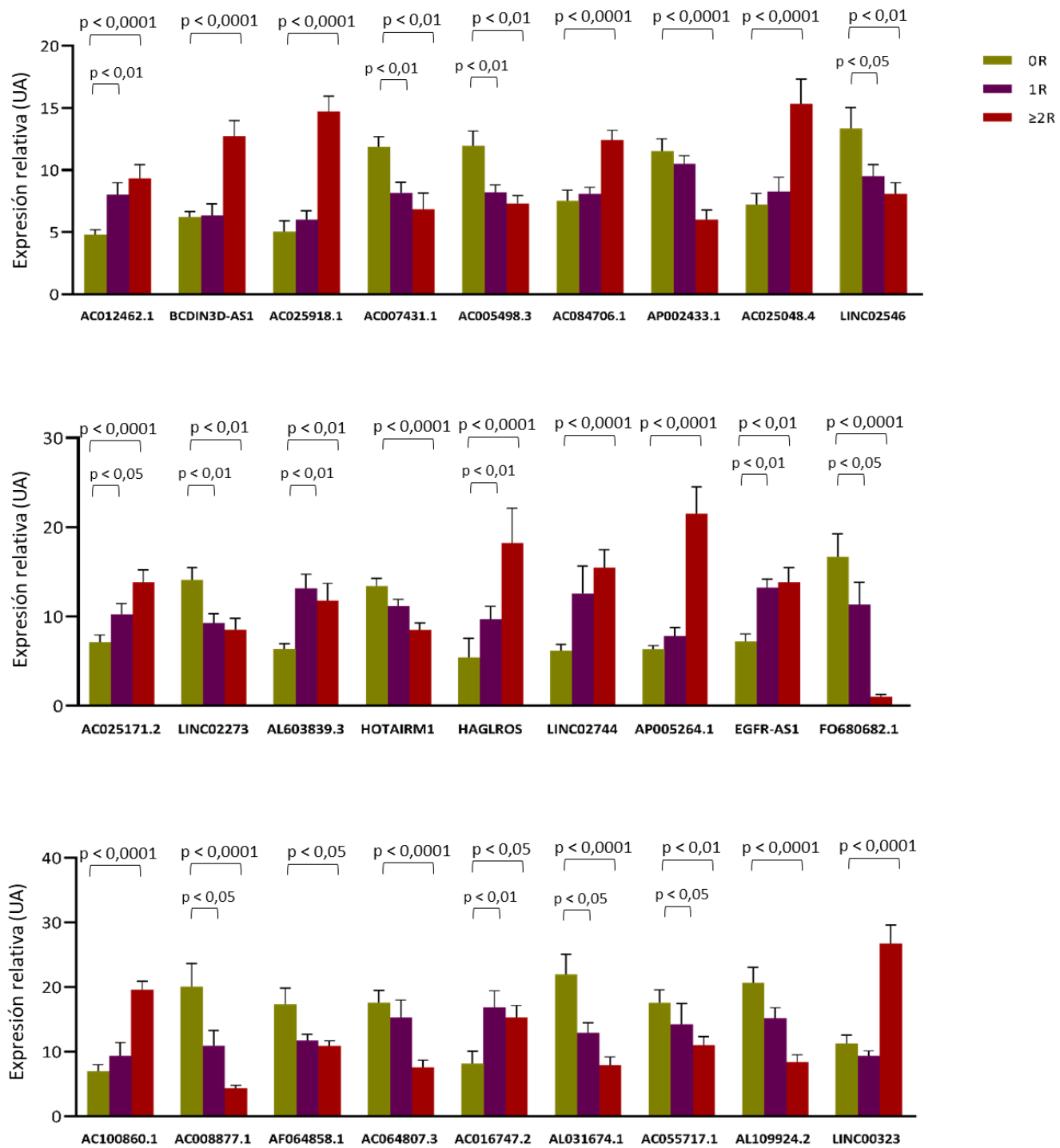
El grupo de long non-coding RNAs, está compuesto por un total de 516 potenciales biomarcadores séricos que se expresan diferencialmente entre los diferentes grupos de estudio, de los cuales 107 cumplen con los criterios establecidos anteriormente. Dado que no existe una clasificación consensuada, se ha realizado una agrupación de las moléculas por su expresión media relativa en cinco grupos: (1) entre 0 y 7,5 UA, (2) entre 7,5 y 20 UA, (3) entre 20 y 50 UA, (4) entre 50 y 500 UA y (5)  $\geq 500$  UA; para una mejor organización y discusión posterior de los resultados.

De esta manera, la **Figura 12** muestra cómo varía la expresión de las 27 moléculas que conforman el primer grupo de long non-coding RNAs con expresión inferior a 7,5 UA en los diferentes grados de rechazo cardíaco:



**Figura 12:** Expresión relativa de los long non-coding RNAs presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco con un nivel de expresión medio medido en UA inferior a 7,5, alterados en comparación al grupo sin rechazo cardíaco (0R).

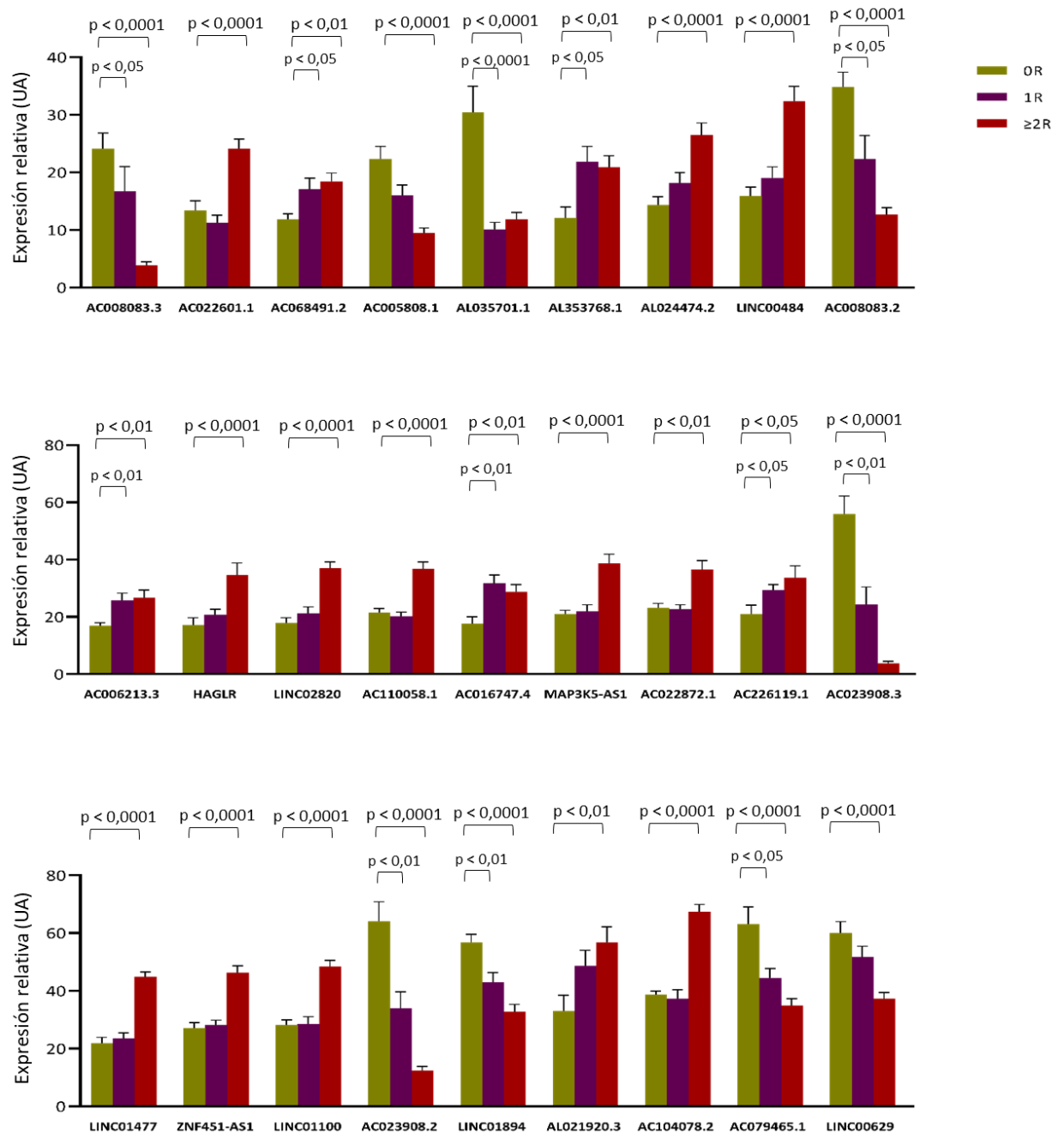
La **Figura 13** comprende los 27 long non-coding RNAs cuya expresión media relativa se sitúa entre 7,5 y 20 UA.



**Figura 13:** Expresión relativa de los long non-coding RNAs presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco con un nivel de expresión medio medido entre [7,5 - 20] UA, alterados en comparación al grupo sin rechazo cardíaco (0R).

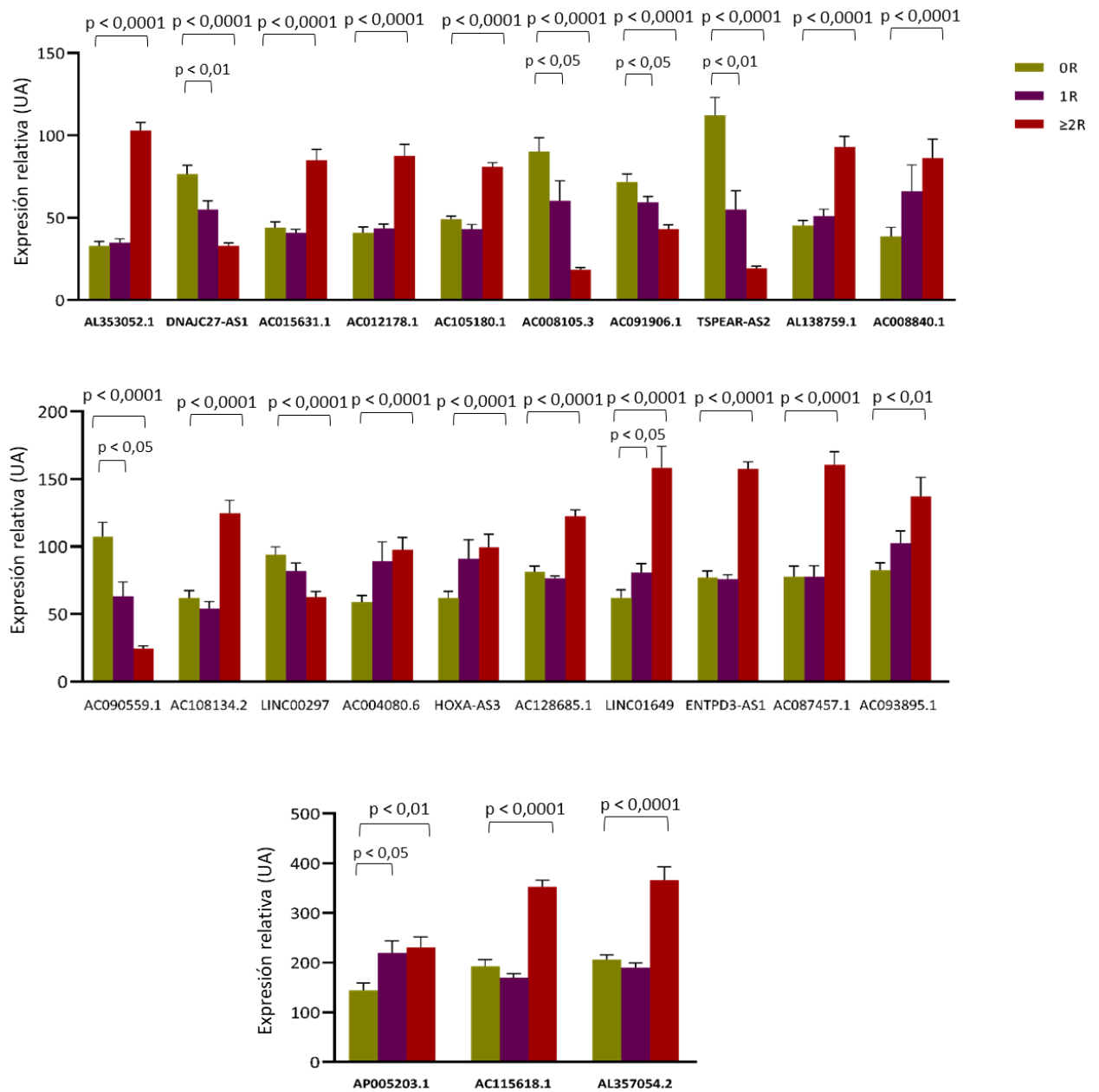


El tercer grupo, cuya expresión media relativa se sitúa entre 20 y 50 UA, está compuesto por otros 27 transcritos (**Figura 14**).



**Figura 14:** Expresión relativa de los long non-coding RNAs presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco con un nivel de expresión medio medido entre [20-50] UA, alterados en comparación al grupo sin rechazo cardíaco (OR).

En la **Figura 15**, se muestran los long non-coding RNAs con expresión relativa entre 50 UA y 500 UA. Este grupo está compuesto por 23 moléculas diferencialmente expresadas entre el grupo sin rechazo cardíaco y el grupo con rechazo cardíaco clínicamente relevante:



**Figura 15:** Expresión relativa de los long non-coding RNAs presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco con un nivel de expresión medio medido en UA entre 50 y 500, alterados en comparación al grupo sin rechazo cardíaco (0R).

Por último, el quinto grupo de long non-coding RNAs con expresión superior a 500UA (**Figura 16**) está compuesto por 3 RNAs diferencialmente expresados entre el grupo sin rechazo cardíaco y el grupo con rechazo cardíaco leve y/o moderado-grave.

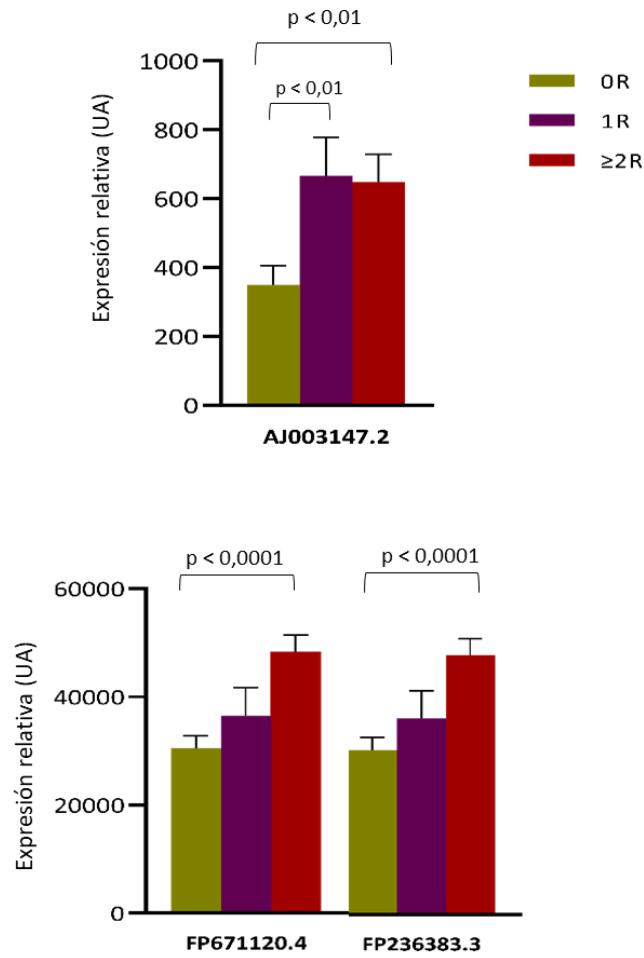


Figura 16: Expresión relativa de los long non-coding RNAs presentes en el suero de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco con un nivel de expresión medio medido en UA superior a 500, alterados en comparación al grupo sin rechazo cardíaco (0R).

#### 4. Capacidad diagnóstica de los non-coding RNAs alterados en RCA

Después de analizar la expresión génica de ambos grupos de RNAs no codificantes, se analizó la capacidad de detectar rechazo cardíaco mediante la construcción de las respectivas curvas ROC de todas las moléculas que presentaban una expresión en suero significativamente alterada con *fold change*  $\pm 1,5$  respecto del grupo sin rechazo cardíaco, 41 small non-coding RNAs y 516 long non-coding RNAs.

En primer lugar, cumpliendo con el objetivo de encontrar un potencial biomarcador sérico con la capacidad de diagnosticar el rechazo cardíaco moderado/grave ( $\geq 2R$ ), se han obtenido las curvas ROC de la comparación de los grados RCA  $\geq 2R$  vs OR, y los valores de sensibilidad y especificidad de todos los transcritos, obteniéndose un total de 34 small non-coding RNAs y 506 long non-coding RNAs con una AUC significativa (**Anexo I y Anexo II**).

Posteriormente, se ha calculado los valores correspondientes a las curvas ROC, la sensibilidad y la especificidad del rechazo cardíaco leve (1R), comparando los grupos de RCA 1R vs OR solamente de aquellos RNAs que tenían una AUC significativa en el rechazo cardíaco moderado/grave, obteniéndose 3 small non-coding RNAs y 123 long non-coding RNAs con una AUC significativa en el rechazo cardíaco leve (1R) (**Anexo I y Anexo II**).

En el grupo de small non-coding RNAs, 5 moléculas cumplen con los criterios establecidos y se muestran en la **Tabla 4**. Mientras que en el grupo de long non-coding RNA son 107 las moléculas que cumplen con estos criterios como puede observarse en la **Tabla 5** y la **Tabla 6**.

Tabla 4. Small non-coding RNAs potenciales biomarcadores séricos para el diagnóstico no invasivo del rechazo cardíaco

sncRNA	CURVAS ROC $\geq 2R$ vs OR				CURVAS ROC 1R vs OR			
	AUC	p VALOR	SE (%)	ES (%)	AUC	p VALOR	SE (%)	ES (%)
RN7SL840P	0,938	0,007	100,0	87,5	0,739	0,083	-	-
Y_RNA [8]	0,931	0,000	100,0	16,7	0,639	0,223	-	-
Y_RNA [11]	0,903	0,001	100,0	8,3	0,635	0,227	-	-
RNY4P23	0,812	0,009	50,0	91,7	0,740	0,033	56,3	91,7
RN7SKP5	0,806	0,034	100,0	25,0	0,781	0,037	91,7	25,0

Small non-coding RNAs presentes en el suero de pacientes trasplantados cuya expresión está alterada entre los grados de RCA leve y/o moderado/grave y el grupo sin rechazo cardíaco. Se muestran los valores obtenidos al calcular sus respectivas curvas de características operativas del receptor (ROC), que incluyen el área bajo la curva (AUC), el p valor de la curva ROC, la sensibilidad (SE) y la especificidad (ES).

