



UNIVERSIDAD  
DE MURCIA

Escuela  
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Enfoque multiómico para la determinación del riesgo cardiovascular en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad.*

AUTOR/A Salvador Carrillo Tornel

DIRECTOR/ES D<sup>a</sup>. Rocío González-Conejero Hilla  
D. Constantino Martínez Gómez

2026





UNIVERSIDAD  
DE MURCIA

Escuela  
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Enfoque multiómico para la determinación del  
riesgo cardiovascular en pacientes con neumonía  
adquirida en la comunidad.*

AUTOR/A Salvador Carrillo Tornel  
DIRECTOR/ES D<sup>a</sup> Rocío González-Conejero Hilla  
D. Constantino Martínez Gómez

2026





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR/A**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, D. SALVADOR CARRILLO TORNEL, habiendo cursado el Programa de Doctorado INTEGRACIÓN Y MODULACIÓN DE SEÑALES EN BIOMEDICINA de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Enfoque multiómico para la determinación del riesgo cardiovascular en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad.

y dirigida por:

Da.: ROCÍO GONZÁLEZ-CONEJERO HILLA  
D.: CONSTANTINO MARTÍNEZ GÓMEZ

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Murcia, a 24 de febrero de 2026

(firma)

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados:	
Responsable	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la quinta hoja, después de la portada de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a.

Código seguro de verificación: RUxFMply-6EOutPK5-ozPLa0/n-3b2u9Cz6

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>





**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>RESUMEN</b>	<b>12</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>16</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>23</b>
<b>1. NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD (NAC): CONTEXTO GENERAL</b>	<b>24</b>
1.1. Epidemiología y fisiopatología de la NAC	24
1.2. Cuadro clínico y diagnóstico	25
1.3. Escalas de gravedad clínica	26
1.4. Impacto de la NAC sobre la morbimortalidad cardiovascular	27
<b>2. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA TROMBO-INFLAMACIÓN</b>	<b>29</b>
<b>3. BIOMARCADORES EN EL ESTUDIO DE LA TROMBO-INFLAMACIÓN Y RIESGO CARDIOVASCULAR EN NAC</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Ómicas para la búsqueda de biomarcadores</b>	<b>35</b>
<b>3.1.1. Enfoque genómico: Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP)</b>	<b>35</b>
3.1.1.1. CHIP y ECV	36
3.1.1.2. CHIP e infección	37
<b>3.1.2. Enfoque transcriptómico: microRNA (miRNA)</b>	<b>38</b>
3.1.2.1. miRNA en trombo-inflamación	39
3.1.2.2. miRNA en ECV	40
3.1.2.3. miRNA en NAC	44
<b>3.1.3. Enfoque proteómico: biomarcadores predictores de riesgo cardiovascular en NAC</b>	<b>45</b>
3.1.3.1. Biomarcadores cardiovasculares	45
3.1.3.2. Biomarcadores inflamatorios	47
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>COHORTES DE PACIENTES</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO I.</b>	<b>54</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>56</b>
<b>2. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>63</b>
2.1. Pacientes	63
2.2. Extracción de ácidos nucleicos	63
2.3. Secuenciación de DNA	63
2.4. Análisis de secuenciación de DNA	67
2.5. Análisis estadístico	68

