

## RESUMEN

Aproximadamente 57 millones de adultos sufren insuficiencia cardíaca en todo el mundo, y se prevé que la prevalencia aumente sustancialmente con el envejecimiento de la población. El trasplante cardíaco sigue siendo el tratamiento de referencia en ausencia de contraindicaciones en pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada, y mejora significativamente la calidad de vida y el estado funcional de estos pacientes. La mediana de supervivencia global tras el trasplante es de 12,5 años. A pesar de las mejoras en el tratamiento inmunosupresor, uno de los principales eventos tras el trasplante es el rechazo agudo (rechazo celular agudo (RCA) y el rechazo mediado por anticuerpos (RMA)). La lesión inmunitaria generada durante el rechazo agudo contribuye significativamente al fallo del injerto y a la enfermedad vascular del injerto, que siguen siendo una de las principales causas de muerte post-trasplante. El diagnóstico del rechazo agudo es complejo, ya que a menudo se produce en pacientes asintomáticos. La biopsia endomiocárdica (BEM) es la técnica estándar para monitorizar el rechazo agudo en el primer año postrasplante y posteriormente en pacientes sintomáticos. Sin embargo, la BEM presenta importantes limitaciones, como su carácter invasivo, el error de muestreo, la variabilidad interobservador y el elevado coste sanitario. Por lo tanto, la identificación de métodos no invasivos para reducir o eliminar la BEM es un campo de estudio abierto importante y necesario. La biopsia líquida es una alternativa potencial para sustituir a la BEM debido a su naturaleza menos invasiva y a su capacidad para reflejar los cambios fisiopatológicos producidos en los órganos durante un evento. Los enfoques ómicos han permitido el descubrimiento de moléculas libres circulantes en el torrente sanguíneo como biomarcadores de enfermedad, destacando el potencial de los ARNs por su papel en procesos inflamatorios, especificidad tisular y estabilidad en fluidos biológicos. Por ello, esta Tesis Doctoral se ha centrado en identificar ARNs libres circulantes alterados en el torrente sanguíneo tras un trasplante de corazón desde un enfoque transcriptómico y estudiar la capacidad diagnóstica para su uso como biomarcadores de rechazo cardíaco.

Se realizó una fase de descubrimiento basada en la tecnología de secuenciación de ARN para detectar diferentes biotipos de ARNs en BEM y muestras de suero de pacientes con diagnóstico de rechazo agudo: RCA [no rechazo (0R), leve (1R) y moderado-grave ( $\geq 2R$ )] y RMA [no rechazo (pRMA0) y rechazo histopatológico e inmunopatológico (pRMA2)]. Se llevó a cabo una fase de validación de las moléculas identificadas en el estudio de descubrimiento en una cohorte independiente más amplia para detectar el rechazo agudo mediante técnicas moleculares como ELISA o RT-qPCR.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral mostraron una desregulación en varios biotipos de ARNs libres circulantes tras el trasplante cardíaco en condiciones de rechazo. Observamos alteraciones en genes relacionados con el sarcómero; y el gen que codifica la alfa-actina cardíaca (ACTC1) mostró la mejor capacidad diagnóstica ( $\geq 2R$ : área bajo la curva (AUC) = 1,000,  $p < 0,0001$ ). Además, determinamos los niveles de la proteína ACTC1 en una cohorte mayor de pacientes, corroborando los hallazgos previos (AUC = 0,702,  $p < 0,05$ ). Además, identificamos varios miARNs alterados en el suero de pacientes con RCA, concretamente miR-144-3p mostró los mejores resultados. En la fase de validación tuvo una capacidad diagnóstica excelente para el rechazo moderado-grave (AUC = 0,801,  $p < 0,0001$ ); sin embargo, su capacidad para detectar el rechazo leve fue limitada (AUC = 0,631,  $p < 0,01$ ). Así pues, analizamos y validamos la combinación de miR-144-3p y miR-652-3p, otro miARN identificado en la fase de descubrimiento. La combinación mejoró el poder

diagnóstico para el rechazo moderado-grave (AUC = 0,892,  $p < 0,0001$ ) y leve (AUC = 0,794,  $p < 0,0001$ ). Además, analizamos por primera vez la presencia en suero de otros biotipos de ARNs no codificantes (lncARN y piARN) tras un trasplante cardíaco. En concreto, identificamos 5 lncARNs (AC008105.3, AC006525.1, AC011455.8, AL359220.1, y AC025279.1) con capacidad diagnóstica excelente para la detección de los grados  $\geq 2R$  (AUC de 0,850 a 1,000) y 1R (AUC de 0,750 a 0,854). Por otro lado, identificamos 7 piARNs (piR-169894, piR-181318, piR-1981088, piR-2479902, piR-380748, piR-398377 y piR-401292) con un perfil de expresión coincidente en suero y BEM. A continuación, validamos la combinación de estos piARNs en una cohorte mayor independiente (grado  $\geq 2R$  AUC = 0,819,  $p < 0,0001$  y grado 1R AUC = 0,721,  $p = 0,001$ ). Además, nuestro panel de piARNs mostró un excelente poder diagnóstico de RMA (pRMA2 AUC = 0,967,  $p < 0,0001$ ).

Nuestros resultados demuestran la existencia de alteraciones en la expresión de ARNs libres circulantes (mARN, miARN, lncARN y piARN) en pacientes con rechazo cardíaco tras un trasplante, demostrando además una potente capacidad diagnóstica para los diferentes grados de RCA, incluso para el grado de rechazo leve. Además, una adecuada combinación de ARNs libres circulantes muestra mayor precisión para el diagnóstico del RCA que la detección individual de cada molécula, mostrando una excelente capacidad de diagnóstico del RMA y permitiendo monitorizar la respuesta al tratamiento.