Se ha realizado una subdivisión del grupo de long non-coding RNAs según si los transcritos muestran *in silico* una capacidad para distinguir entre los diferentes grados de RCA del grupo sin rechazo cardíaco (**Tabla 5**) o solo son capaces de diferenciar el rechazo moderado/grave de aquellos que no experimentan rechazo (**Tabla 6**).

Tabla 5. Long non-coding RNAs potenciales biomarcadores séricos para el diagnóstico no invasivo del RCA moderado/grave y leve

lncRNA	CURVAS ROC $\geq 2R$ vs OR				CURVAS ROC 1R vs OR			
	AUC	p VALOR	SE (%)	ES (%)	AUC	p VALOR	SE (%)	ES (%)
TSPEAR-AS2	1,000	0,000	100,0	8,3	0,844	0,002	100,0	8,3
AC023908.3	1,000	0,000	100,0	8,3	0,828	0,003	100,0	8,3
AC008877.1	1,000	0,000	100,0	8,3	0,745	0,029	93,8	8,3
AC008105.3	1,000	0,000	100,0	0,0	0,724	0,046	93,8	0,0
AC023908.2	0,993	0,000	100,0	8,3	0,833	0,003	100,0	8,3
DNAJC27-AS1	0,993	0,000	100,0	0,0	0,802	0,007	100,0	0,0
AC090559.1	0,986	0,000	100,0	0,0	0,781	0,012	100,0	8,3
LINC01649	0,986	0,000	83,3	91,7	0,740	0,033	25,0	91,7
AC008083.2	0,979	0,000	100,0	0,0	0,766	0,018	93,8	0,0
LINC01894	0,938	0,000	100,0	0,0	0,807	0,006	100,0	0,0
AC091906.1	0,931	0,000	100,0	0,0	0,740	0,033	100,0	0,0
AC012462.1	0,917	0,001	66,7	100,0	0,799	0,015	56,3	100,0
AL035701.1	0,910	0,001	100,0	16,7	0,928	0,000	100,0	16,7
AC079465.1	0,910	0,001	100,0	8,3	0,781	0,012	100,0	8,3
AL031674.1	0,910	0,001	100,0	16,7	0,771	0,016	100,0	16,7
AC105137.2	0,903	0,005	100,0	11,1	0,838	0,008	100,0	11,1
AC068491.2	0,882	0,001	50,0	91,7	0,776	0,014	31,3	91,7
HAGLROS	0,875	0,003	75,0	90,0	0,847	0,004	33,3	90,0
EGFR-AS1	0,871	0,003	75,0	100,0	0,921	0,000	66,7	100,0
C1QTNF1-AS1	0,871	0,003	100,0	9,1	0,782	0,016	100,0	9,1
AC008649.2	0,867	0,004	66,7	90,0	0,807	0,011	60,0	90,0
HYMAI	0,864	0,003	41,7	90,9	0,745	0,036	33,3	90,9
AC104964.2	0,860	0,007	100,0	10,0	0,829	0,007	100,0	10,0
AC126407.1	0,860	0,004	100,0	0,0	0,750	0,030	100,0	0,0
AC003005.2	0,856	0,004	100,0	9,1	0,776	0,022	92,3	9,1
AC034226.1	0,856	0,004	100,0	9,1	0,755	0,034	100,0	9,1
AL603839.3	0,848	0,005	66,7	90,9	0,867	0,002	60,0	90,9
AP001652.1	0,848	0,005	58,3	90,9	0,855	0,002	60,0	90,9
WWOX-AS1	0,848	0,005	100,0	9,1	0,836	0,004	100,0	9,1
AC006213.3	0,848	0,005	41,7	100,0	0,767	0,020	43,8	100,0
CEBPB-AS1	0,848	0,005	75,0	81,8	0,733	0,043	37,5	81,8
LINC02483	0,840	0,005	100,0	8,3	0,846	0,003	100,0	8,3
AC098848.1	0,840	0,005	50,0	91,7	0,778	0,015	43,8	91,7
AP005203.1	0,840	0,005	100,0	8,3	0,776	0,014	100,0	8,3
AC007431.1	0,833	0,007	100,0	0,0	0,817	0,005	100,0	0,0
AJ003147.2	0,833	0,006	58,3	83,3	0,797	0,008	56,3	83,3
AF064858.1	0,833	0,007	100,0	9,1	0,778	0,016	100,0	9,1
AC016747.2	0,833	0,006	66,7	83,3	0,771	0,016	50,0	83,3
LINC01824	0,833	0,007	100,0	16,7	0,762	0,024	92,9	16,7
AC016747.4	0,826	0,007	58,3	91,7	0,885	0,001	56,3	91,7
LINC02273	0,826	0,007	100,0	8,3	0,778	0,015	100,0	8,3
AL021920.3	0,826	0,007	66,7	91,7	0,740	0,033	37,5	83,3
AC013356.4	0,822	0,018	100,0	10,0	0,910	0,002	100,0	10,0
LINC02546	0,819	0,008	100,0	8,3	0,744	0,032	100,0	8,3
AL353768.1	0,818	0,010	41,7	81,8	0,806	0,009	53,3	72,7
AL121612.1	0,810	0,014	100,0	0,0	0,764	0,024	100,0	9,1
WWC3-AS1	0,808	0,015	66,7	100,0	0,773	0,023	53,3	90,0
AC226119.1	0,806	0,011	33,3	91,7	0,771	0,016	37,5	91,7
AC005498.3	0,806	0,011	100,0	0,0	0,767	0,019	100,0	0,0
AC055717.1	0,806	0,011	100,0	16,7	0,740	0,033	93,8	16,7
AL121944.2	0,802	0,017	100,0	18,2	0,739	0,040	100,0	18,2

Long non-coding RNAs presentes en el suero de pacientes trasplantados cuya expresión está alterada entre los grados de rechazo celular agudo (RCA) leve, moderado/grave y sin rechazo cardíaco. Se muestran los valores obtenidos al calcular sus respectivas curvas de características operativas del receptor (ROC), que incluyen el área bajo la curva (AUC), el p valor de la curva ROC, la sensibilidad (SE) y la especificidad (ES).

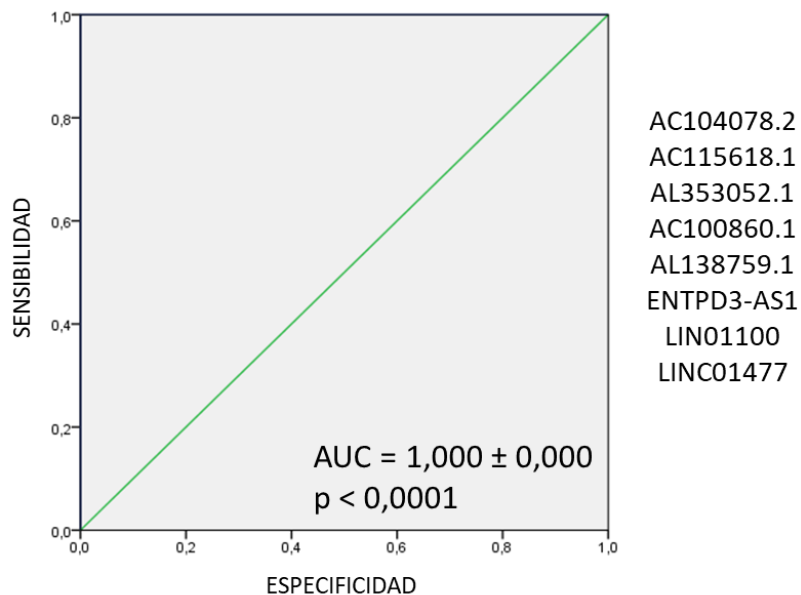
Tabla 4. Long non-coding RNAs potenciales biomarcadores séricos para el diagnóstico no invasivo del rechazo cardíaco moderado/grave

lncRNA	CURVAS ROC $\geq 2R$ vs OR				CURVAS ROC 1R vs OR	
	AUC	p VALOR	SE (%)	ES (%)	AUC	p VALOR
AC087672.1	1,000	0,001	100,0	18,2	0,744	0,053
AC008083.3	1,000	0,000	100,0	0,0	0,696	0,090
AC104078.2	1,000	0,000	83,3	100,0	0,688	0,095
FO680682.1	1,000	0,002	100,0	16,7	0,688	0,119
AC105180.1	1,000	0,000	75,0	100,0	0,661	0,150
AC115618.1	1,000	0,000	83,3	100,0	0,641	0,210
AL357054.2	1,000	0,000	75,0	100,0	0,635	0,227
AL451165.2	1,000	0,000	100,0	8,3	0,607	0,355
AL353052.1	1,000	0,000	100,0	100,0	0,599	0,378
AC100860.1	1,000	0,000	100,0	90,9	0,591	0,430
AL138759.1	1,000	0,000	91,7	100,0	0,589	0,430
LINC01100	1,000	0,000	83,3	100,0	0,573	0,516
LINC01477	1,000	0,000	100,0	100,0	0,562	0,577
ENTPD3-AS1	1,000	0,000	91,7	100,0	0,521	0,853
LINC00114	0,992	0,000	90,9	90,9	0,722	0,054
AC015631.1	0,986	0,000	91,7	100,0	0,599	0,378
ZNF451-AS1	0,986	0,000	75,0	100,0	0,563	0,577
LINC02820	0,985	0,000	83,3	90,9	0,580	0,490
AC012178.1	0,979	0,000	83,3	91,7	0,557	0,610
AP005264.1	0,977	0,000	83,3	100,0	0,557	0,622
AC025918.1	0,975	0,000	100,0	80,0	0,620	0,318
AC005808.1	0,972	0,000	100,0	8,3	0,703	0,070
AL109924.2	0,972	0,000	100,0	16,7	0,698	0,078
LINC02744	0,972	0,000	83,3	91,7	0,667	0,137
AC108134.2	0,972	0,000	83,3	91,7	0,599	0,378
MAP3K5-AS1	0,972	0,000	75,0	100,0	0,562	0,577
AC087457.1	0,965	0,000	91,7	91,7	0,536	0,745
AC128685.1	0,965	0,000	33,3	100,0	0,526	0,816
AL139147.1	0,962	0,000	83,3	90,9	0,688	0,112
AC022872.1	0,962	0,000	25,0	100,0	0,534	0,767
AC110058.1	0,958	0,000	83,3	100,0	0,615	0,307
LINC00629	0,951	0,000	100,0	0,0	0,682	0,104
AL354861.3	0,950	0,000	83,3	90,0	0,643	0,242
AP001781.1	0,947	0,000	100,0	9,1	0,669	0,155
LINC00484	0,944	0,000	75,0	91,7	0,625	0,265
PTPRD-AS2	0,940	0,001	100,0	20,0	0,693	0,108
AL024474.2	0,932	0,000	75,0	90,9	0,655	0,186
LINC00323	0,932	0,000	66,7	90,9	0,608	0,348
AC093895.1	0,931	0,000	50,0	100,0	0,661	0,150
AC064807.3	0,931	0,000	100,0	0,0	0,620	0,286
FP236383.3	0,931	0,000	66,7	91,7	0,583	0,458
FP671120.4	0,931	0,000	66,7	91,7	0,583	0,458
AC006369.2	0,929	0,001	100,0	88,9	0,583	0,522
AC022601.1	0,917	0,001	66,7	91,7	0,622	0,283
AC084706.1	0,917	0,001	58,3	90,9	0,597	0,402
AC025048.4	0,917	0,001	66,7	100,0	0,551	0,657
AC008840.1	0,910	0,001	66,7	91,7	0,630	0,246
AP002433.1	0,910	0,001	100,0	0,0	0,561	0,591
HAGLR	0,909	0,001	75,0	90,9	0,665	0,152
AC004080.6	0,903	0,001	41,7	91,7	0,714	0,057
HOTAIRM1	0,903	0,001	100,0	0,0	0,698	0,078
HOXA-AS3	0,903	0,001	41,7	100,0	0,688	0,095
LINC00297	0,903	0,001	100,0	0,0	0,667	0,137
AC025171.2	0,902	0,001	66,7	81,8	0,716	0,061
BCDIN3D-AS1	0,902	0,001	75,0	100,0	0,517	0,882
TTLL7-IT1	0,900	0,003	70,0	88,9	0,744	0,072

Long non-coding RNAs presentes en el suero de pacientes trasplantados cuya expresión está alterada entre los pacientes con rechazo celular agudo (RCA) moderado/grave y el grupo sin rechazo. Se muestran los valores obtenidos al calcular sus respectivas curvas de características operativas del receptor (ROC), que incluyen el área bajo la curva (AUC), el p valor de la curva ROC, la sensibilidad (SE) y la especificidad (ES).

Cumpliendo con el objetivo de este trabajo, se han seleccionado aquellas moléculas con un buen poder estadístico para convertirse en potenciales biomarcadores para la detección del rechazo cardíaco de manera no invasiva. Esta selección se ha realizado observando los valores de las AUC, los valores de sensibilidad y los de especificidad obtenidos, representando aquellos transcritos que muestran simultáneamente una sensibilidad y especificidad mayor del 80% en el diagnóstico de RCA moderado/grave y los transcritos que muestran una sensibilidad y especificidad mayor del 60% en el diagnóstico de RCA leve y moderado/grave.

Se ha representado la curva ROC de las moléculas con mayor capacidad de diagnóstico no invasivo del rechazo cardíaco moderado/grave ( $\geq 2R$ ) de los 8 RNAs largos no codificantes que poseen una excelente AUC (**Figura 17**) y de aquellos transcritos cuya AUC es inferior a 1,000 (**Figura 18**) formado por 14 long non-coding RNAs (**Figura 18A-M y O**) y solo 1 small non-coding RNA, *RN7SL840P* (**Figura 18N**). La representación está ordenada de forma descendente según el valor de AUC de los transcritos.



**Figura 17:** Curva de características operativas del receptor (ROC) de los long non-coding RNAs más sensibles y específicos presentes en suero para la detección del rechazo cardíaco. Se muestra el AUC  $\pm$  error estándar en RCA moderado/grave y el p valor de la curva.

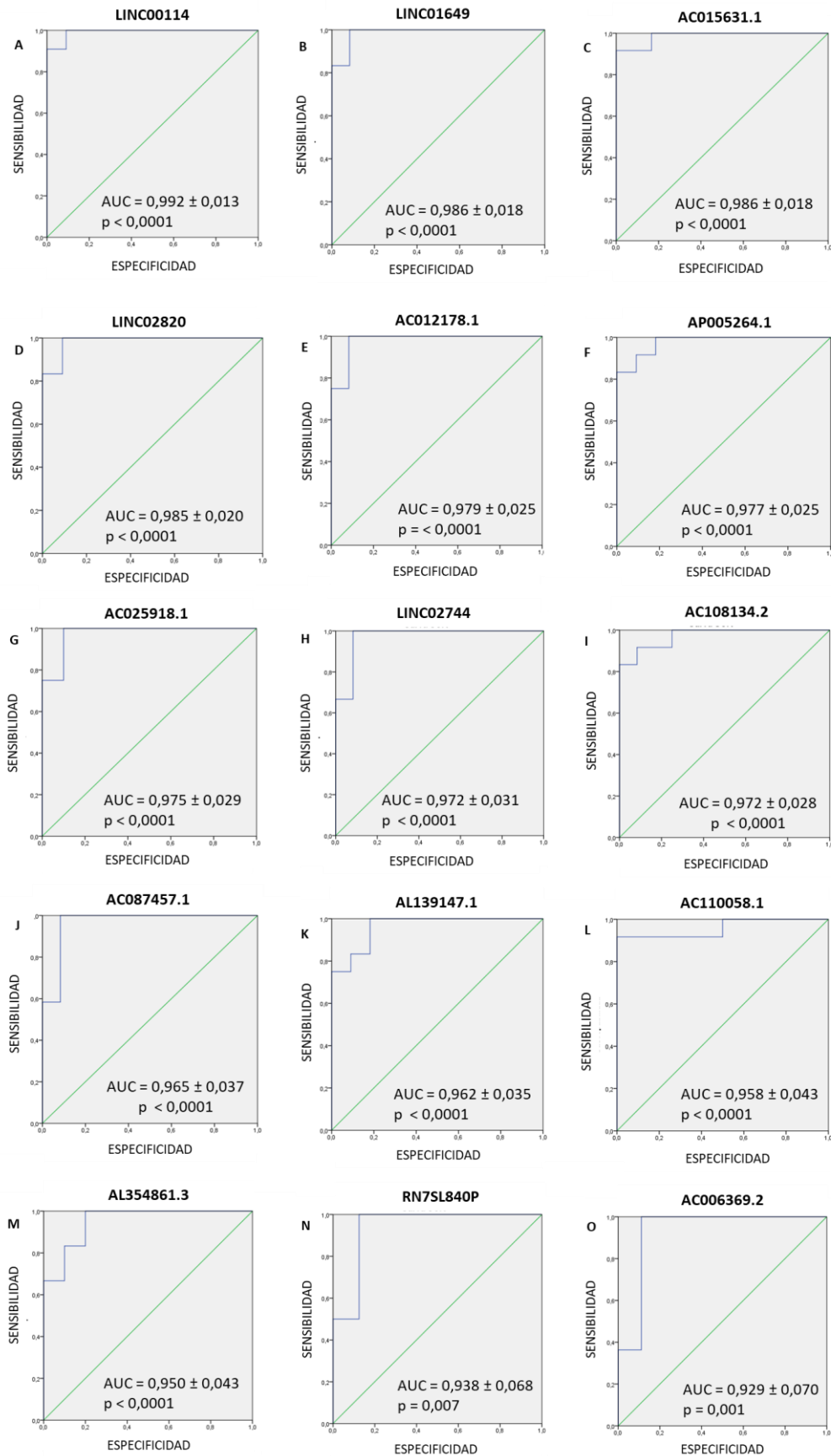
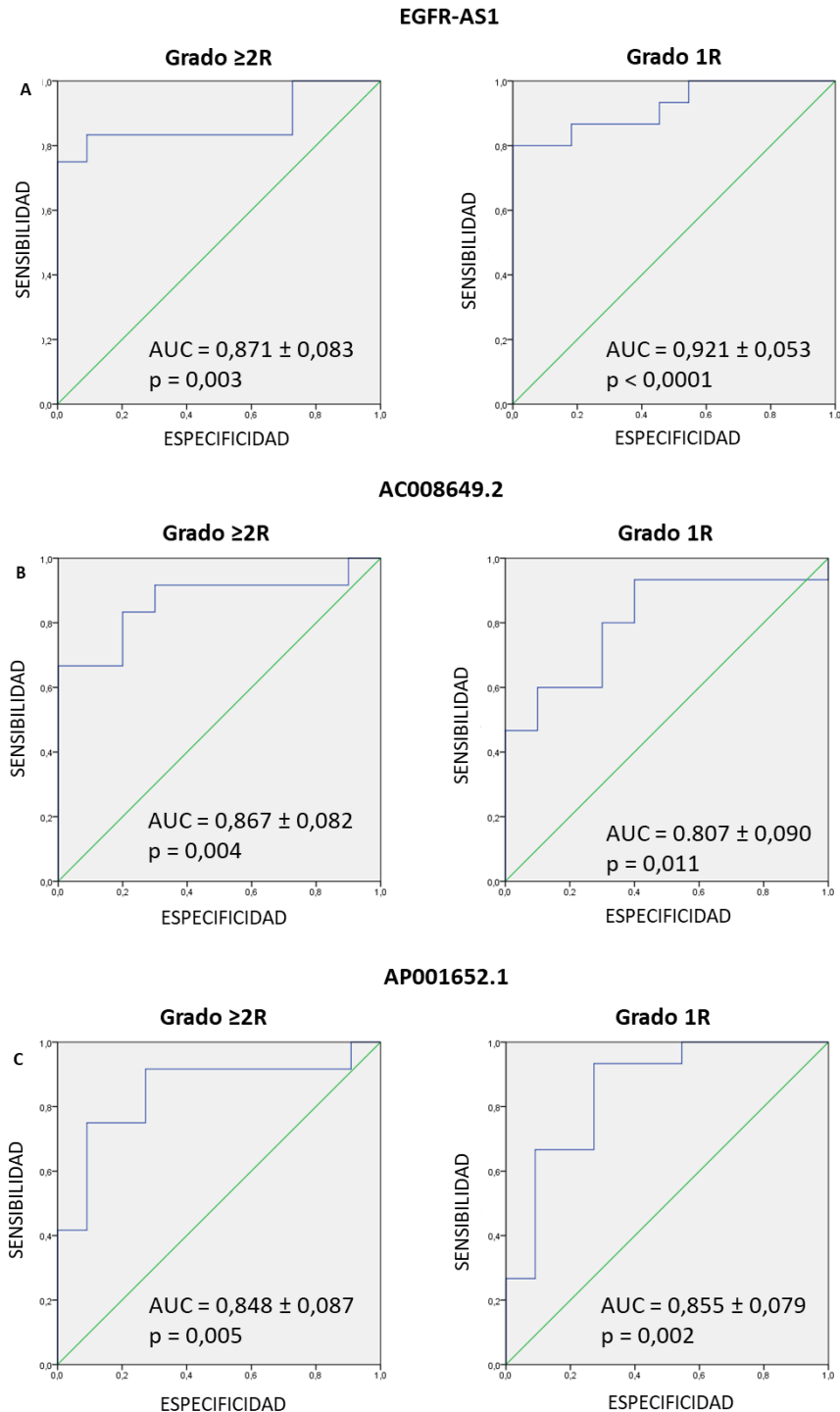