<b>3. RESULTADOS</b>	<b>70</b>
3.1. Incidencia de CHIP en pacientes con NAC	70
3.2. Relación de CHIP y MACE	72
3.3. Relación entre mutaciones CHIP y supervivencia	74
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>80</b>
<b>CAPÍTULO II.</b>	<b>84</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>86</b>
<b>2. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>89</b>
2.1. Pacientes	89
2.2. Aislamiento de miRNA	89
2.3. Secuenciación de miRNA plasmáticos	89
2.4. Análisis bioinformático	89
2.5. RT-qPCR de miRNA plasmáticos	90
2.6. <i>Score</i> clínico-biológico	91
2.7. Análisis estadístico	91
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>93</b>
3.1. Características clínicas y perfil de miRNA de la cohorte de descubrimiento	93
3.2. Características clínicas y validación del miRNA-seq	98
3.3. Perfil de miRNA y relación con el desarrollo de MACE	100
3.4. <i>Score</i> clínico-biológico predictor de MACE temprano	102
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>108</b>
<b>CAPÍTULO III.</b>	<b>112</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>114</b>
<b>2. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>118</b>
2.1. PACIENTES Y CONTROLES	118
2.2. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES DE MACE EN PLASMA DE PACIENTES CON NAC	118
2.2.1. Ensayo de extensión de proximidad: estudio de descubrimiento	118
2.2.2. Validación de los niveles plasmáticos de FGF-23	119
2.2.3. Modelo predictor de MACE mediante Machine Learning	119
2.3. ESTUDIO FUNCIONAL DE FGF-23 EN NEUTRÓFILOS	120
2.3.1. Purificación	120
2.3.2. Análisis de viabilidad	122
2.3.3. Cultivo para western blot (WB)	122
2.3.4. Análisis de expresión proteica por WB	123
2.3.5. Determinación de la inducción de NETosis	124
2.3.6. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	125