Figura 18: Curvas de características operativas del receptor (ROC) de los long non-coding RNAs (A-M y O) y small non-coding RNAs (N) más sensibles y específicos presentes en suero para la detección del rechazo cardíaco moderado/grave ( $\geq 2R$ ). Se muestra el AUC ± error estándar en RCA moderado/grave y el p valor de la curva.



El grupo de las mejores moléculas para el diagnóstico no invasivo tanto de RCA leve como de RCA moderado/grave está formado 3 transcritos, perteneciendo todos al biotipo de RNAs no codificantes largos (**Figura 19**). De forma semejante al caso anterior, la representación está ordenada de forma descendiente según el valor de AUC de los transcritos obtenido en RCA moderado/grave.



**Figura 19:** Curvas de características operativas al receptor (ROC) de los long non-coding RNAs más representativos presentes en suero para la detección de todos los grados de rechazo cardíaco. Grados  $\geq 2R$  y 1R de *EGFR-AS1* (A), de *AC008649.2* (B) y de *AP001652.1* (C), respectivamente. Se muestra el AUC  $\pm$  error estándar y el p valor de la curva.

## V. DISCUSIÓN

La enfermedad cardiovascular lidera la lista de causas de mortalidad global, por encima de las neoplasias malignas y de la mortalidad causada por la pandemia del virus SARS-CoV-2 actual (*Instituto Nacional de Estadística*). Debido a este liderazgo, no se debe bajar la guardia en la investigación de este campo en el que actualmente aún quedan muchos frentes abiertos y mecanismos de actuación por resolver. La IC es la enfermedad cardiovascular más común, tratándose de un síndrome crónico y progresivo que compromete la estabilidad hemodinámica del organismo y afecta al volumen sanguíneo que reciben otros órganos vitales, comprometiendo la función que éstos realizan. Es por ello, que el compromiso hemodinámico requiere de un tratamiento farmacológico que tiene como objetivo paliar los síntomas producidos por el síndrome. Los pacientes con IC avanzada que cumplen las indicaciones establecidas por la ISLHT son candidatos para entrar en lista de espera para someterse a un TC.

La monitorización y el seguimiento de los pacientes post-trasplante son cruciales para un diagnóstico temprano del RCA, una de las complicaciones más comunes tras el trasplante. El método *gold standard* para su detección es la BEM, un proceso invasivo y con importantes limitaciones técnicas como el error de muestreo y la variabilidad interobservador. Así pues, uno de los objetivos de la investigación biomédica es el desarrollo de nuevos enfoques de detección de RCA no invasivos, económicos, precisos y fiables. Actualmente se han descrito biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de RCA, entre los que se encuentran el DNA libre derivado del donante (*Agbor-Enoh et al., 2021*), las vesículas extracelulares (*Benichou et al., 2020*) y moléculas de naturaleza proteica como la troponina cardíaca T, el extremo N-terminal del péptido natriurético (*Dyer et al., 2012*) y la ATPasa SERCA2a (*Tarazón et al. 2017*), entre otros. A pesar de haber identificado un número considerable de biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de RCA, estos no han tenido traslación a la clínica, por lo que la investigación para encontrar nuevas moléculas con una buena capacidad diagnóstica continúa.

El diagnóstico no invasivo mediante biopsia líquida, a parte de las ventajas mencionadas, también presenta nuevos retos a resolver. Entre los desafíos que surgen encontramos la dificultad de que un solo biomarcador sea capaz de diagnosticar el rechazo del aloinjerto de una manera sensible y específica, por lo que se trabaja en una combinación de biomarcadores para una mayor precisión y fiabilidad. Actualmente existe el panel de expresión génica (GEP) AlloMap que evalúa la expresión de genes codificantes como método de monitorización del rechazo cardíaco aún no incorporado a la clínica. El ensayo clínico de su uso mostró una serie de limitaciones entre las que se encuentra la inclusión única de pacientes de bajo riesgo de rechazo por lo que impidió extraer conclusiones respecto a la no-inferioridad del GEP en comparación con la BEM, el hecho de que ha demostrado una mayor capacidad para descartar el RCA que el diagnóstico, además de encontrar una expresión diferencial de 11 genes incluidos en el panel entre pacientes de diferentes etnias (*Moayedi et al., 2019*).

En este objetivo intervienen los RNAs circulantes que, gracias al desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva y de análisis de datos ómicos, han tomado relevancia clínica como moléculas involucradas en el inicio, progreso o diagnóstico de diversas patologías. En los últimos años, estudios en patologías cardíacas y otras patologías como el cáncer han señalado a los RNAs circulantes como potenciales biomarcadores de diagnóstico o dianas de tratamiento. Estas investigaciones han revelado alteraciones significativas en los niveles de expresión de estas moléculas, centrándose, principalmente, en el estudio de los RNAs codificantes (mRNAs) y en

no codificantes regulatorios como los micro-RNAs (miRNAs). Se ha identificado un gen que codifica para el complejo transmembrana MCU, encargado del transporte de calcio citosólico al interior mitocondrial, que se encuentra alterado en pacientes con rechazo del aloinjerto, además de otros genes mitocondriales que también se encuentran alterados en suero (*Tarazón et al., 2021*). También se han identificado otras moléculas no codificantes, entre los que encontramos los miRNAs miR-181a-3p y miR-144-3p, entre otros (*Constanso-Conde et al., 2021; Pérez-Carrillo et al., 2022*).

Actualmente se desconoce el papel que juegan en la enfermedad cardiovascular y en el rechazo cardíaco otros subtipos de RNAs no codificantes, por lo que este estudio se ha centrado en el análisis de la variación de la expresión de estos non-coding RNAs, que no fuesen miRNAs, presentes en el suero de los pacientes diagnosticados con RCA frente a pacientes sin RCA. Los long y small non-coding RNAs podrían complementar y aportar información y robustez a las investigaciones ya realizadas, ya que estos transcritos están implicados en la regulación de genes y transcritos codificantes.

El conocimiento sobre los transcritos no codificantes está en constante cambio y expansión, descubriéndose nuevos biotipos y reconstruyéndose los criterios de clasificación. Debido a que no hay una clasificación definida, en este estudio se ha optado por agrupar las moléculas según su longitud de secuencia y subdividir el grupo de RNAs pequeños observando la función que desarrollan en el interior del núcleo celular o en el citoplasma y en el procesamiento de otros RNAs. Se ha detectado una amplia variedad de transcritos no codificantes circulantes, la mayoría de los cuales pertenecen al biotipo de long non-coding RNAs. El siguiente biotipo más numeroso corresponde a los RNAs pequeños misceláneos, compuesto por RNAs que no encajan en otros grupos y cuya función es muy variada. La alta variabilidad dentro de este grupo hace que el análisis en conjunto del subgrupo sea arduo y no se pueda establecer una conexión clara entre las alteraciones observadas y una función celular concreta.

*RN7SL840P* es el único small non-coding RNA misceláneo con una sensibilidad y especificidad destacable alterado en el rechazo cardíaco moderado/grave, encontrándose sobreexpresado 2 veces más que en el grupo sin rechazo cardíaco. Se trata de un RNA citoplasmático misceláneo procedente de la transcripción de un pseudogen *7SL*. Los pseudogenes *7SL* guardan homología con el gen de RNA *7SL* y están distribuidos abundantemente a lo largo de todo el genoma eucariota (*Suh et al., 1989*). Se ha sugerido que algunos de los pseudogenes *7SL* forman parte de la SRP (*Ullu et al., 1984*), que interacciona con el ribosoma y las proteínas nacientes para su correcto destino subcelular, pero se necesitan más investigaciones sobre el papel que juegan las transcripciones de estos pseudogenes en la biogénesis de la SRP, cuáles de estos pseudogenes forma la ribonucleopartícula y la implicación de su desequilibrio en el destino proteico. Otros RNAs misceláneos con buenas AUC en el rechazo cardíaco moderado/grave son *Y-RNA[8]*, con un incremento de 3 veces respecto al grupo sin rechazo, *Y-RNA[11]*, aproximadamente de 2 veces superior e *Y-RNA[2]*, 3 veces inferior al grupo sin rechazo cardíaco. Los Y-RNAs son transcritos que se han relacionado fuertemente con el sistema inmune, además de ser objeto de estudio por su implicación con el sistema cardiovascular (*Cambier et al., 2017; Driedonks et al., 2019; Valkov et al., 2020*) e interactuar con otros complejos como el snRNP del espliceosoma (*Gulía et al., 2020*).

Por otra parte, los RNAs nucleares como *RNU7-1*, que se encuentra sobreexpresado en el grupo de pacientes con rechazo moderado/grave, forman las ribonucleopartículas del espliceosoma. En este caso en particular, *RNU7-1* forma la subunidad U7 snRNP, imprescindible en el procesamiento de los mRNAs inmaduros que codifican para las histonas dependientes de la

replicación (RDH) o histonas centrales H2A, H2B, H3 y H4 (Buchholz et al., 2020; Ugenti et al., 2020). Los pre-mRNAs RDH, junto con los mRNAs codificantes para H1, son los únicos mensajeros que no están poliadenilados en su extremo 3', por lo que requieren de un procesamiento especial, que cuando se encuentra mutado se ha relacionado con la producción de isoformas aberrantes de mRNA RDH y enfermedades donde tiene un papel determinante el sistema inmune como el síndrome de Aicardi-Goutières (AGS) (Ugenti et al., 2020).

Otros small non-coding RNAs interesantes, que no se han representado en los anteriores apartados por no cumplir los criterios seleccionados, son 5 nucleolares alterados en pacientes con rechazo cardíaco. Destacamos que solo 1 de estos 5 pertenece al subgrupo de RNAs nucleolares de caja H/ACA. Este estudio revela que *SNORA32* tiene una expresión comparada aproximadamente 2 veces menor que la expresión que muestra el grupo sin rechazo cardíaco, además de contar con una buena capacidad diagnóstica. Por otro lado, los 4 snoRNAs restantes, *AC116913.2*, *SNORD18B*, *SNORD104* y *SNORD83B*, pertenecen a los RNAs de caja C/D, destacando el hecho de que todos ellos muestran niveles de expresión 2 veces mayor que la observada en el grupo sin rechazo cardíaco. Además, estos snoRNAs C/D también poseen una buena capacidad diagnóstica.

La función que llevan a cabo estos transcritos no codificantes comprende el procesamiento de otros RNAs celulares mediante 2'-O-metilación, llevada a cabo por los snoRNAs C/D que se asocian y guían a enzimas metiltransferasa como la fibrilarina, y la pseudouridilación, llevada a cabo por los H/ACA. La 2'-O-metilación es una modificación postranscripcional muy abundante, principalmente en los RNAs ribosómicos y en los RNAs nucleares, que consiste en la adición de un grupo metilo al 2'-hidroxilo de la ribosa del nucleósido modificado, cambiando su conformación secundaria e impactando en los sitios de unión (o de acomodación del aminoacil-tRNA) que quedan accesibles o enmascarados (Motorin et al., 2018). Estudios recientes sugieren que esta modificación tiene un impacto en la estabilidad y la vida útil de los transcritos codificantes y no codificantes modificados: cuando esta modificación está *downregulada* da lugar a ribosomas menos estables y no funcionales, disminuyendo la capacidad de traducción de estos, mientras que, si está *upregulada*, se ha relacionado con una mayor actividad en la traducción debido a la mayor resistencia a la degradación de los rRNAs modificados (Abou Assi et al., 2020). Además, la 2'-O-metilación impacta en el plegamiento y en el apareamiento de bases de los snRNAs, cuya función es el ensamblaje y desensamblaje del espliceosoma.

Los snoRNAs de caja H/ACA, siguiendo el mismo mecanismo de actuación que los C/D, se unen a enzimas como la disquerina y NOP10 para guiar la conversión de uridina a pseudouridina de los RNAs diana. La pseudouridina es el nucleótido modificado más abundante y concentra su presencia en los RNAs nucleares del espliceosoma, donde se encuentra altamente conservada entre especies, confiriendo a los transcritos enlaces de hidrógeno adicionales que proporcionan una mayor estabilidad estructural (Gu et al., 2011). El estudio de la modificación ha revelado que el patrón de pseudouridilación está altamente conservado entre el snRNP mayor y el snRNP menor, estando pseudouridiladas las posiciones equivalentes, además de concentrarse en regiones altamente funcionales, como las regiones de reconocimiento del pre-mRNA, indicando la funcionalidad crucial del nucleótido modificado. Se han realizado varios experimentos *in vitro* con células de mamíferos HeLa donde se revela que la inhibición de la pseudouridilación del snRNA tiene un importante impacto en el ensamblaje del espliceosoma, además de observar que el bucle de interacción snRNP-mRNA está altamente pseudouridilado. En este estudio con pacientes trasplantados se ha observado una desregulación a la baja de los snoRNAs H/ACA, lo que podría comprometer la función de pseudouridilación de los snRNAs, su unión a las

ribonucleoproteínas, la biogénesis y ensamblaje del espliceosoma, el reconocimiento y el correcto procesamiento del mRNA inmaduro.

Brevemente, en este estudio se han observado alteraciones en genes de small RNAs no codificantes que están estrechamente relacionados con la estabilidad y el ensamblaje del espliceosoma, el reconocimiento de pre-mRNAs y su unión al complejo y el procesamiento de los pre-mRNAs RDH y otros poliadenilados. Además, también se ha observado variaciones en genes de RNA misceláneo y nuclear que podrían establecer una interacción con el sistema inmune, asimismo de pseudogenes que podrían estar implicados en la biogénesis de la SRP y el destino celular. El hecho de que las modificaciones post-transcripcionales de 2'-O-metilación y pseudouridina estén *upreguladas* y *downreguladas*, respectivamente, puede originar una cadena de alteraciones exponenciales en la estructura y actividades biológicas de los RNAs diana, comprometiendo la señalización intracelular e intercelular llevada a cabo por estas moléculas e iniciando una serie de isoformas de mRNA que comprometerían la homeostasis celular y del tejido. Por tanto, este estudio abre las puertas a futuras investigaciones con una cohorte más amplia donde se pueda validar el resultado obtenido y cuyo objetivo sea establecer el papel que juegan estas modificaciones en el rechazo cardíaco, cuantificar estas modificaciones, estudiar la composición del espliceosoma y el splicing de los mRNAs y las implicaciones clínicas de su desregulación, pudiendo convertirse en un potencial terapéutico que abarca las causas y no solo los síntomas del RCA, además de tener utilidad como biomarcadores de diagnóstico no invasivo del rechazo cardíaco.

Por otro lado, dentro del grupo de RNAs largos hay una amplia variedad de transcritos con diferentes funciones. De los transcritos largos que destacan por su sensibilidad y especificidad, algunos aparecen en la literatura relacionados con diversos tipos de cáncer. El long non-coding RNA *ENTPD3-AS1* se encuentra sobreexpresado hasta 2 veces más en el grupo de pacientes con RCA moderado/grave comparado con el grupo sin rechazo cardíaco. Además, se ha relacionado en diversos estudios con el carcinoma renal y se ha observado que su regulación positiva inhibe la proliferación celular mediante su interacción con un miRNA y potenciando la expresión del supresor tumoral HIF-1 $\alpha$  (Wang et al., 2021). *LINC00114* se ha relacionado con el cáncer colorrectal y con el carcinoma nasofaríngeo a través de un mecanismo de interferencia y silenciamiento de dos miRNAs diferentes. En dos estudios se ha observado que la presencia de este RNA no codificante regula positivamente la división celular mediante diversos mecanismos, regulando la unión de proteínas como EZH2 y DNMT1 o mediante la vía ERK/JNK (Han et al., 2020; Lv et al., 2019), mientras que en otras investigaciones es la inhibición de este lncRNA la que se ha relacionado con la proliferación celular (Liu et al., 2020). Por tanto, la regulación al alza de los diferentes lncRNAs que se ha observado en este estudio podría estar implicada en la progresión o inhibición del ciclo celular en el RCA moderado/grave y serán necesarias más investigaciones para esclarecer su mecanismo de actuación, así como para validar su potencial como biomarcadores de diagnóstico del rechazo cardíaco.

Otros lncRNAs con capacidad diagnóstica destacable son *FP236383.3* y *FP671120.4*, estos RNAs destacan por su elevado nivel de expresión en suero, muy alejado al del resto de RNAs no codificantes largos, y se encuentran sobreexpresados en el grupo de pacientes con RCA moderado/grave en comparación con el grupo sin RCA. Ambos RNAs están transcritos a partir de su región genómica de origen, presente en el brazo corto del cromosoma 21 (21p11.2). La función que se ha descrito en la literatura para estas moléculas es la de unión a una de las cinco matrices de repetición de DNA ribosómico (rDNA) que tiene el genoma humano, específicamente la que está presente en este mismo cromosoma (Robicheau et al., 2017). Estas

5 matrices de repetición de rDNA por genoma haploide (HSA) se encuentran en cada uno de los cromosomas acrocéntricos humanos (13-15 y 21-22), llevando a cabo la organización del nucléolo, por lo que la desregulación de estas moléculas puede conllevar alteraciones en sus dianas. Por tanto, el estudio de las funciones que desempeñan estos lncRNAs podría convertirse en un interesante foco de investigación para entender la fisiopatología del rechazo cardíaco.

El estudio de la variación de las moléculas no codificantes circulantes que intervienen en la regulación de la expresión de otros biotipos codificantes y no codificantes ha aportado una nueva estrategia potencial para el diagnóstico de esta patología, con las ventajas de que no tienen variabilidad interobservador y las complicaciones de una biopsia de tejido, por lo que el análisis de rutina y la monitorización del RCA se podría llevar a cabo de una manera más sencilla y continua. Por otra parte, se necesitan futuras investigaciones en una cohorte independiente y con un número similar o mayor de pacientes en la que se pueda validar los resultados obtenidos.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se han detectado numerosos transcritos no codificantes en el suero de pacientes sometidos a trasplante cardíaco. Los long non-coding RNAs son el biotipo más abundante. Entre los small non-coding detectados encontramos mayoritariamente RNAs misceláneos. Además, no se detectan los biotipos piRNA ni siRNA en estas muestras.
2. Se ha observado que el 5,1% de los long non-coding RNAs detectados y el 6,5% de los small non-coding RNAs presentan una expresión diferencial en pacientes con rechazo celular agudo. Destaca la ausencia de alteración en el biotipo scaRNAs.
3. Se han identificado un gran número de moléculas con excelente capacidad diagnóstica del rechazo celular agudo, entre las que destacan 23 de ellas por su sensibilidad y especificidad en el rechazo moderado/grave. Además, resaltamos que 3 long non-coding (*EGFR-AS1*, *AC008649.2* y *AP001652.1*) mantienen una buena capacidad diagnóstica incluso en los grados más leves. Por ello, proponemos estos RNAs no codificantes como potenciales biomarcadores de rechazo cardíaco.
4. Aunque se desconoce la función de estos RNAs no codificantes en el rechazo celular agudo, sus funciones están relacionadas con el espliceosoma, el procesamiento post-transcripcional mediante 2'-O-metilación y pseudouridilación de otros non-coding, el ciclo celular y la organización del nucléolo, por lo que estas rutas son importantes a tener en cuenta en futuros estudios para dilucidar mecanismos implicados en el desarrollo de esta patología.

## VII. REFERENCIAS

Abou Assi, H., Rangadurai, A. K., Shi, H., Liu, B., Clay, M. C., Erharter, K., Kreutz, C., Holley, C. L., & Al-Hashimi, H. M. (2020). **2'-O-Methylation can increase the abundance and lifetime of alternative RNA conformational states.** *Nucleic acids research*, *48*(21), 12365–12379. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa928>

Agbor-Enoh, S., Shah, P., Tunc, I., Hsu, S., Russell, S., Feller, E., Shah, K., Rodrigo, M. E., Najjar, S. S., Kong, H., Pirooznia, M., Fideli, U., Bikineyeva, A., Marishta, A., Bhatti, K., Yang, Y., Mutebi, C., Yu, K., Kyoo Jang, M., Marboe, C. & GRAfT Investigators (2021). **Cell-Free DNA to Detect Heart Allograft Acute Rejection.** *Circulation*, *143*(12), 1184–1197. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049098>

Arrigo, M., Jessup, M., Mullens, W., Reza, N., Shah, A. M., Sliwa, K., & Mebazaa, A. (2020). **Acute heart failure.** *Nature reviews. Disease primers*, *6*(1), 16. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0151-7>

Bai, R., Wan, R., Wang, L., Xu, K., Zhang, Q., Lei, J., & Shi, Y. (2021). **Structure of the activated human minor spliceosome.** *Science*, *371*(6535), eabg0879. <https://doi.org/10.1126/science.abg0879>

Benichou, G., Wang, M., Ahrens, K. & Madsen, J. C. (2020). **Extracellular vesicles in allograft rejection and tolerance.** *Cellular immunology*, *349*, 104063. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104063>

Bergmann, J. H. & Spector, D. L. (2014). **Long non-coding RNAs: modulators of nuclear structure and function.** *Current opinion in cell biology*, *26*, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.08.005>

Berry, G. J., Burke, M. M., Andersen, C., Bruneval, P., Fedrigo, M., Fishbein, M. C., Goddard, M., Hammond, E. H., Leone, O., Marboe, C., Miller, D., Neil, D., Rassl, D., Revelo, M. P., Rice, A., Rene Rodriguez, E., Stewart, S., Tan, C. D., Winters, G. L., West, L. & Angelini, A. (2013). **The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation.** *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, *32* (12), 1147–1162. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2013.08.011>

Bucholc, K., Aik, W. S., Yang, X. C., Wang, K., Zhou, Z. H., Dadlez, M., Marzluff, W. F., Tong, L., & Dominski, Z. (2020). **Composition and processing activity of a semi-recombinant holo U7 snRNP.** *Nucleic acids research*, *48*(3), 1508–1530. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1148>

Califf R. M. (2018). **Biomarker definitions and their applications.** *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, *243* (3), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>

Cambier, L., de Couto, G., Ibrahim, A., Echavez, A. K., Valle, J., Liu, W., Kreke, M., Smith, R. R., Marbán, L. & Marbán, E. (2017). **Y RNA fragment in extracellular vesicles confers cardioprotection via modulation of IL-10 expression and secretion.** *EMBO molecular medicine*, *9*(3), 337–352. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606924>



Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). **Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs**. *Cell*, 136(4), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>

Constanso-Conde, I., Hermida-Prieto, M., Barge-Caballero, E., Núñez, L., Pombo-Otero, J., Suárez-Fuentetaja, N., Paniagua-Martín, M. J., Barge-Caballero, G., Couto-Mallón, D., Pan-Lizcano, R., Vázquez-Rodríguez, J. M. & Crespo-Leiro, M. G. (2020). **Circulating miR-181a-5p as a new biomarker for acute cellular rejection in heart transplantation**. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 39(10), 1100–1108. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.05.018>

Cooper, L. T., Baughman, K. L., Feldman, A. M., Frustaci, A., Jessup, M., Kuhl, U., Levine, G. N., Narula, J., Starling, R. C., Towbin, J., & Virmani, R. (2007). **The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology**. *European heart journal*, 28(24), 3076–3093. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm456>

Costanzo, M. R., Dipchand, A., Starling, R., Anderson, A., Chan, M., Desai, S., Fedson, S., Fisher, P., Gonzales-Stawinski, G., Martinelli, L., McGiffin, D., Smith, J., Taylor, D., Meiser, B., Webber, S., Baran, D., Carboni, M., Dengler, T., Feldman, D., Frigerio, M. & International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines (2010). **The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients**. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 29 (8), 914–956. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2010.05.034>

Crespo-Leiro, M. G., Stypmann, J., Schulz, U., Zuckermann, A., Mohacsi, P., Bara, C., Ross, H., Parameshwar, J., Zakliczyński, M., Fiocchi, R., Hofer, D., Colvin, M., Deng, M. C., LePrince, P., Elashoff, B., Yee, J. P., & Vanhaecke, J. (2016). **Clinical usefulness of gene-expression profile to rule out acute rejection after heart transplantation: CARGO II**. *European heart journal*, 37(33), 2591–2601. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv682>

Crespo-Leiro, M. G., Metra, M., Lund, L. H., Milicic, D., Costanzo, M. R., Filippatos, G., Gustafsson, F., Tsui, S., Barge-Caballero, E., De Jonge, N., Frigerio, M., Hamdan, R., Hasin, T., Hülsmann, M., Nalbantgil, S., Potena, L., Bauersachs, J., Gkouziouta, A., Ruhparwar, A., Ristic, A. D., Ruschitzka, F. (2018). **Advanced heart failure: a position statement of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology**. *European journal of heart failure*, 20(11), 1505–1535. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1236>

Driedonks, T. & Nolte-'t Hoen, E. (2019). **Circulating Y-RNAs in Extracellular Vesicles and Ribonucleoprotein Complexes; Implications for the Immune System**. *Frontiers in immunology*, 9, 3164. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03164>

ESC guideline (2020). **ESC guideline for the management of adult congenital heart diseases**. *Revista Española de Cardiología*. 74 (5), 436.e1–436.e2. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2020.10.023>

Fablet M. (2014). **Host control of insect endogenous retroviruses: small RNA silencing and immune response**. *Viruses*, 6(11), 4447–4464. <https://doi.org/10.3390/v6114447>

Fang, R., Moss, W. N., Rutenberg-Schoenberg, M. & Simon, M. D. (2015). **Probing Xist RNA Structure in Cells Using Targeted Structure-Seq.** *PLoS genetics*, 11(12), e1005668. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005668>

Faoro, C. & Ataide, S. F. (2021). **Noncanonical Functions and Cellular Dynamics of the Mammalian Signal Recognition Particle Components.** *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 679584. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.679584>

FDA-NIH Biomarker Working Group (2016). **BEST (Biomarkers, Endpoints, and other Tools) Resource.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>

Guiro, J. & Murphy, S. (2017). **Regulation of expression of human RNA polymerase II-transcribed snRNA genes.** *Open biology*, 7(6), 170073. <https://doi.org/10.1098/rsob.170073>

Gulia, C., Signore, F., Gaffi, M., Gigli, S., Votino, R., Nucciotti, R., Bertacca, L., Zaami, S., Baffa, A., Santini, E., Porrello, A. & Piergentili, R. (2020). **Y RNA: An Overview of Their Role as Potential Biomarkers and Molecular Targets in Human Cancers.** *Cancers*, 12(5), 1238. <https://doi.org/10.3390/cancers12051238>

Han, Y. Y., Liu, K., Xie, J., Li, F., Wang, Y. & Yan, B. (2020). **LINC00114 promoted nasopharyngeal carcinoma progression and radioresistance in vitro and in vivo through regulating ERK/JNK signaling pathway via targeting miR-203.** *European review for medical and pharmacological sciences*, 24(5), 2491–2504. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202003\\_20517](https://doi.org/10.26355/eurrev_202003_20517)

Instituto Nacional de Estadística ( <https://www.ine.es/index.htm> )

Kiss, T., Fayet, E., Jády, B. E., Richard, P., & Weber, M. (2006). **Biogenesis and intranuclear trafficking of human box C/D and H/ACA RNPs.** *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 71, 407–417. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.025>

Kowalski, M. P., & Krude, T. (2015). **Functional roles of non-coding Y RNAs.** *The international journal of biochemistry & cell biology*, 66, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.07.003>

Kung, J. T., Colognori, D. & Lee, J. T. (2013). **Long noncoding RNAs: past, present, and future.** *Genetics*, 193(3), 651–669. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.146704>

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. (2009). **Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome.** *Genome biology*, 10(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). **The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.** *Bioinformatics* (Oxford, England), 25 (16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

Liang, J., Wen, J., Huang, Z., Chen, X. P., Zhang, B. X. & Chu, L. (2019). **Small Nucleolar RNAs: Insight Into Their Function in Cancer.** *Frontiers in oncology*, 9, 587. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00587>

Liu, S., Cao, Q., An, G., Yan, B. & Lei, L. (2020). **Identification of the 3-lncRNA Signature as a Prognostic Biomarker for Colorectal Cancer.** *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9359. <https://doi.org/10.3390/ijms21249359>

Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. (2014). **Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.** *Genome biology*, 15 (12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

Lv, L., He, L., Chen, S., Yu, Y., Che, G., Tao, X., Wang, S., Jian, Z., & Zhang, X. (2019). **Long Non-coding RNA LINC00114 Facilitates Colorectal Cancer Development Through EZH2/DNMT1-Induced miR-133b Suppression.** *Frontiers in oncology*, 9, 1383. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01383>

Mattick, J. S. & Makunin, I. V. (2006). **Non-coding RNA.** *Human molecular genetics*, 15 Spec No 1, R17–R29. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046>

Massenet S. (2019). **In vivo assembly of eukaryotic signal recognition particle: A still enigmatic process involving the SMN complex.** *Biochimie*, 164, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.04.007>

Mehra, M. R., Canter, C. E., Hannan, M. M., Semigran, M. J., Uber, P. A., Baran, D. A., Danziger-Isakov, L., Kirklin, J. K., Kirk, R., Kushwaha, S. S., Lund, L. H., Potena, L., Ross, H. J., Taylor, D. O., Verschuuren, E., Zuckermann, A. & International Society for Heart Lung Transplantation (ISHLT) Infectious Diseases, Pediatric and Heart Failure and Transplantation Councils (2016). **The 2016 International Society for Heart Lung Transplantation listing criteria for heart transplantation: A 10-year update.** *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 35(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2015.10.023>

Meier U. T. (2017). **RNA modification in Cajal bodies.** *RNA biology*, 14(6), 693–700. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1249091>

Miller, C. A., Fildes, J. E., Ray, S. G., Doran, H., Yonan, N., Williams, S. G. & Schmitt, M. (2013). **Non-invasive approaches for the diagnosis of acute cardiac allograft rejection.** *Heart (British Cardiac Society)*, 99(7), 445–453. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2012-302759>

Moayedi, Y., Fan, C. S., Miller, R., Tremblay-Gravel, M., Posada, J., Manlihot, C., Hiller, D., Yee, J., Woodward, R., McCaughan, J. A., Shullo, M. A., Hall, S. A., Pinney, S., Khush, K. K., Ross, H. J. & Teuteberg, J. J. (2019). **Gene expression profiling and racial disparities in outcomes after heart transplantation.** *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 38(8), 820–829. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.05.008>

Motorin, Y., & Marchand, V. (2018). **Detection and Analysis of RNA Ribose 2'-O-Methylations: Challenges and Solutions.** *Genes*, 9(12), 642. <https://doi.org/10.3390/genes9120642>

Nostramo, R. T., & Hopper, A. K. (2019). **Beyond rRNA and snRNA: tRNA as a 2'-O-methylation target for nucleolar and Cajal body box C/D RNPs.** *Genes & development*, 33(13-14), 739–740. <https://doi.org/10.1101/gad.328443.119>

Orso, F., Fabbri, G. & Maggioni, A. P. (2017). **Epidemiology of Heart Failure**. *Handbook of experimental pharmacology*, 243, 15–33. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_74](https://doi.org/10.1007/164_2016_74)

Pérez-Carrillo, L., Sánchez-Lázaro, I., Triviño, J. C., Feijóo-Bandín, S., Lago, F., González-Juanatey, J. R., Martínez-Dolz, L., Portolés, M., Tarazón, E. & Roselló-Lletí, E. (2022). **Diagnostic value of serum miR-144-3p for the detection of acute cellular rejection in heart transplant patients**. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 41(2), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2021.10.004>

Pfeffer, M. A., Shah, A. M. & Borlaug, B. A. (2019). **Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective**. *Circulation research*, 124 (11), 1598–1617. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.313572>

Quinn, J. J., & Chang, H. Y. (2016). **Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function**. *Nature reviews. Genetics*, 17(1), 47–62. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.10>

Robicheau, B. M., Susko, E., Harrigan, A. M. & Snyder, M. (2017). **Ribosomal RNA Genes Contribute to the Formation of Pseudogenes and Junk DNA in the Human Genome**. *Genome biology and evolution*, 9(2), 380–397. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw307>

Romero-Barrios, N., Legascue, M. F., Benhamed, M., Ariel, F. & Crespi, M. (2018). **Splicing regulation by long noncoding RNAs**. *Nucleic acids research*, 46 (5), 2169–2184. <https://doi.org/10.1093/nar/gky095>

Seferović, P. M., Tsutsui, H., McNamara, D. M., Ristić, A. D., Basso, C., Bozkurt, B., Cooper, L. T., Jr, Filippatos, G., Ide, T., Inomata, T., Klingel, K., Linhart, A., Lyon, A. R., Mehra, M. R., Polovina, M., Milinković, I., Nakamura, K., Anker, S. D., Veljić, I., Ohtani, T. & Starling, R. C. (2021). **Heart Failure Association of the ESC, Heart Failure Society of America and Japanese Heart Failure Society Position statement on endomyocardial biopsy**. *European journal of heart failure*, 23 (6), 854–871. <https://doi.org/10.1002/ejhf.2190>

Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L. & Huarte, M. (2021). **Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions**. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 22(2), 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>

Suh, D., Yuan, Y., Henning, D., & Reddy, R. (1989). **Secondary structure of 7SK and 7-2 small RNAs. Possible origin of some 7SK pseudogenes from cDNA formed through self-priming by 7SK RNA**. *European journal of biochemistry*, 186(1-2), 221–226. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15198.x>

Tarazón, E., Ortega, A., Gil-Cayuela, C., Sánchez-Lacuesta, E., Marín, P., Lago, F., González-Juanatey, J. R., Martínez-Dolz, L., Portolés, M., Rivera, M., & Roselló-Lletí, E. (2017). **SERCA2a: A potential non-invasive biomarker of cardiac allograft rejection**. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 36(12), 1322–1328. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2017.07.003>

Tarazón, E., Corbacho-Alonso, N., Barderas, M. G., Gil-Cayuela, C., García-Manzanares, M., Feijóo-Bandín, S., Lago, F., González-Juanatey, J. R., Martínez-Dolz, L., Portolés, M. &

Roselló-Lletí, E. (2020). **Plasma CD5L and non-invasive diagnosis of acute heart rejection.** *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 39(3), 257–266.