2.3.7. Estudio de la capacidad fagocítica	125
2.3.8. Ensayo de trans migración celular ( <i>Transwell</i> )	125
2.4. ESTUDIO FUNCIONAL DE FGF-23 EN MONOCITOS	126
2.4.1. Purificación	126
2.4.2. Determinación de la expresión de FT por RT-qPCR	126
2.4.3. Análisis de la expresión proteica de FT por WB	127
2.5. ESTUDIO FUNCIONAL DE FGF-23 EN CÉLULAS ENDOTELIALES	130
2.5.1. Determinación de la expresión de FT y TFPI por RT-qPCR	130
2.5.2. Análisis de la expresión proteica por WB	130
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	131
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>133</b>
3.1. INCIDENCIA DE MACE EN PACIENTES CON NAC	133
3.2. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE MACE	136
3.2.1. Análisis de biomarcadores plasmáticos inflamatorios	136
3.2.2. Validación de los niveles plasmáticos de FGF-23 por ELISA	139
3.2.3. Niveles plasmáticos de FGF-23 y sepsis	142
3.2.4. Modelo clínico-biológico de ML predictor de MACE en pacientes con NAC	143
3.3. ESTUDIO DEL EFECTO FUNCIONAL <i>IN VITRO</i> DEL FGF-23 EN TROMBO-INFLAMACIÓN	143
3.3.1. FGF-23 no afecta a la viabilidad de los neutrófilos	143
3.3.2. FGF-23 aumenta la NETosis	145
3.3.3. FGF-23 inhibe la producción de ROS	147
3.3.4. FGF-23 altera la capacidad fagocítica	148
3.3.5. FGF-23 reduce la migración	148
3.3.6. FGF-23 aumenta la expresión de FT	150
3.3.7. El inhibidor erdafitinib no reduce la expresión de FT inducida por FGF-23	151
3.3.8. FGF-23 activa diferentes vías de señalización	152
3.3.9. FGF-23 no induce respuesta trombo-inflamatoria en células endoteliales	153
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>155</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>161</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>164</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>184</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Trombo-inflamación en infección.	<b>33</b>
<b>Figura 2.</b> Activación del sistema del complemento en enfermedades inflamatorias.	<b>34</b>
<b>Figura 3.</b> Función de los principales inflamma-miR en patología cardiovascular.	<b>43</b>
<b>Figura 4.</b> Interrelación entre CHIP, inflamación y riesgo cardiovascular.	<b>61</b>
<b>Figura 5.</b> Workflow esquemático de la secuenciación por captura del DNA	<b>66</b>
<b>Figura 6.</b> Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) en la cohorte de estudio CHIP (N=96).	<b>76</b>
<b>Figura 7.</b> Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de evento (SLE) en la cohorte de estudio CHIP (N=96).	<b>77</b>
<b>Figura 8.</b> Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) en los pacientes con mutaciones CHIP en función de desarrollar un MACE.	<b>78</b>
<b>Figura 9.</b> Análisis de componentes principales (PCA) de la cohorte del miRNA-seq.	<b>94</b>
<b>Figura 10.</b> Diagrama de dispersión <i>volcano plot</i> de la expresión de miRNA en la cohorte de descubrimiento del miRNA-seq.	<b>95</b>
<b>Figura 11.</b> Niveles de expresión de los 18 miRNA con FDR <0,1 del miRNA-seq en la cohorte de descubrimiento.	<b>97</b>
<b>Figura 12.</b> Análisis de expresión de los miRNA seleccionados para la validación por PCR del miRNA-seq.	<b>101</b>
<b>Figura 13.</b> <i>Flowchart</i> del estudio de miRNA plasmáticos.	<b>102</b>
<b>Figura 14.</b> Modelos ROC de los niveles plasmáticos de miRNA enfrentados al desarrollo de MACE temprano.	<b>103</b>
<b>Figura 15.</b> Análisis de curva ROC relativo al MACE temprano.	<b>104</b>
<b>Figura 16.</b> Correlación de los niveles plasmáticos de miR-423 y miR-320a.	<b>105</b>
<b>Figura 17.</b> Modelo GLM predictor de MACE temprano.	<b>106</b>
<b>Figura 18.</b> Diagrama <i>volcano plot</i> de las diferentes proteínas en el ensayo PEA.	<b>137</b>
<b>Figura 19.</b> Niveles plasmáticos de FGF-23 en la cohorte de descubrimiento (ensayo PEA).	<b>137</b>
<b>Figura 20.</b> Análisis bioinformático de las 7 proteínas diferencialmente expresadas.	<b>138</b>
<b>Figura 21.</b> Análisis de correlación entre los niveles de FGF-23 medidos por PEA vs. ELISA.	<b>139</b>