<https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.11.004>

Tarazón, E., Pérez-Carrillo, L., García-Bolufer, P., Triviño, J. C., Feijóo-Bandín, S., Lago, F., González-Juanatey, J. R., Martínez-Dolz, L., Portolés, M. & Roselló-Lletí, E. (2021). **Circulating mitochondrial genes detect acute cardiac allograft rejection: Role of the mitochondrial calcium uniporter complex.** *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 21(6), 2056–2066. <https://doi.org/10.1111/ajt.16387>

Turk-Adawi, K., Sarrafzadegan, N., Fadhil, I., Taubert, K., Sadeghi, M., Wenger, N. K., Tan, N. S. & Grace, S. L. (2018). **Cardiovascular disease in the Eastern Mediterranean region: epidemiology and risk factor burden.** *Nature reviews. Cardiology*, 15 (2), 106–119. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.138>

Ugenti, C., Lepelley, A., Depp, M., Badrock, A. P., Rodero, M. P., El-Daher, M. T., Rice, G. I., Dhir, S., Wheeler, A. P., Dhir, A., Albawardi, W., Frémond, M. L., Seabra, L., Doig, J., Blair, N., Martin-Niclos, M. J., Della Mina, E., Rubio-Roldán, A., García-Pérez, J. L., Sproul, D., Crow, Y. J. (2020). **cGAS-mediated induction of type I interferon due to inborn errors of histone pre-mRNA processing.** *Nature genetics*, 52(12), 1364–1372. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00737-3>

Ullu, E., & Weiner, A. M. (1984). **Human genes and pseudogenes for the 7SL RNA component of signal recognition particle.** *The EMBO journal*, 3(13), 3303–3310.

Valkov, N. & Das, S. (2020). **Y RNAs: Biogenesis, function and Implications for the cardiovascular system.** *Advances in experimental medicine and biology*, 1229, 327–342. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1671-9\\_20](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1671-9_20)

Vausort, M., Wagner, D. R. & Devaux, Y. (2014). **Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction.** *Circulation research*, 115(7), 668–677. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303836>

Wang, H., Bei, Y., Shi, J., Xiao, J. & Kong, X. (2015). **Non-Coding RNAs in Cardiac Aging.** *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 36(5), 1679–1687. <https://doi.org/10.1159/000430141>

Watson, C. N., Belli, A. & Di Pietro, V. (2019). **Small Non-coding RNAs: New Class of Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Neurodegenerative Disease.** *Frontiers in genetics*, 10, 364. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00364>

Xing, Y. H. & Chen, L. L. (2018). **Processing and roles of snoRNA-ended long noncoding RNAs.** *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 53 (6), 596–606. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1508411>

Zhao, Y., Dunker, W., Yu, Y. T. & Karijolic, J. (2018). **The Role of Noncoding RNA Pseudouridylation in Nuclear Gene Expression Events.** *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00008>

Ziaeeian, B., & Fonarow, G. C. (2016). **Epidemiology and aetiology of heart failure.** *Nature reviews. Cardiology*, 13 (6), 368–378.  
<https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.25>

## ANEXO I - SMALL NON-CODING RNAs

ID	sncRNA	x̄ Expression	Fold Change	CURVAS ROC ≥2R vs OR			CURVAS ROC 1R vs OR		
				AUC	SE	p VALOR	AUC	SE	p VALOR
<b>snRNAs</b>									
ENSG00000212605	RNU1-56P	2,33	-2,07	0,827	0,094	0,011	0,697	0,105	0,092
ENSG00000200296	RNU1-83P	17,72	-1,38	0,771	0,100	0,024	0,453	0,114	0,676
ENSG00000223125	RNU2-32P	2,42	2,30	0,852	0,087	0,010	0,677	0,124	0,190
ENSG00000222414	RNU2-59P	4,29	1,61	0,758	0,101	0,036	0,539	0,119	0,736
ENSG00000238923	RNU7-1	9,34	1,84	0,758	0,103	0,036	0,635	0,108	0,227
<b>snoRNAs</b>									
ENSG00000280554	AC116913.2	1,72	2,02	0,864	0,096	0,008	0,663	0,121	0,218
ENSG00000206799	SNORA32	2,57	-1,87	0,889	0,096	0,031	0,513	0,158	0,944
ENSG00000201898	SNORA72	9,57	-1,40	0,750	0,105	0,042	0,570	0,114	0,551
ENSG00000238917	SNORD10	79,68	-1,29	0,771	0,100	0,024	0,760	0,092	0,020
ENSG00000199753	SNORD104	180,93	1,95	0,826	0,088	0,007	0,656	0,111	0,164
ENSG00000202252	SNORD14C	13,39	1,86	0,736	0,103	0,050			
ENSG00000200879	SNORD14E	2,86	2,35	0,771	0,117	0,064			
ENSG00000202529	SNORD18B	1,72	2,02	0,864	0,096	0,008	0,663	0,121	0,218
ENSG00000209480	SNORD83B	4,16	2,12	0,780	0,097	0,023	0,608	0,118	0,369
<b>miscRNAs</b>									
ENSG00000202318	AC006057.1	1,82	2,99	0,750	0,138	0,105			
ENSG00000277830	AL049766.2	1,87	1,65	0,786	0,118	0,051			
ENSG00000280502	Metazoa_SRP	7,83	-1,94	0,780	0,101	0,023	0,608	0,119	0,348
ENSG00000222451	RN7SKP143	7,77	-1,64	0,848	0,091	0,005	0,709	0,108	0,073
ENSG00000252854	RN7SKP5	1,82	-1,99	0,806	0,111	0,034	0,781	0,109	0,037
ENSG00000244230	RN7SL151P	45,96	2,55	0,743	0,109	0,043	0,589	0,114	0,430
ENSG00000244642	RN7SL396P	52,71	2,00	0,764	0,102	0,028	0,568	0,117	0,546
ENSG00000263740	RN7SL4P	70,60	1,88	0,792	0,099	0,015	0,620	0,113	0,286
ENSG00000265735	RN7SL5P	67,06	1,80	0,764	0,103	0,028	0,589	0,116	0,430
ENSG00000239899	RN7SL674P	56,68	1,86	0,785	0,098	0,018	0,563	0,114	0,577
ENSG00000272536	RN7SL840P	1,28	2,12	0,938	0,068	0,007	0,750	0,116	0,069
ENSG00000239390	RN7SL87P	7,34	2,31	0,791	0,105	0,024	0,586	0,131	0,482
ENSG00000212409	RNY4P18	8,96	-1,98	0,720	0,114	0,074			
ENSG00000201377	RNY4P23	25,74	1,64	0,812	0,092	0,009	0,740	0,097	0,033
ENSG00000201218	Y_RNA[1]	2,51	-2,28	0,791	0,100	0,024	0,470	0,130	0,806
ENSG00000201432	Y_RNA[2]	2,66	3,07	0,850	0,102	0,013	0,766	0,145	0,074
ENSG00000201370	Y_RNA[3]	2,91	-1,94	0,764	0,112	0,041	0,714	0,113	0,079
ENSG00000206911	Y_RNA[4]	6,38	-1,97	0,778	0,096	0,021	0,583	0,112	0,458
ENSG00000283691	Y_RNA[5]	7,79	-1,97	0,773	0,105	0,027	0,608	0,119	0,348
ENSG00000207032	Y_RNA[6]	19,14	-2,54	0,771	0,100	0,024	0,539	0,116	0,733
ENSG00000199884	Y_RNA[7]	25,59	-2,01	0,694	0,113	0,106			
ENSG00000223302	Y_RNA[8]	27,86	-3,17	0,931	0,050	0,000	0,639	0,108	0,223
ENSG00000199676	Y_RNA[9]	35,62	-1,80	0,701	0,112	0,094			
ENSG00000201724	Y_RNA[10]	59,88	-1,86	0,813	0,093	0,009	0,483	0,114	0,884
ENSG00000202273	Y_RNA[11]	194,17	-2,09	0,903	0,060	0,001	0,635	0,106	0,227
ENSG00000201483	Y_RNA[12]	528,94	-2,32	0,799	0,094	0,013	0,578	0,111	0,486
ENSG00000265961	Y_RNA[13]	1665,49	-2,08	0,792	0,096	0,015	0,557	0,111	0,610



**ANEXO II – LONG NON-CODING RNAs**

				AUC	SE	p V
<b>ROC (≥2R) no significativa</b>						
ENSG00000241544	LINC02029	6,30	1,37	0,736	0,104	0,
ENSG00000228548	ITPKB-AS1	6,76	1,66	0,735	0,106	0,
ENSG00000228323	MYADM-AS1	22,20	-1,32	0,729	0,106	0,
ENSG00000233178	AL161457.2	11,28	-1,37	0,729	0,104	0,
ENSG00000258334	AC125611.4	28,56	1,27	0,729	0,104	0,
ENSG00000265073	AC010761.2	16,43	-1,30	0,722	0,109	0,
ENSG00000246451	AL049840.2	4,35	1,63	0,733	0,112	0,
ENSG00000260657	AC107871.2	5,61	1,68	0,733	0,108	0,
ENSG00000186056	MATN1-AS1	45,47	1,35	0,708	0,114	0,
ENSG00000189419	SPATA41	3,82	-1,69	0,819	0,088	0,
<b>FC ≥ 1,5</b>						
ENSG00000182912	TSPEAR-AS2	61,45	-5,79	1,000	0,000	0,
ENSG00000261136	AC023908.3	27,56	-14,47	1,000	0,000	0,
ENSG00000248199	AC008877.1	11,28	-4,62	1,000	0,000	0,
ENSG00000253115	AC087672.1	2,74	-4,36	1,000	0,000	0,
ENSG00000267121	AC008105.3	56,79	-4,85	1,000	0,000	0,
ENSG00000258181	AC008083.3	14,12	-6,26	1,000	0,000	0,
ENSG00000266579	FO680682.1	8,54	1,74	1,000	0,000	0,
ENSG00000251438	AC104078.2	46,75	-16,76	1,000	0,000	0,
ENSG00000253627	AC105180.1	56,24	1,65	1,000	0,000	0,
ENSG00000204620	AC115618.1	231,41	1,83	1,000	0,000	0,
ENSG00000271727	AL357054.2	247,67	1,78	1,000	0,000	0,
ENSG00000272288	AL451165.2	7,07	-4,02	1,000	0,000	0,
ENSG00000235152	AL353052.1	54,70	3,12	1,000	0,000	0,
ENSG00000253266	AC100860.1	11,57	2,81	1,000	0,000	0,
ENSG00000244332	AL138759.1	61,86	2,06	1,000	0,000	0,
ENSG00000242107	LINC01100	34,37	1,72	1,000	0,000	0,
ENSG00000261715	LINC01477	29,42	2,06	1,000	0,000	0,
ENSG00000223797	ENTPD3-AS1	100,71	2,05	1,000	0,000	0,



ID	lncRNA	x Expression	Fold Change	CURVAS ROC ≥2R vs OR			CURVAS ROC 1R vs OR		
				AUC	SE	p VALOR	AUC	SE	p VALOR
ENSG00000264031	ABHD15-AS1	118,37	1,10	0,750	0,100	0,038	0,609	0,108	0,330
ENSG00000233420	AC002069.2	9,39	-1,80	0,833	0,086	0,006	0,573	0,111	0,516
ENSG00000257268	AC002375.1	14,35	-1,55	0,868	0,076	0,002	0,611	0,112	0,329
ENSG00000268266	AC003005.2	4,31	-1,56	0,856	0,079	0,004	0,776	0,102	0,022
ENSG00000227930	AC003087.1	12,07	-1,47	0,861	0,083	0,003	0,766	0,092	0,018
ENSG00000273433	AC004080.6	82,62	1,65	0,903	0,069	0,001	0,714	0,099	0,057
ENSG00000237019	AC004470.1	30,52	1,33	0,847	0,083	0,004	0,615	0,107	0,307
ENSG00000241345	AC004690.2	10,50	1,55	0,799	0,091	0,013	0,571	0,115	0,537
ENSG00000278920	AC005005.4	5,92	1,41	0,792	0,101	0,021	0,769	0,093	0,023
ENSG00000267421	AC005498.2	48,17	-1,32	0,819	0,087	0,008	0,807	0,081	0,006
ENSG00000269696	AC005498.3	8,85	1,61	0,806	0,092	0,011	0,767	0,099	0,019
ENSG00000263879	AC005670.3	100,14	-1,32	0,889	0,066	0,001	0,594	0,110	0,403
ENSG00000267131	AC005746.2	70,52	-1,17	0,778	0,097	0,021	0,510	0,113	0,926
ENSG00000235415	AC005808.1	15,95	-2,34	0,972	0,028	0,000	0,703	0,099	0,070
ENSG00000226797	AC005828.1	17,51	1,46	0,806	0,091	0,011	0,776	0,089	0,014
ENSG00000263644	AC005828.3	41,29	1,35	0,826	0,086	0,007	0,661	0,104	0,150
ENSG00000255775	AC005845.1	13,06	-1,42	0,792	0,093	0,015	0,567	0,114	0,558
ENSG00000279762	AC005899.8	14,37	1,36	0,799	0,092	0,013	0,536	0,111	0,745
ENSG00000267191	AC006213.3	22,92	1,82	0,848	0,092	0,005	0,767	0,093	0,020
ENSG00000236572	AC006369.2	3,61	3,26	0,929	0,070	0,001	0,583	0,134	0,522
ENSG00000259628	AC007000.4	74,91	1,24	0,937	0,047	0,000	0,646	0,106	0,194
ENSG00000267055	AC007001.1	47,47	-1,28	0,750	0,100	0,038	0,756	0,095	0,025
ENSG00000231609	AC007098.1	9,94	-1,73	0,795	0,100	0,016	0,776	0,099	0,018
ENSG00000224063	AC007319.1	197,28	-1,13	0,792	0,098	0,015	0,609	0,109	0,330
ENSG00000231918	AC007402.1	559,28	1,30	1,000	0,000	0,000	0,615	0,108	0,307
ENSG00000263499	AC007431.1	8,52	1,87	0,833	0,090	0,007	0,817	0,085	0,005
ENSG00000261369	AC007533.1	42,40	2,04	0,819	0,085	0,008	0,656	0,109	0,164
ENSG00000236886	AC007563.2	211,02	1,09	0,785	0,094	0,018	0,651	0,106	0,178
ENSG00000205414	AC007608.1	5,22	1,48	0,818	0,090	0,011	0,539	0,116	0,736
ENSG00000236754	AC007666.1	7,10	-1,43	0,826	0,084	0,007	0,500	0,111	1,000
ENSG00000257261	AC008014.1	274,88	-1,14	0,764	0,099	0,028	0,594	0,115	0,403
ENSG00000257925	AC008083.2	23,16	-2,74	0,979	0,023	0,000	0,766	0,093	0,018
ENSG00000258181	AC008083.3	14,12	-6,26	1,000	0,000	0,000	0,696	0,107	0,090
ENSG00000233175	AC008105.1	3,60	-1,56	0,791	0,100	0,024	0,667	0,109	0,154
ENSG00000267121	AC008105.3	56,79	-4,85	1,000	0,000	0,000	0,724	0,096	0,046
ENSG00000253348	AC008514.1	25,50	-1,37	0,792	0,097	0,015	0,661	0,103	0,150
ENSG00000267375	AC008649.2	4,98	1,81	0,867	0,082	0,004	0,807	0,090	0,011
ENSG00000249881	AC008696.2	204,27	1,37	0,799	0,092	0,013	0,729	0,098	0,041
ENSG00000267580	AC008738.3	9,35	-2,11	0,882	0,072	0,001	0,628	0,112	0,262
ENSG00000267650	AC008742.1	4,90	1,58	0,795	0,096	0,016	0,728	0,099	0,045
ENSG00000250240	AC008840.1	63,99	2,22	0,910	0,059	0,001	0,630	0,107	0,246
ENSG00000248199	AC008877.1	11,28	-4,62	1,000	0,000	0,000	0,745	0,093	0,029
ENSG00000247372	AC008897.2	12,99	-1,50	0,864	0,078	0,003	0,531	0,112	0,781
ENSG00000260927	AC009107.2	11,58	-1,27	0,819	0,088	0,008	0,688	0,105	0,095
ENSG00000260999	AC009137.1	30,84	-1,33	0,785	0,095	0,018	0,818	0,085	0,005
ENSG00000261523	AC009167.1	5,18	3,70	0,795	0,098	0,016	0,606	0,113	0,364
ENSG00000261523	AC009167.1	5,18	1,64	0,795	0,101	0,016	0,747	0,102	0,037
ENSG00000229195	AC009495.1	12,83	1,23	0,811	0,095	0,012	0,563	0,114	0,587
ENSG00000254847	AC009806.1	13,87	-1,63	0,785	0,098	0,018	0,589	0,112	0,430
ENSG00000250694	AC010387.1	7,33	-1,61	0,778	0,097	0,021	0,521	0,116	0,853
ENSG00000269091	AC010624.3	14,47	-1,35	0,785	0,097	0,018	0,728	0,104	0,045
ENSG00000265073	AC010761.2	16,43	-1,30	0,722	0,109	0,065			
ENSG00000270087	AC010997.3	671,98	-1,33	0,882	0,075	0,001	0,578	0,111	0,486
ENSG00000253695	AC011008.1	4,45	-1,61	0,764	0,098	0,028	0,656	0,105	0,164
ENSG00000229618	AC011287.1	377,30	1,13	0,785	0,094	0,018	0,656	0,104	0,164
ENSG00000272180	AC011306.1	197,31	1,20	0,875	0,085	0,002	0,510	0,115	0,926
ENSG00000253925	AC011369.1	97,30	1,46	0,986	0,018	0,000	0,615	0,112	0,307
ENSG00000269534	AC011466.3	11,89	1,90	0,875	0,081	0,002	0,573	0,112	0,516
ENSG00000253706	AC011632.1	53,07	1,43	0,972	0,031	0,000	0,651	0,108	0,178
ENSG00000275638	AC011939.3	11,69	1,60	0,757	0,103	0,033	0,572	0,119	0,526
ENSG00000227252	AC012063.1	30,09	1,42	0,889	0,072	0,001	0,656	0,110	0,164
ENSG00000260071	AC012178.1	56,07	2,15	0,979	0,025	0,000	0,557	0,112	0,610
ENSG00000267437	AC012309.2	75,57	-1,87	0,889	0,071	0,001	0,698	0,105	0,078
ENSG00000225166	AC012462.1	7,09	1,93	0,917	0,059	0,001	0,799	0,091	0,015
ENSG00000226994	AC012593.1	466,44	1,49	0,937	0,047	0,000	0,792	0,085	0,009
ENSG00000259368	AC013356.4	1,51	-1,77	0,822	0,105	0,018	0,910	0,073	0,002
ENSG00000229727	AC013460.1	22,59	-1,41	0,840	0,081	0,005	0,724	0,104	0,046
ENSG00000259447	AC013652.2	4,33	-2,08	0,843	0,085	0,006	0,675	0,109	0,139

ID	lncRNA	x̄ Expression	Fold Change	CURVAS ROC ≥2R vs OR			CURVAS ROC 1R vs OR		
				AUC	SE	p VALOR	AUC	SE	p VALOR
ENSG00000275016	AC015574.1	157,67	1,19	0,757	0,100	0,033	0,620	0,110	0,286
ENSG00000251199	AC015631.1	54,95	1,94	0,986	0,018	0,000	0,599	0,114	0,378
ENSG00000278911	AC015819.3	6,43	-1,64	0,778	0,096	0,021	0,604	0,112	0,353
ENSG00000267521	AC016168.1	9,39	-1,83	0,778	0,105	0,021	0,734	0,097	0,037
ENSG00000267039	AC016493.1	7,91	-1,65	0,819	0,087	0,008	0,539	0,116	0,733
ENSG00000271889	AC016747.2	13,80	1,50	0,833	0,091	0,006	0,771	0,091	0,016
ENSG00000274769	AC016747.4	26,60	1,94	0,826	0,089	0,007	0,885	0,070	0,001
ENSG00000263798	AC018521.1	25,09	-1,30	0,757	0,102	0,033	0,755	0,097	0,023
ENSG00000277559	AC018553.1	5,05	-1,36	0,771	0,099	0,024	0,644	0,107	0,205
ENSG00000236885	AC018731.1	52,86	-1,25	0,868	0,072	0,002	0,760	0,092	0,020
ENSG00000228351	AC018832.1	10,82	-1,46	0,785	0,096	0,018	0,688	0,102	0,095
ENSG00000236760	AC019118.2	15,92	-1,34	0,799	0,107	0,013	0,703	0,105	0,070
ENSG00000263923	AC019131.1	61,41	-1,26	0,806	0,089	0,011	0,609	0,112	0,330
ENSG00000219445	AC019155.2	21,78	-1,38	0,799	0,091	0,013	0,604	0,112	0,353
ENSG00000236283	AC019197.1	137,88	-1,13	0,785	0,097	0,018	0,557	0,114	0,610
ENSG00000265511	AC020558.2	38,36	-1,32	0,792	0,098	0,015	0,760	0,095	0,020
ENSG00000259198	AC020658.2	2,58	1,44	0,824	0,107	0,013	0,508	0,126	0,950
ENSG00000221857	AC020907.2	18,57	-1,29	0,750	0,102	0,038	0,729	0,095	0,041
ENSG00000261434	AC021087.4	6,37	-1,70	0,833	0,086	0,007	0,662	0,111	0,171
ENSG00000186019	AC021092.1	2,38	1,71	0,785	0,101	0,023	0,614	0,122	0,356
ENSG00000230747	AC021188.1	58,04	-1,42	0,806	0,092	0,011	0,615	0,109	0,307
ENSG00000267506	AC021683.2	13,69	-1,29	0,750	0,107	0,038	0,682	0,102	0,104
ENSG00000268873	AC022601.1	15,48	1,80	0,917	0,061	0,001	0,622	0,110	0,283
ENSG00000261632	AC022872.1	26,48	1,57	0,962	0,035	0,000	0,534	0,116	0,767
ENSG00000257262	AC023511.1	15,38	1,37	0,803	0,094	0,014	0,642	0,108	0,217
ENSG00000248576	AC023794.1	3,98	1,70	0,757	0,104	0,033	0,507	0,128	0,954
ENSG00000259580	AC023908.2	36,51	-5,18	0,993	0,011	0,000	0,833	0,075	0,003
ENSG00000261136	AC023908.3	27,56	-14,47	1,000	0,000	0,000	0,828	0,078	0,003
ENSG00000258096	AC025031.2	10,75	1,75	0,785	0,096	0,018	0,550	0,113	0,661
ENSG00000267416	AC025048.4	9,90	2,12	0,917	0,056	0,001	0,551	0,113	0,657
ENSG00000215068	AC025171.2	10,21	1,94	0,902	0,065	0,001	0,716	0,100	0,061
ENSG00000259992	AC025287.1	46,97	-1,33	0,785	0,098	0,018	0,646	0,113	0,194
ENSG00000250961	AC025470.2	113,67	-1,19	0,771	0,096	0,024	0,693	0,104	0,086
ENSG00000255817	AC025576.2	3,56	1,66	0,875	0,089	0,005	0,750	0,112	0,064
ENSG00000225798	AC025918.1	7,93	2,91	0,975	0,029	0,000	0,620	0,121	0,318
ENSG00000226990	AC025946.1	23,30	1,30	0,799	0,097	0,013	0,786	0,092	0,011
ENSG00000249941	AC026415.1	9,12	-1,47	0,840	0,086	0,005	0,628	0,110	0,262
ENSG00000259827	AC026461.1	15,68	-1,26	0,757	0,100	0,033	0,833	0,077	0,003
ENSG00000248533	AC034226.1	4,17	-2,18	0,856	0,079	0,004	0,755	0,103	0,034
ENSG00000267390	AC036176.1	22,67	1,41	0,799	0,091	0,013	0,563	0,114	0,577
ENSG00000261502	AC040174.1	28,34	1,40	0,833	0,087	0,006	0,703	0,102	0,070
ENSG00000267762	AC048380.1	12,93	1,34	0,795	0,101	0,016	0,630	0,114	0,264
ENSG00000251536	AC055717.1	14,27	-1,64	0,806	0,095	0,011	0,740	0,101	0,033
ENSG00000236665	AC060234.2	10,73	1,51	0,799	0,090	0,013	0,542	0,112	0,710
ENSG00000267745	AC060766.7	2,95	-1,97	0,864	0,079	0,005	0,678	0,114	0,140
ENSG00000269072	AC063977.6	27,51	1,26	0,771	0,096	0,024	0,557	0,113	0,610
ENSG00000253844	AC064807.2	30,43	-1,40	0,826	0,092	0,007	0,547	0,114	0,676
ENSG00000254136	AC064807.3	13,69	-2,33	0,931	0,050	0,000	0,620	0,108	0,286
ENSG00000267287	AC068473.3	14,19	2,32	0,833	0,082	0,006	0,651	0,107	0,178
ENSG00000229118	AC068491.2	15,94	1,56	0,882	0,081	0,001	0,776	0,091	0,014
ENSG00000283674	AC068587.4	78,57	-1,24	0,833	0,091	0,006	0,698	0,108	0,078
ENSG00000243276	AC068633.1	265,12	-1,15	0,792	0,096	0,015	0,552	0,114	0,642
ENSG00000237473	AC068759.1	88,84	1,36	0,868	0,077	0,002	0,594	0,122	0,403
ENSG00000260473	AC068987.2	67,69	-1,43	0,944	0,045	0,000	0,724	0,097	0,046
ENSG00000227769	AC072062.1	28,91	-1,41	0,938	0,052	0,000	0,724	0,097	0,046
ENSG00000261570	AC073878.1	14,06	-1,48	0,743	0,103	0,043	0,589	0,111	0,430
ENSG00000240057	AC078785.1	103,72	1,20	0,840	0,091	0,005	0,828	0,084	0,003
ENSG00000256072	AC078889.1	9,46	-1,48	0,757	0,104	0,033	0,694	0,105	0,088
ENSG00000232633	AC079465.1	47,20	-1,80	0,910	0,063	0,001	0,781	0,091	0,012
ENSG00000267537	AC079466.2	26,54	-1,27	0,840	0,085	0,005	0,557	0,111	0,610
ENSG00000235450	AC079760.1	122,80	1,33	0,937	0,052	0,000	0,547	0,114	0,676
ENSG00000243144	AC079760.2	132,07	1,31	0,972	0,028	0,000	0,630	0,108	0,246
ENSG00000240207	AC080013.1	28,88	-1,27	0,819	0,094	0,008	0,703	0,101	0,070
ENSG00000253196	AC083841.1	7,26	-1,77	0,778	0,104	0,021	0,562	0,112	0,577
ENSG00000253190	AC084082.1	67,99	1,37	0,799	0,094	0,013	0,687	0,101	0,095
ENSG00000254431	AC084083.1	1,73	1,56	0,788	0,114	0,041	0,677	0,125	0,154
ENSG00000254001	AC084706.1	9,04	1,65	0,917	0,065	0,001	0,597	0,117	0,402
ENSG00000259276	AC087286.1	7,94	1,85	0,780	0,098	0,023	0,568	0,115	0,554

ID	lncRNA	x̄ Expression	Fold Change	CURVAS ROC ≥2R vs OR			CURVAS ROC 1R vs OR		
				AUC	SE	p VALOR	AUC	SE	p VALOR
ENSG00000259367	AC087286.2	22,24	1,51	0,841	0,083	0,006	0,602	0,110	0,374
ENSG00000265644	AC087399.1	5,33	-1,86	0,811	0,094	0,012	0,661	0,111	0,169
ENSG00000250007	AC087457.1	102,44	1,51	0,965	0,037	0,000	0,536	0,112	0,745
ENSG00000253115	AC087672.1	2,74	-4,36	1,000	0,000	0,001	0,744	0,115	0,053
ENSG00000248532	AC090138.1	17,17	-1,29	0,813	0,095	0,009	0,682	0,103	0,104
ENSG00000267202	AC090386.1	6,51	-1,53	0,758	0,104	0,036	0,727	0,101	0,052
ENSG00000264151	AC090403.1	117,90	1,18	0,833	0,082	0,006	0,552	0,111	0,642
ENSG00000255197	AC090559.1	64,67	-4,40	0,986	0,018	0,000	0,781	0,091	0,012
ENSG00000255542	AC090625.2	4,98	2,09	0,871	0,085	0,003	0,552	0,120	0,661
ENSG00000259755	AC090907.2	55,85	-1,29	0,764	0,098	0,028	0,651	0,112	0,178
ENSG00000265943	AC090912.1	115,51	-1,12	0,778	0,098	0,021	0,745	0,104	0,029
ENSG00000248537	AC091906.1	58,20	-1,66	0,931	0,068	0,000	0,740	0,101	0,033
ENSG00000276791	AC092117.1	8,35	1,88	0,800	0,096	0,018	0,707	0,107	0,086
ENSG00000260237	AC092130.1	5,96	-1,92	0,793	0,100	0,020	0,699	0,102	0,084
ENSG00000259846	AC092131.1	121,98	1,35	0,944	0,045	0,000	0,677	0,109	0,114
ENSG00000259006	AC092143.2	13,04	-1,74	0,882	0,069	0,001	0,683	0,107	0,107
ENSG00000226833	AC092164.1	30,32	-1,41	0,743	0,107	0,043	0,552	0,119	0,642
ENSG00000251652	AC092535.4	17,27	-1,37	0,771	0,100	0,024	0,510	0,113	0,926
ENSG00000249988	AC092546.1	48,52	-1,41	0,840	0,083	0,005	0,740	0,108	0,033
ENSG00000249036	AC092674.1	68,67	-1,28	0,875	0,075	0,002	0,698	0,101	0,078
ENSG00000239922	AC092958.1	21,52	-1,32	0,750	0,102	0,038	0,703	0,100	0,070
ENSG00000284600	AC093390.2	177,74	-1,31	0,854	0,084	0,003	0,724	0,102	0,046
ENSG00000269292	AC093503.1	10,15	1,31	0,788	0,099	0,021	0,557	0,113	0,610
ENSG00000249001	AC093895.1	106,85	1,67	0,931	0,053	0,000	0,661	0,103	0,150
ENSG00000246541	AC096746.1	26,80	-1,22	0,778	0,103	0,021	0,542	0,114	0,710
ENSG00000251460	AC097381.2	23,96	-1,60	0,868	0,077	0,002	0,661	0,106	0,157
ENSG00000250657	AC097451.1	6,91	-1,81	0,841	0,093	0,006	0,721	0,110	0,058
ENSG00000228162	AC097713.1	9,77	-1,49	0,813	0,093	0,009	0,594	0,112	0,407
ENSG00000234378	AC098828.1	34,81	-1,26	0,819	0,089	0,008	0,557	0,116	0,610
ENSG00000267112	AC098848.1	5,34	-2,20	0,840	0,084	0,005	0,778	0,095	0,015
ENSG00000224127	AC099786.1	8,54	-1,35	0,778	0,096	0,021	0,594	0,108	0,403
ENSG00000231252	AC099792.1	166,74	-1,31	0,840	0,084	0,005	0,552	0,117	0,642
ENSG00000267042	AC100793.2	14,13	-1,61	0,833	0,093	0,007	0,652	0,112	0,217
ENSG00000253775	AC100802.1	27,66	1,25	0,826	0,089	0,008	0,557	0,113	0,622
ENSG00000253266	AC100860.1	11,57	2,81	1,000	0,000	0,000	0,591	0,117	0,430
ENSG00000259123	AC103996.3	6,89	-1,77	0,750	0,103	0,038	0,583	0,112	0,464
ENSG00000251438	AC104078.2	46,75	-16,76	1,000	0,000	0,000	0,688	0,104	0,095
ENSG00000230623	AC104461.1	60,76	-1,18	0,771	0,098	0,024	0,516	0,111	0,889
ENSG00000261451	AC104964.2	1,82	-2,16	0,860	0,087	0,007	0,829	0,084	0,007
ENSG00000276744	AC105137.2	1,83	-2,48	0,903	0,076	0,005	0,838	0,089	0,008
ENSG00000253627	AC105180.1	56,24	1,65	1,000	0,000	0,000	0,661	0,104	0,150
ENSG00000281856	AC106017.2	5,16	1,66	0,788	0,097	0,019	0,697	0,117	0,092
ENSG00000241280	AC106712.1	8,86	-1,39	0,771	0,106	0,024	0,583	0,111	0,458
ENSG00000260657	AC107871.2	5,61	1,68	0,733	0,108	0,065			
ENSG00000261889	AC108134.2	77,51	2,02	0,972	0,028	0,000	0,599	0,111	0,378
ENSG00000260853	AC109460.2	10,14	-1,77	0,750	0,103	0,038	0,688	0,105	0,095
ENSG00000255029	AC110058.1	25,60	1,71	0,958	0,043	0,000	0,615	0,110	0,307
ENSG00000204620	AC115618.1	231,41	1,83	1,000	0,000	0,000	0,641	0,113	0,210
ENSG00000262921	AC118754.2	8,04	1,74	0,758	0,104	0,036	0,567	0,116	0,558
ENSG00000253535	AC120193.1	241,57	1,13	0,833	0,084	0,006	0,578	0,111	0,486
ENSG00000248949	AC122719.1	7,52	-1,45	0,792	0,099	0,015	0,744	0,104	0,032
ENSG00000262728	AC123768.2	8,51	1,42	0,788	0,102	0,019	0,693	0,102	0,093
ENSG00000257654	AC125603.1	3,40	1,90	0,775	0,106	0,030	0,700	0,114	0,114
ENSG00000258334	AC125611.4	28,56	1,27	0,729	0,104	0,057			
ENSG00000260978	AC126407.1	6,44	-1,97	0,860	0,078	0,004	0,750	0,096	0,030
ENSG00000265443	AC127024.3	3,40	2,12	0,808	0,103	0,020	0,607	0,115	0,387
ENSG00000241168	AC128685.1	91,59	2,07	0,965	0,033	0,000	0,526	0,125	0,816
ENSG00000259925	AC130456.2	29,77	-1,41	0,799	0,100	0,013	0,563	0,119	0,577
ENSG00000261193	AC134312.4	50,80	-1,59	0,833	0,092	0,006	0,635	0,107	0,227
ENSG00000261693	AC134682.1	4,01	-1,65	0,785	0,104	0,023	0,709	0,104	0,073
ENSG00000262766	AC135050.5	3,70	1,92	0,793	0,099	0,020	0,624	0,117	0,287
ENSG00000268931	AC136469.1	3,93	1,75	0,769	0,101	0,033	0,675	0,110	0,139
ENSG00000238035	AC138035.1	5,22	-2,23	0,833	0,085	0,007	0,589	0,110	0,430
ENSG00000250855	AC139718.2	13,81	-1,40	0,813	0,092	0,009	0,510	0,112	0,926
ENSG00000253917	AC226119.1	28,11	-1,60	0,806	0,091	0,011	0,771	0,095	0,016
ENSG00000227139	AC241644.1	3,36	1,48	0,792	0,112	0,021	0,564	0,133	0,622
ENSG00000233030	AC243772.2	5,89	1,73	0,788	0,104	0,019	0,584	0,118	0,477
ENSG00000224481	AC245100.1	13,39	-1,40	0,806	0,096	0,011	0,510	0,112	0,926
ENSG00000282142	AC245187.2	7,50	-1,67	0,757	0,107	0,033	0,661	0,107	0,150
ENSG00000283907	AD000090.1	613,00	1,19	0,861	0,080	0,003	0,708	0,100	0,063