<b>Figura 22.</b> Niveles plasmáticos de FGF-23 en la cohorte 1 de pacientes con NAC.	<b>140</b>
<b>Figura 23.</b> Niveles plasmáticos de FGF-23 en pacientes sin fallo renal.	<b>140</b>
<b>Figura 24.</b> Niveles plasmáticos de FGF-23 en la cohorte 2 y 3 de pacientes con NAC.	<b>141</b>
<b>Figura 25.</b> Niveles plasmáticos de FGF-23 a día 3-5 del ingreso por NAC.	<b>141</b>
<b>Figura 26.</b> Análisis de los niveles de FGF-23 en función de desarrollar MACE y sepsis en la cohorte global de pacientes con NAC.	<b>142</b>
<b>Figura 27.</b> Modelo predictor de MACE temprano en pacientes con NAC.	<b>144</b>
<b>Figura 28.</b> Ensayo de viabilidad celular.	<b>145</b>
<b>Figura 29.</b> Análisis de los niveles de citH3/DNA medidos por ELISA.	<b>146</b>
<b>Figura 30.</b> Análisis densitométrico de los niveles de expresión de ERK.	<b>146</b>
<b>Figura 31.</b> Análisis cinético por fluorimetría de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).	<b>147</b>
<b>Figura 32.</b> Ensayo de fagocitosis bacteriana.	<b>148</b>
<b>Figura 33.</b> Ensayo de trans migración celular.	<b>149</b>
<b>Figura 34.</b> Análisis de la expresión de factor tisular (FT) en monocitos humanos.	<b>150</b>
<b>Figura 35.</b> Análisis de expresión de factor tisular (FT) tras el tratamiento con el inhibidor erdafitinib en monocitos humanos.	<b>151</b>
<b>Figura 36.</b> Análisis de la expresión de los niveles de fosforilación de Akt, Erk y p38 mediante WB en monocitos humanos.	<b>152</b>
<b>Figura 37.</b> Análisis de la expresión de factor tisular (FT) y del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI) en células endoteliales.	<b>153</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características del diseño del panel customizado para el análisis por NGS.	<b>64</b>
<b>Tabla 2.</b> Programa del termociclador para la fragmentación, reparación de extremos y adición de colas de dA al DNA.	<b>65</b>
<b>Tabla 3.</b> Programa del termociclador para la amplificación por PCR de los fragmentos de DNA indexados.	<b>65</b>
<b>Tabla 4.</b> Programa del termociclador para la amplificación por PCR post-captura.	<b>67</b>
<b>Tabla 5.</b> Características generales de la cohorte de estudio (N=96).	<b>71</b>
<b>Tabla 6.</b> Análisis de variables en función del gen CHIP estudiado.	<b>72</b>
<b>Tabla 7.</b> Mutaciones relacionadas con la hematopoyesis clonal identificadas en la población de estudio (N=96).	<b>73</b>
<b>Tabla 8.</b> Características generales de la cohorte en función de la presencia de MACE.	<b>74</b>
<b>Tabla 9.</b> Programa del termociclador para la reacción de retrotranscripción (RT).	<b>90</b>
<b>Tabla 10.</b> Programa para la reacción de PCR.	<b>90</b>
<b>Tabla 11.</b> Características clínicas y demográficas en la cohorte de descubrimiento del miRNA-seq.	<b>93</b>
<b>Tabla 12.</b> Listado de miRNA con FDR<0,1 derivados del análisis del miRNA-seq.	<b>96</b>
<b>Tabla 13.</b> Estudio de expresión miRNA plasmáticos según volumen de muestra utilizado.	<b>98</b>
<b>Tabla 14.</b> Características clínicas y demográficas en la cohorte de validación.	<b>99</b>
<b>Tabla 15.</b> miRNA sobreexpresados en pacientes MACE-30d vs. NO MACE-30d.	<b>100</b>
<b>Tabla 16.</b> Características clínicas y demográficas de la cohorte de desarrollo del score clínico-biológico.	<b>103</b>
<b>Tabla 17.</b> Parámetros empleados para el modelado Gradient Boosting Machine (GBM).	<b>121</b>
<b>Tabla 18.</b> Programa del termociclador para la reacción de retrotranscripción (RT).	<b>127</b>
<b>Tabla 19.</b> Programa para la reacción de PCR.	<b>127</b>
<b>Tabla 20.</b> Relación de anticuerpos empleados en western blot (WB) en monocitos humanos.	<b>129</b>
<b>Tabla 21.</b> Características clínicas y demográficas de la cohorte global con NAC (N=258).	<b>134</b>
<b>Tabla 22.</b> Características clínicas y demográficas de los pacientes en función del MACE a 30 días del ingreso.	<b>135</b>
<b>Tabla 23.</b> Características clínicas y demográficas de la cohorte de descubrimiento para el ensayo PEA (Olink®).	<b>136</b>