ID	lncRNA	x̄ Expression	Fold Change	CURVAS ROC ≥2R vs OR			CURVAS ROC 1R vs OR		
				AUC	SE	p VALOR	AUC	SE	p VALOR
ENSG00000249421	ADAMTS19-AS1	1,94	2,06	0,800	0,100	0,020	0,558	0,127	0,644
ENSG00000263335	AF001548.2	449,39	-1,45	0,896	0,069	0,001	0,656	0,107	0,164
ENSG00000235888	AF064858.1	12,72	1,90	0,833	0,084	0,007	0,778	0,090	0,016
ENSG00000259103	AF107885.2	8,15	1,54	0,758	0,104	0,036	0,659	0,112	0,167
ENSG00000225623	AGBL4-IT1	30,61	-1,27	0,778	0,095	0,021	0,719	0,100	0,051
ENSG00000262668	AJ003147.2	566,15	1,80	0,833	0,087	0,006	0,797	0,091	0,008
ENSG00000234083	AJ006995.1	7,87	1,46	0,803	0,096	0,014	0,602	0,109	0,374
ENSG00000282740	AL021920.3	46,46	1,54	0,826	0,087	0,007	0,740	0,099	0,033
ENSG00000225311	AL024474.2	18,71	1,84	0,932	0,054	0,000	0,655	0,111	0,186
ENSG00000222044	AL031587.1	3,63	-1,89	0,856	0,084	0,004	0,655	0,111	0,181
ENSG00000232294	AL031674.1	14,14	-2,77	0,910	0,062	0,001	0,771	0,096	0,016
ENSG00000235189	AL034405.1	78,93	1,19	0,861	0,076	0,003	0,661	0,103	0,150
ENSG00000231769	AL035701.1	16,48	-2,56	0,910	0,066	0,001	0,928	0,055	0,000
ENSG00000234084	AL049552.1	1,96	2,24	0,856	0,087	0,009	0,544	0,140	0,744
ENSG00000234688	AL049749.1	26,54	-1,51	0,813	0,092	0,009	0,521	0,114	0,853
ENSG00000259166	AL049836.2	12,51	1,35	0,788	0,097	0,019	0,670	0,105	0,139
ENSG00000246451	AL049840.2	4,35	1,63	0,733	0,112	0,065			
ENSG00000227486	AL050309.1	25,22	1,22	0,771	0,100	0,024	0,703	0,104	0,070
ENSG00000259111	AL079307.2	16,45	1,84	0,886	0,075	0,002	0,727	0,103	0,052
ENSG00000274949	AL109804.1	9,55	-1,61	0,803	0,092	0,014	0,653	0,106	0,183
ENSG00000234519	AL109924.2	14,78	-2,45	0,972	0,031	0,000	0,698	0,099	0,078
ENSG00000276627	AL117372.1	7,63	1,95	0,795	0,098	0,016	0,600	0,112	0,380
ENSG00000274379	AL121612.1	4,61	-1,59	0,810	0,093	0,014	0,764	0,101	0,024
ENSG00000203900	AL121827.1	13,55	1,26	0,785	0,094	0,018	0,771	0,090	0,016
ENSG00000272009	AL121944.2	3,99	-1,87	0,802	0,094	0,017	0,739	0,102	0,040
ENSG00000235122	AL121974.1	2,56	1,71	0,789	0,109	0,034	0,829	0,091	0,010
ENSG00000273828	AL133227.1	28,76	-1,37	0,944	0,050	0,000	0,609	0,109	0,330
ENSG00000275139	AL133492.1	7,20	-1,58	0,785	0,095	0,018	0,633	0,109	0,242
ENSG00000258982	AL133523.1	43,69	-1,31	0,833	0,084	0,006	0,724	0,098	0,046
ENSG00000227240	AL136456.1	24,92	2,81	0,889	0,069	0,001	0,630	0,106	0,246
ENSG00000259093	AL137191.1	5,69	1,85	0,833	0,085	0,007	0,727	0,101	0,052
ENSG00000236911	AL137789.1	13,94	1,42	0,826	0,088	0,008	0,813	0,083	0,007
ENSG00000244332	AL138759.1	61,86	2,06	1,000	0,000	0,000	0,589	0,111	0,430
ENSG00000233589	AL138789.1	5,55	-2,05	0,750	0,106	0,038	0,601	0,115	0,382
ENSG00000248458	AL139147.1	4,98	2,41	0,962	0,035	0,000	0,688	0,107	0,112
ENSG00000132832	AL139352.1	31,72	1,23	0,764	0,097	0,028	0,557	0,112	0,061
ENSG00000283573	AL157371.2	102,78	-1,24	0,819	0,090	0,008	0,776	0,091	0,014
ENSG00000237422	AL158071.3	38,80	-1,35	0,861	0,092	0,003	0,750	0,098	0,026
ENSG00000204055	AL158151.1	91,21	-1,14	0,840	0,083	0,005	0,521	0,115	0,853
ENSG00000223342	AL158817.1	31,89	-1,35	0,868	0,072	0,002	0,724	0,097	0,046
ENSG00000258422	AL160191.1	19,78	1,27	0,764	0,098	0,028	0,536	0,112	0,745
ENSG00000233178	AL161457.2	11,28	-1,37	0,729	0,104	0,057			
ENSG00000258789	AL162171.1	4,27	1,77	0,818	0,093	0,011	0,630	0,113	0,274
ENSG00000235152	AL353052.1	54,70	3,12	1,000	0,000	0,000	0,599	0,111	0,378
ENSG00000224764	AL353768.1	17,78	-2,12	0,818	0,099	0,010	0,806	0,092	0,009
ENSG00000228142	AL354861.2	73,08	-1,23	0,785	0,097	0,018	0,807	0,089	0,006
ENSG00000268926	AL354861.3	1,98	2,45	0,950	0,043	0,000	0,643	0,116	0,242
ENSG00000228352	AL354989.1	7,57	1,52	0,773	0,100	0,027	0,758	0,096	0,027
ENSG00000258793	AL355102.4	11,33	-2,18	0,856	0,079	0,004	0,673	0,107	0,139
ENSG00000258784	AL355773.1	17,77	-1,56	0,879	0,071	0,002	0,648	0,108	0,199
ENSG00000271727	AL357054.2	247,67	1,78	1,000	0,000	0,000	0,635	0,108	0,227
ENSG00000258751	AL358335.2	30,50	-1,23	0,799	0,095	0,013	0,604	0,112	0,353
ENSG00000277757	AL358394.3	281,04	-1,48	1,000	0,000	0,000	0,646	0,106	0,194
ENSG00000230289	AL358781.2	13,57	-1,38	0,826	0,096	0,007	0,552	0,112	0,642
ENSG00000277797	AL359693.1	3,24	1,66	0,861	0,101	0,006	0,624	0,124	0,333
ENSG00000260390	AL360014.1	13,45	-1,47	0,743	0,102	0,043	0,766	0,092	0,018
ENSG00000274023	AL360169.2	168,72	-1,11	0,771	0,100	0,024	0,667	0,103	0,137
ENSG00000277047	AL390964.1	18,50	1,36	0,792	0,094	0,015	0,528	0,116	0,807
ENSG00000232993	AL445183.1	23,53	1,49	0,819	0,090	0,008	0,667	0,104	0,137
ENSG00000233656	AL445430.1	42,02	-1,52	0,896	0,071	0,001	0,714	0,101	0,057
ENSG00000228487	AL450263.1	5,61	-1,67	0,811	0,093	0,012	0,606	0,112	0,364
ENSG00000261055	AL450468.2	312,19	-1,35	0,868	0,081	0,002	0,552	0,112	0,642
ENSG00000272288	AL451165.2	7,07	-4,02	1,000	0,000	0,000	0,607	0,115	0,355
ENSG00000227050	AL512288.1	52,17	1,56	0,826	0,094	0,007	0,667	0,107	0,137
ENSG00000224972	AL513412.1	25,42	-1,34	0,833	0,090	0,006	0,771	0,093	0,016
ENSG00000225325	AL583804.1	25,64	1,32	0,765	0,102	0,031	0,614	0,112	0,324
ENSG00000232295	AL589935.1	118,16	1,94	0,896	0,068	0,001	0,630	0,107	0,246
ENSG00000231073	AL590133.1	8,83	-1,91	0,818	0,091	0,010	0,691	0,114	0,102
ENSG00000260509	AL590787.1	2,50	2,12	0,844	0,094	0,011	0,679	0,128	0,172
ENSG00000238287	AL603839.3	10,21	1,83	0,848	0,081	0,005	0,867	0,071	0,002

ID	lncRNA	x̄ Expression	Fold Change	CURVAS ROC ≥2R vs OR			CURVAS ROC 1R vs OR		
				AUC	SE	p VALOR	AUC	SE	p VALOR
ENSG00000224417	AL606970.1	4,79	-1,70	0,826	0,086	0,008	0,715	0,102	0,065
ENSG00000272106	AL691432.2	11,70	-1,38	0,840	0,086	0,005	0,683	0,105	0,107
ENSG00000237283	AL691515.1	11,96	1,29	0,792	0,106	0,021	0,556	0,114	0,635
ENSG00000225006	AL929288.1	10,07	-1,52	0,799	0,095	0,013	0,739	0,100	0,036
ENSG00000230212	AP000688.1	37,44	-1,45	0,910	0,059	0,001	0,734	0,095	0,037
ENSG00000236119	AP000688.3	12,99	-1,73	0,792	0,094	0,015	0,739	0,098	0,036
ENSG00000245498	AP000866.1	146,15	-1,38	0,861	0,074	0,003	0,781	0,089	0,012
ENSG00000255129	AP000880.1	18,81	-1,48	0,882	0,076	0,001	0,630	0,108	0,246
ENSG00000184441	AP001062.1	5,63	-1,75	0,833	0,089	0,008	0,636	0,114	0,266
ENSG00000255468	AP001107.9	56,24	-2,00	0,819	0,092	0,008	0,611	0,111	0,329
ENSG00000256690	AP001160.1	20,63	-1,44	0,889	0,083	0,001	0,711	0,110	0,064
ENSG00000257058	AP001363.2	19,40	1,62	0,882	0,071	0,001	0,620	0,110	0,286
ENSG00000231236	AP001605.1	32,19	1,36	0,785	0,094	0,018	0,682	0,107	0,104
ENSG00000255523	AP001652.1	5,05	1,57	0,848	0,087	0,005	0,855	0,079	0,002
ENSG00000254990	AP001781.1	6,03	-1,94	0,947	0,045	0,000	0,669	0,109	0,155
ENSG00000254733	AP001831.1	148,48	1,19	0,868	0,082	0,002	0,599	0,112	0,378
ENSG00000251309	AP002075.1	23,66	1,41	0,799	0,093	0,013	0,604	0,110	0,353
ENSG00000255467	AP002433.1	9,21	-1,92	0,910	0,057	0,001	0,561	0,118	0,591
ENSG00000255028	AP003049.2	96,03	1,38	0,938	0,047	0,000	0,641	0,108	0,210
ENSG00000256733	AP003721.2	8,44	-1,60	0,833	0,085	0,007	0,639	0,111	0,223
ENSG00000266268	AP005203.1	200,63	1,60	0,840	0,087	0,005	0,776	0,092	0,014
ENSG00000267069	AP005264.1	11,33	3,41	0,977	0,025	0,000	0,557	0,112	0,622
ENSG00000235910	APOA1-AS	11,86	1,47	0,792	0,093	0,015	0,550	0,116	0,661
ENSG00000214293	APTR	17,34	-1,27	0,764	0,099	0,028	0,589	0,110	0,430
ENSG00000253320	AZIN1-AS1	65,68	-1,17	0,792	0,095	0,015	0,563	0,111	0,577
ENSG00000235335	B3GALT1-AS1	108,75	-1,13	0,854	0,081	0,003	0,792	0,085	0,009
ENSG00000258057	BCDIN3D-AS1	8,07	2,04	0,902	0,076	0,001	0,517	0,116	0,882
ENSG00000265096	C1QTNF1-AS1	5,50	1,92	0,871	0,076	0,003	0,782	0,090	0,016
ENSG00000253773	C8orf37-AS1	706,12	1,19	0,785	0,105	0,018	0,578	0,111	0,486
ENSG00000243715	CACNA2D3-AS1	33,28	-1,33	0,757	0,107	0,033	0,698	0,104	0,078
ENSG00000268001	CARD8-AS1	364,38	-1,37	0,979	0,025	0,000	0,807	0,082	0,006
ENSG00000233766	CAVIN2-AS1	222,86	1,14	0,854	0,079	0,003	0,620	0,109	0,286
ENSG00000279968	CCDC28A-AS1	22,60	-1,56	0,799	0,096	0,013	0,667	0,105	0,137
ENSG00000224043	CCNT2-AS1	70,78	1,19	0,826	0,086	0,007	0,719	0,097	0,051
ENSG00000277449	CEBPB-AS1	7,04	-1,77	0,848	0,082	0,005	0,733	0,097	0,043
ENSG00000241832	CECR3	8,56	1,37	0,778	0,095	0,021	0,536	0,112	0,745
ENSG00000242428	CFAP20DC-AS1	79,37	-1,36	0,819	0,086	0,008	0,656	0,113	0,164
ENSG00000257127	CLLU1	3,50	1,88	0,824	0,095	0,013	0,684	0,118	0,151
ENSG00000245694	CRNDE	49,75	-1,23	0,861	0,076	0,003	0,688	0,106	0,095
ENSG00000226562	CYP4F26P	22,30	-1,19	0,764	0,102	0,028	0,547	0,117	0,676
ENSG00000176124	DLEU1	331,00	1,16	0,792	0,107	0,015	0,667	0,105	0,137
ENSG00000231764	DLX6-AS1	77,80	1,29	0,840	0,084	0,005	0,646	0,110	0,194
ENSG00000224165	DNAJC27-AS1	54,83	-2,34	0,993	0,011	0,000	0,802	0,084	0,007
ENSG00000233756	DSCAM-IT1	40,94	-1,44	0,813	0,088	0,009	0,661	0,106	0,150
ENSG00000243701	DUBR	39,53	-1,35	0,868	0,072	0,002	0,599	0,109	0,378
ENSG00000228237	EFCAB14-AS1	104,33	-1,27	0,778	0,095	0,021	0,609	0,109	0,330
ENSG00000224057	EGFR-AS1	11,10	-2,01	0,871	0,083	0,003	0,921	0,053	0,000
ENSG00000236081	ELFN1-AS1	4,34	1,66	0,778	0,095	0,021	0,565	0,118	0,572
ENSG00000223797	ENTPD3-AS1	100,71	2,05	1,000	0,000	0,000	0,521	0,118	0,853
ENSG00000234690	EPCAM-DT	88,68	1,26	0,819	0,090	0,008	0,568	0,111	0,546
ENSG00000253893	FAM85B	37,85	-1,29	0,833	0,086	0,006	0,734	0,095	0,037
ENSG00000268388	FENDRR	109,52	1,22	0,826	0,089	0,007	0,609	0,107	0,330
ENSG00000181171	FER1L6-AS1	33,04	1,20	0,819	0,093	0,008	0,500	0,111	1,000
ENSG00000266579	FO680682.1	8,54	1,74	1,000	0,000	0,002	0,688	0,109	0,119
ENSG00000257126	FOXG1-AS1	19,61	3,35	0,875	0,072	0,002	0,589	0,114	0,430
ENSG00000280441	FP236383.3	38261,80	1,58	0,931	0,050	0,000	0,583	0,113	0,458
ENSG00000278996	FP671120.4	38249,71	1,59	0,931	0,050	0,000	0,583	0,113	0,458
ENSG00000236289	GACAT3	76,91	-1,23	0,785	0,097	0,018	0,536	0,112	0,745
ENSG00000266835	GAPLINC	4,44	-1,71	0,811	0,100	0,012	0,655	0,114	0,186
ENSG00000197308	GATA3-AS1	11,90	1,57	0,771	0,100	0,024	0,500	0,119	1,000
ENSG00000232520	GCSIR	40,50	-1,38	0,778	0,096	0,021	0,677	0,104	0,114
ENSG00000232284	GNGL2-AS1	201,36	-1,34	0,958	0,037	0,000	0,844	0,075	0,002
ENSG00000174680	GRIK1-AS1	45,08	-1,47	0,840	0,087	0,005	0,615	0,110	0,307
ENSG00000255082	GRM5-AS1	23,19	-1,46	0,875	0,072	0,002	0,755	0,092	0,023
ENSG00000224189	HAGLR	23,43	2,02	0,909	0,066	0,001	0,665	0,113	0,152
ENSG00000226363	HAGLROS	10,46	1,72	0,875	0,082	0,003	0,847	0,104	0,004
ENSG00000263586	HID1-AS1	7,25	-1,49	0,771	0,097	0,024	0,625	0,111	0,280
ENSG00000233429	HOTAIRM1	11,04	-1,58	0,903	0,062	0,001	0,698	0,101	0,078
ENSG00000253552	HOXA-AS2	74,09	1,58	0,889	0,067	0,001	0,620	0,107	0,286
ENSG00000254369	HOXA-AS3	84,88	1,61	0,903	0,063	0,001	0,688	0,101	0,095