# **RESUMEN**

---

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es una infección frecuente y potencialmente mortal con una alta tasa de morbimortalidad. En estudios con diferentes cohortes se ha descrito que la NAC incrementa el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) entre un 10-30%, relacionándose con un estado de inflamación sistémica, disfunción endotelial y estados protrombóticos. En este escenario, se hace necesaria la búsqueda de biomarcadores capaces de predecir las complicaciones cardiovasculares asociadas a la infección, así como su integración en las actuales herramientas de uso clínico para una optimización de la estratificación del riesgo en estos pacientes de alto riesgo.

En esta Tesis, hemos abordado la búsqueda de estos biomarcadores desde una estrategia multiómica, en pacientes con NAC con y sin eventos cardiovasculares mayores (MACE): (i) secuenciación de mutaciones CHIP (hematopoyesis clonal de potencial indeterminado), dado que se asocian con un aumento en la incidencia de ECV; (ii) análisis de perfiles de miRNA en plasma, que han emergido como biomarcadores no invasivos con un notable potencial; y (iii) análisis proteómico, herramienta útil para la identificación de biomarcadores diagnósticos, pronósticos y terapéuticos.

**Objetivo 1-** Determinar la prevalencia de CHIP y analizar su asociación con la aparición de MACE durante el seguimiento de pacientes con NAC. **Objetivo 2-** Caracterizar el perfil de miRNA circulantes en plasma de pacientes con NAC y evaluar su asociación con MACE, así como su potencial integración con variables clínicas. **Objetivo 3-** Identificar marcadores plasmáticos diferenciales de MACE tras un episodio de NAC.

**Materiales y Métodos.** Se recogieron muestras de plasma y DNA de pacientes con NAC, con y sin MACE posterior al ingreso hospitalario, con un seguimiento de 4 años, así como de controles sanos. Para el **estudio de CHIP**, se realizó una secuenciación (NGS) de un panel customizado de 4 genes relacionados con ECV. Los **miRNA plasmáticos** se cuantificaron mediante un miRNA-seq y validación mediante RT-qPCR. Empleamos **proteómica** de alto rendimiento y posterior validación mediante ELISA, junto con herramientas de *machine learning* (ML). Para los experimentos funcionales *in vitro*, se purificaron neutrófilos y monocitos de sangre periférica de donantes sanos y la línea celular HUVEC. En neutrófilos se evaluó la capacidad NETótica, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), capacidad fagocítica y migratoria. En los monocitos y

HUVEC se evaluó la producción de factor tisular (FT). Los datos obtenidos se analizaron utilizando las pruebas estadísticas adecuadas a cada caso.

**Resultados.** Capítulo 1: *TET2* fue el gen más frecuentemente mutado en los pacientes con NAC. Los pacientes con mutaciones CHIP fueron predominantemente mujeres y de mayor edad, con mayor mortalidad a 4 años, menor supervivencia global y libre de evento. La incidencia de mutaciones CHIP fue mayor en los pacientes con MACE temprano (MACE-30d) respecto a los NO MACE-30d. Finalmente, la presencia de CHIP no tuvo un impacto en la supervivencia global a 4 años en los pacientes MACE-30d (N=38), pero sí en los NO MACE-30d (N=58).

Capítulo 2: Identificamos 18 miRNA diferencialmente expresados entre pacientes MACE-30d y NO MACE a 4 años (NO MACE-4a). La validación de 7 de estos miRNA reveló que miR-206, miR-320a-3p y miR-423-5p se encontraron aumentados en los MACE-30d. La integración de los niveles de miR-320a-3p junto con dislipemia y antecedentes de cardiopatía en un *score* de riesgo, ofreció un rendimiento predictivo de MACE a 30 días del 82,4%.

Capítulo 3: Identificamos 7 proteínas diferencialmente expresadas entre pacientes MACE-30d y NO MACE-4a, siendo el FGF-23 la proteína con mayor poder discriminatorio entre grupos. La validación de estos resultados por ELISA confirmó este dato. El modelo de ML definido por 3 variables: edad, hipertensión arterial y niveles plasmáticos de FGF-23 ofreció un poder predictivo de MACE temprano del 85%. El estudio funcional reveló que el FGF-23 en neutrófilos aumentó la NETosis, inhibió la producción de ROS y redujo la capacidad fagocítica y migratoria. En monocitos, aumentó el FT y activó diferentes rutas de señalización. En las HUVEC no se observaron efectos funcionales.

**Conclusiones.** Esta memoria aporta nuevos datos sobre diferentes enfoques en la búsqueda de biomarcadores moleculares predictores de MACE en pacientes con NAC.