ID	lncRNA	x̄ Expression	Fold Change	CURVAS ROC ≥2R vs OR			CURVAS ROC 1R vs OR		
				AUC	SE	p VALOR	AUC	SE	p VALOR
ENSG00000230148	HOXB-AS1	24,98	1,66	0,882	0,070	0,001	0,516	0,115	0,889
ENSG00000224609	HSD52	81,40	1,35	0,861	0,083	0,003	0,609	0,119	0,330
ENSG00000283122	HYMAI	6,36	2,05	0,864	0,081	0,003	0,745	0,102	0,036
ENSG00000227039	ITGB2-AS1	36,89	-1,56	0,819	0,093	0,008	0,714	0,106	0,057
ENSG00000258730	ITPK1-AS1	9,09	1,42	0,795	0,095	0,016	0,670	0,107	0,139
ENSG00000228548	ITPKB-AS1	6,76	1,66	0,735	0,106	0,056			
ENSG00000280780	JAKMIP2-AS1	207,16	-1,42	0,771	0,104	0,024	0,620	0,113	0,286
ENSG00000234281	LANCL1-AS1	43,32	1,34	0,847	0,083	0,004	0,818	0,080	0,005
ENSG00000227702	LINC00111	30,39	-1,33	0,861	0,083	0,003	0,740	0,097	0,033
ENSG00000223806	LINC00114	4,85	2,32	0,992	0,013	0,000	0,722	0,101	0,054
ENSG00000234300	LINC00229	27,59	1,30	0,788	0,098	0,019	0,580	0,113	0,490
ENSG00000225127	LINC00237	26,05	1,27	0,771	0,102	0,024	0,714	0,101	0,057
ENSG00000224329	LINC00297	79,71	-1,50	0,903	0,068	0,001	0,667	0,104	0,137
ENSG00000180422	LINC00304	10,81	1,63	0,826	0,086	0,007	0,589	0,112	0,430
ENSG00000185186	LINC00313	19,03	-1,30	0,764	0,103	0,028	0,531	0,113	0,781
ENSG00000226496	LINC00323	14,85	2,37	0,932	0,050	0,000	0,608	0,116	0,348
ENSG00000225249	LINC00378	3,92	2,52	0,864	0,089	0,005	0,529	0,123	0,815
ENSG00000229792	LINC00399	8,48	-1,34	0,764	0,104	0,028	0,578	0,112	0,495
ENSG00000231674	LINC00410	12,43	-1,38	0,785	0,101	0,018	0,678	0,108	0,118
ENSG00000234660	LINC00440	8,04	-1,82	0,785	0,094	0,018	0,722	0,100	0,051
ENSG00000204148	LINC00474	43,54	-1,30	0,833	0,088	0,006	0,677	0,103	0,114
ENSG00000229694	LINC00484	69,12	2,04	0,944	0,047	0,000	0,625	0,109	0,265
ENSG00000227036	LINC00511	292,81	-1,15	0,813	0,088	0,009	0,776	0,089	0,014
ENSG00000259334	LINC00596	72,47	-1,52	0,792	0,095	0,015	0,708	0,102	0,063
ENSG00000235180	LINC00601	20,40	-1,48	0,757	0,104	0,033	0,703	0,104	0,070
ENSG00000248307	LINC00616	49,51	1,26	0,757	0,100	0,033	0,521	0,115	0,853
ENSG00000227060	LINC00629	49,95	-1,61	0,951	0,039	0,000	0,682	0,101	0,104
ENSG00000258701	LINC00638	24,96	-1,36	0,833	0,089	0,006	0,556	0,116	0,626
ENSG00000224074	LINC00691	8,86	-1,68	0,818	0,092	0,010	0,699	0,109	0,084
ENSG00000235703	LINC00894	312,66	-1,29	0,924	0,068	0,000	0,786	0,093	0,011
ENSG00000259361	LINC00927	48,14	1,44	0,917	0,074	0,001	0,615	0,112	0,307
ENSG00000242641	LINC00971	81,53	-1,20	0,847	0,081	0,004	0,542	0,114	0,710
ENSG00000228393	LINC01004	53,76	1,34	0,924	0,056	0,000	0,615	0,109	0,307
ENSG00000242107	LINC01100	34,37	1,72	1,000	0,000	0,000	0,573	0,113	0,516
ENSG00000236423	LINC01134	27,39	2,34	0,861	0,076	0,003	0,516	0,121	0,889
ENSG00000253819	LINC01151	35,76	-1,24	0,785	0,095	0,018	0,615	0,110	0,307
ENSG00000189275	LINC01164	382,38	1,44	0,861	0,078	0,003	0,547	0,113	0,676
ENSG00000281404	LINC01176	16,14	-1,50	0,833	0,089	0,006	0,568	0,113	0,546
ENSG00000228659	LINC01201	52,41	1,32	0,861	0,076	0,003	0,693	0,101	0,086
ENSG00000280776	LINC01202	26,61	-1,29	0,764	0,102	0,028	0,609	0,113	0,330
ENSG00000228980	LINC01205	31,99	1,30	0,799	0,094	0,013	0,557	0,113	0,610
ENSG00000249550	LINC01234	58,39	1,25	0,826	0,085	0,007	0,594	0,112	0,403
ENSG00000229017	LINC01277	34,90	1,25	0,806	0,095	0,011	0,651	0,105	0,178
ENSG00000237401	LINC01304	12,50	-1,36	0,792	0,101	0,015	0,578	0,110	0,486
ENSG00000223586	LINC01312	14,23	1,34	0,771	0,103	0,024	0,589	0,111	0,430
ENSG00000244128	LINC01322	146,75	1,18	0,854	0,081	0,003	0,510	0,117	0,926
ENSG00000225762	LINC01389	12,54	1,52	0,868	0,079	0,002	0,578	0,111	0,486
ENSG00000261715	LINC01477	29,42	2,06	1,000	0,000	0,000	0,562	0,111	0,577
ENSG00000234323	LINC01505	283,23	1,12	0,819	0,090	0,008	0,594	0,112	0,403
ENSG00000250584	LINC01511	23,23	1,26	0,771	0,100	0,024	0,536	0,111	0,745
ENSG00000246223	LINC01550	40,26	1,32	0,792	0,100	0,015	0,708	0,101	0,063
ENSG00000198685	LINC01565	6,05	2,26	0,841	0,091	0,006	0,381	0,117	0,300
ENSG00000231221	LINC01593	2,82	1,64	0,828	0,098	0,014	0,607	0,119	0,387
ENSG00000205611	LINC01597	9,56	1,55	0,788	0,100	0,019	0,614	0,125	0,324
ENSG00000227115	LINC01630	246,40	-1,19	0,938	0,047	0,000	0,865	0,069	0,001
ENSG00000228127	LINC01649	98,56	2,55	0,986	0,018	0,000	0,740	0,096	0,033
ENSG00000233985	LINC01681	24,50	1,30	0,833	0,082	0,006	0,694	0,104	0,088
ENSG00000226715	LINC01709	219,78	-1,31	0,965	0,033	0,000	0,797	0,084	0,008
ENSG00000230523	LINC01756	16,16	-1,36	0,764	0,099	0,028	0,822	0,079	0,005
ENSG00000231031	LINC01804	235,34	-1,13	0,778	0,097	0,021	0,724	0,099	0,046
ENSG00000226488	LINC01824	3,45	-1,73	0,833	0,093	0,007	0,762	0,102	0,024
ENSG00000264260	LINC01893	3,85	1,78	0,848	0,084	0,005	0,630	0,111	0,264
ENSG00000264345	LINC01894	44,07	-1,74	0,938	0,062	0,000	0,807	0,084	0,006
ENSG00000264232	LINC01916	12,26	-1,35	0,819	0,101	0,008	0,672	0,104	0,126
ENSG00000254226	LINC01933	152,04	-1,12	0,799	0,094	0,013	0,526	0,111	0,816
ENSG00000237222	LINC01968	51,40	1,21	0,833	0,091	0,006	0,667	0,106	0,137
ENSG00000260902	LINC02011	22,53	-1,37	0,819	0,086	0,008	0,755	0,091	0,023
ENSG00000248243	LINC02014	8,63	-1,67	0,795	0,101	0,016	0,685	0,116	0,125
ENSG00000232746	LINC02022	13,90	-1,41	0,813	0,087	0,009	0,517	0,115	0,884
ENSG00000241213	LINC02024	5,57	1,73	0,818	0,088	0,010	0,682	0,106	0,114

ID	lncRNA	x̄ Expression	Fold Change	CURVAS ROC ≥2R vs OR			CURVAS ROC 1R vs OR		
				AUC	SE	p VALOR	AUC	SE	p VALOR
ENSG00000241544	LINC02029	6,30	1,37	0,736	0,104	0,050			
ENSG00000243149	LINC02040	22,25	-1,43	0,806	0,092	0,011	0,682	0,105	0,104
ENSG00000248528	LINC02058	7,31	-1,46	0,835	0,088	0,008	0,551	0,113	0,657
ENSG00000259847	LINC02126	16,81	-1,49	0,833	0,084	0,006	0,783	0,099	0,013
ENSG00000260186	LINC02137	30,46	1,40	0,875	0,072	0,002	0,536	0,113	0,745
ENSG00000249797	LINC02147	143,00	-1,19	0,806	0,093	0,011	0,646	0,109	0,194
ENSG00000249332	LINC02149	114,34	-1,32	0,819	0,085	0,008	0,776	0,088	0,014
ENSG00000248457	LINC02220	80,15	1,32	0,875	0,074	0,002	0,599	0,109	0,378
ENSG00000249937	LINC02223	126,24	1,08	0,757	0,100	0,033	0,646	0,106	0,194
ENSG00000250708	LINC02269	11,60	1,35	0,812	0,093	0,009	0,656	0,111	0,172
ENSG00000245954	LINC02273	10,27	-1,65	0,826	0,089	0,007	0,778	0,090	0,015
ENSG00000258994	LINC02309	18,28	1,33	0,813	0,087	0,009	0,578	0,111	0,486
ENSG00000258038	LINC02327	46,41	1,26	0,771	0,100	0,024	0,505	0,116	0,963
ENSG00000271850	LINC02343	112,08	-1,13	0,819	0,094	0,008	0,786	0,088	0,011
ENSG00000257193	LINC02385	3,39	2,07	0,843	0,104	0,009	0,573	0,127	0,570
ENSG00000257924	LINC02416	23,19	-1,37	0,799	0,091	0,013	0,563	0,111	0,577
ENSG00000248810	LINC02432	6,64	1,81	0,818	0,087	0,010	0,653	0,106	0,183
ENSG00000254867	LINC02442	12,26	1,72	0,826	0,088	0,008	0,619	0,113	0,300
ENSG00000256499	LINC02468	3,76	1,79	0,782	0,106	0,029	0,562	0,123	0,620
ENSG00000251383	LINC02483	4,06	-2,31	0,840	0,084	0,005	0,846	0,084	0,003
ENSG00000283083	LINC02498	11,70	1,61	0,840	0,084	0,005	0,531	0,112	0,781
ENSG00000230269	LINC02525	15,85	1,38	0,750	0,100	0,038	0,604	0,117	0,353
ENSG00000255117	LINC02546	10,00	-1,51	0,819	0,091	0,008	0,744	0,100	0,032
ENSG00000271584	LINC02550	47,46	1,30	0,882	0,071	0,001	0,667	0,107	0,137
ENSG00000254842	LINC02551	33,81	1,36	0,861	0,076	0,003	0,583	0,110	0,458
ENSG00000229108	LINC02587	3,64	-1,83	0,750	0,108	0,042	0,506	0,127	0,956
ENSG00000263590	LINC02591	12,67	-2,32	0,788	0,097	0,019	0,597	0,116	0,402
ENSG00000231367	LINC02613	49,72	1,20	0,819	0,098	0,008	0,740	0,096	0,033
ENSG00000241288	LINC02614	36,64	1,23	0,792	0,094	0,015	0,641	0,106	0,210
ENSG00000233590	LINC02640	5,95	1,38	0,799	0,100	0,013	0,500	0,120	1,000
ENSG00000255388	LINC02741	110,44	-1,16	0,840	0,086	0,005	0,734	0,096	0,037
ENSG00000254863	LINC02744	11,51	2,51	0,972	0,031	0,000	0,667	0,104	0,137
ENSG00000254530	LINC02755	95,14	1,24	0,868	0,086	0,002	0,552	0,112	0,642
ENSG00000250303	LINC02762	167,06	-1,12	0,792	0,094	0,015	0,750	0,095	0,026
ENSG00000236648	LINC02810	29,97	1,20	0,764	0,102	0,028	0,633	0,110	0,242
ENSG00000258815	LINC02820	24,54	2,06	0,985	0,020	0,000	0,580	0,113	0,490
ENSG00000254119	LINC02842	109,22	-1,22	0,799	0,098	0,013	0,724	0,100	0,046
ENSG00000253644	LINC02845	2,55	1,97	0,806	0,107	0,019	0,611	0,125	0,378
ENSG00000251138	LINC02882	211,57	-1,16	0,757	0,101	0,033	0,604	0,109	0,353
ENSG00000213904	LIPE-AS1	161,08	1,13	0,813	0,091	0,009	0,651	0,108	0,178
ENSG00000238198	LRI6-DT	48,78	1,30	0,819	0,086	0,008	0,578	0,109	0,486
ENSG00000234263	MAP3K5-AS1	26,67	1,85	0,972	0,028	0,000	0,562	0,111	0,577
ENSG00000186056	MATN1-AS1	45,47	1,35	0,708	0,114	0,083			
ENSG00000229619	MBNL1-AS1	9,17	1,76	0,819	0,089	0,008	0,552	0,114	0,642
ENSG00000250328	MGC32805	30,72	-1,47	0,903	0,076	0,001	0,719	0,099	0,051
ENSG00000254349	MIR2052HG	105,88	1,22	0,889	0,065	0,001	0,516	0,118	0,889
ENSG00000226702	MIR217HG	132,17	1,25	0,896	0,065	0,001	0,620	0,117	0,286
ENSG00000228526	MIR34AHG	97,06	1,26	0,778	0,096	0,021	0,698	0,110	0,078
ENSG00000228824	MIR4500HG	135,17	1,28	0,875	0,081	0,002	0,510	0,112	0,926
ENSG00000261971	MMP25-AS1	11,59	1,40	0,785	0,096	0,018	0,786	0,087	0,011
ENSG00000243479	MNX1-AS1	5,29	-1,45	0,792	0,098	0,015	0,599	0,108	0,378
ENSG00000228323	MYADM-AS1	22,20	-1,32	0,729	0,106	0,057			
ENSG00000236051	MYCBP2-AS1	37,71	1,32	0,833	0,084	0,006	0,776	0,090	0,014
ENSG00000124915	MYRF-AS1	21,79	-1,36	0,778	0,095	0,021	0,589	0,109	0,430
ENSG00000230292	NAALADL2-AS3	12,89	-1,64	0,861	0,078	0,003	0,630	0,108	0,246
ENSG00000235470	NEURL1-AS1	70,11	1,20	0,868	0,072	0,002	0,755	0,098	0,023
ENSG00000263412	NFE2L1-DT	5,69	1,55	0,773	0,103	0,035	0,567	0,121	0,579
ENSG00000269656	NOP53-AS1	12,66	-1,57	0,757	0,106	0,033	0,511	0,115	0,922
ENSG00000248008	NRAV	35,13	-1,38	0,819	0,091	0,008	0,786	0,092	0,011
ENSG00000250095	NREP-AS1	153,01	1,47	0,958	0,037	0,000	0,708	0,100	0,063
ENSG00000225951	ODF2-AS1	7,49	1,53	0,780	0,105	0,023	0,574	0,116	0,521
ENSG00000250103	PANCR	11,44	1,39	0,818	0,092	0,010	0,670	0,107	0,139
ENSG00000277631	PGM5P3-AS1	10,33	1,35	0,778	0,099	0,021	0,594	0,114	0,407
ENSG00000226648	PLCG1-AS1	35,52	1,33	0,757	0,101	0,033	0,500	0,111	1,000
ENSG00000256940	PPP1R14B-AS1	9,19	1,88	0,889	0,065	0,001	0,682	0,106	0,104
ENSG00000236197	PPP1R9A-AS1	54,13	1,13	0,840	0,084	0,005	0,656	0,113	0,164
ENSG00000221817	PPP3CB-AS1	16,71	1,47	0,771	0,096	0,024	0,578	0,111	0,486
ENSG00000282961	PRNCR1	48,59	1,18	0,743	0,103	0,043	0,615	0,108	0,307
ENSG00000230461	PROX1-AS1	110,56	-1,15	0,757	0,100	0,033	0,594	0,110	0,403
ENSG00000233067	PTCHD1-AS	1161,04	-1,19	0,875	0,084	0,002	0,724	0,101	0,046

ID	lncRNA	x̄ Expression	Fold Change	CURVAS ROC ≥2R vs OR			CURVAS ROC 1R vs OR		
				AUC	SE	p VALOR	AUC	SE	p VALOR
ENSG00000226717	PTPRD-AS2	3,86	-2,37	0,940	0,055	0,001	0,693	0,105	0,108
ENSG00000225465	RFPL1S	34,47	-1,20	0,764	0,099	0,028	0,708	0,099	0,063
ENSG00000236107	SCN1A-AS1	126,07	-1,20	0,882	0,070	0,001	0,672	0,102	0,126
ENSG00000230438	SERPIN8P1	23,12	-1,26	0,757	0,106	0,033	0,771	0,090	0,016
ENSG00000234771	SLC25A25-AS1	15,62	1,65	0,841	0,085	0,006	0,515	0,119	0,897
ENSG00000268364	SMC5-AS1	44,86	1,27	0,806	0,101	0,011	0,517	0,117	0,884
ENSG00000251279	SMIM15-AS1	109,72	1,55	0,778	0,097	0,021	0,677	0,105	0,114
ENSG00000260630	SNAI3-AS1	27,08	-1,54	0,785	0,097	0,018	0,672	0,108	0,126
ENSG00000266402	SNHG25	182,84	-1,57	0,826	0,088	0,007	0,656	0,111	0,164
ENSG00000228649	SNHG26	6,62	1,66	0,742	0,108	0,049	0,585	0,114	0,459
ENSG00000245910	SNHG6	10,97	-1,61	0,757	0,101	0,033	0,724	0,100	0,046
ENSG00000227543	SPAG5-AS1	42,34	-1,16	0,750	0,107	0,038	0,589	0,111	0,430
ENSG00000189419	SPATA41	3,82	-1,69	0,819	0,088	0,088			
ENSG00000248508	SRP14-AS1	29,15	1,28	0,813	0,089	0,009	0,729	0,095	0,041
ENSG00000204832	ST8SIA6-AS1	57,23	-1,45	0,889	0,067	0,001	0,557	0,116	0,610
ENSG00000272752	STAG3LSP-PVRIG2P-PILRB	24,02	-1,32	0,819	0,094	0,008	0,630	0,111	0,246
ENSG00000223442	TH2LCRR	13,52	2,05	0,826	0,096	0,008	0,648	0,111	0,199
ENSG00000224533	TMLHE-AS1	38,26	1,21	0,778	0,096	0,021	0,750	0,094	0,026
ENSG00000250947	TRPC7-AS2	12,73	-1,55	0,819	0,095	0,008	0,583	0,113	0,458
ENSG00000182912	TSPPEAR-AS2	61,45	-5,79	1,000	0,000	0,000	0,844	0,077	0,002
ENSG00000233061	TTL7-IT1	1,66	2,22	0,900	0,087	0,003	0,744	0,120	0,072
ENSG00000232725	US2111.1	37,38	1,35	0,778	0,098	0,021	0,563	0,120	0,577
ENSG00000245248	USP2-AS1	207,52	-1,19	0,813	0,095	0,009	0,698	0,105	0,078
ENSG00000237001	WASF3-AS1	13,55	-1,33	0,896	0,064	0,001	0,583	0,112	0,458
ENSG00000272686	WASL-DT	3,00	1,64	0,864	0,075	0,003	0,606	0,113	0,364
ENSG00000225076	WWC3-AS1	3,44	1,94	0,808	0,101	0,015	0,773	0,099	0,023
ENSG00000260969	WWOX-AS1	5,42	1,86	0,848	0,080	0,005	0,836	0,079	0,004
ENSG00000241743	XACT	242,97	-1,25	0,868	0,072	0,002	0,609	0,110	0,330
ENSG00000226803	ZNF451-AS1	33,26	1,71	0,986	0,018	0,000	0,563	0,115	0,577
ENSG00000226051	ZNF503-AS1	649,18	-1,33	0,861	0,080	0,003	0,573	0,111	0,516