1. La frecuencia de mutaciones relacionadas con CHIP se encuentra aumentada en pacientes con NAC y MACE-30d, aunque no afecta a la SG en este subgrupo de pacientes de alto riesgo. O bien el ECV tiene implicaciones en la SG de este subgrupo de pacientes, o bien el pequeño tamaño muestral nos impide sacar conclusiones inequívocas en este sentido.

**2.** La inclusión de los niveles de miR-320a-3p con variables clínicas en un *score* permite identificar con una precisión del 82,4% pacientes con NAC con riesgo cardiovascular a 30 días.

**3.** Los niveles plasmáticos de FGF-23 junto con variables clínicas en un modelo de ML ha mostrado un potencial valor pronóstico de MACE a 30 días en estos pacientes. El efecto funcional del FGF-23 en diferentes tipos celulares, podría justificar su papel como biomarcador de MACE en un escenario de trombo-inflamación.

# **SUMMARY**

---

Community-acquired pneumonia (CAP) is a common and potentially fatal infection with a high morbidity and mortality rate. Studies with different cohorts have shown that CAP increases the risk of cardiovascular disease (CVD) by 10-30%, which is related to systemic inflammation, endothelial dysfunction, and prothrombotic states. In this scenario, it is necessary to search for biomarkers capable of predicting cardiovascular complications associated with infection, as well as their integration into current clinical tools to optimize risk stratification in these high-risk patients.

In this Thesis, we have approached the search for these biomarkers using a multi-omic strategy in patients with CAP with and without major adverse cardiovascular events (MACE): (i) sequencing of CHIP mutations (clonal hematopoiesis of indeterminate potential), given that they are associated with an increase in the incidence of CVD; (ii) analysis of plasma miRNA profiles, which have emerged as non-invasive biomarkers with remarkable potential; and (iii) proteomic analysis, a useful tool for identifying diagnostic, prognostic, and therapeutic biomarkers.

**Aim 1-** Determine the prevalence of CHIP and analyze its association with the onset of MACE during follow-up of patients with CAP. **Aim 2-** Characterize the profile of circulating miRNAs in the plasma of patients with CAP and evaluate their association with MACE, as well as their potential integration with clinical variables. **Aim 3-** Identify differential plasma markers of MACE after an episode of CAP.

**Materials and Methods.** Plasma and DNA samples were collected from patients with CAD, with and without MACE after hospital admission, with a 4-year follow-up, as well as from healthy controls. For the CHIP study, sequencing (NGS) was performed on a customized panel of 4 genes related to CVD. Plasma miRNAs were quantified using miRNA-seq and validated by RT-qPCR. We used high-throughput proteomics and subsequent validation by ELISA, and machine learning (ML) tools. For *in vitro* functional experiments, neutrophils and monocytes were purified from peripheral blood from healthy donors and the HUVEC cell line. In neutrophils, NETotic capacity, reactive oxygen species (ROS) production, phagocytic capacity, and migratory capacity were evaluated. In monocytes and HUVEC, tissue factor (TF) production was evaluated. The data obtained were analyzed using the appropriate statistical tests for each case.

**Results.** Chapter 1: *TET2* was the most frequently mutated gene in patients with CAP. Patients with CHIP mutations were predominantly female and older, with higher 4-year mortality, lower overall survival (OS), and lower event-free survival. The incidence of CHIP mutations was higher in patients with early MACE (MACE-30d) than in those without MACE-30d. Finally, the presence of CHIP had no impact on 4-year overall survival in MACE-30d patients (N=38) but did have an impact on those without MACE-30d (N=58). Chapter 2: We identified 18 differentially expressed miRNAs between MACE-30d and NO MACE patients at 4 years (NO MACE-4a). Validation of 7 of these miRNAs revealed that miR-206, miR-320a-3p, and miR-423-5p were increased in MACE-30d patients. The integration of miR-320a-3p levels together with dyslipidemia and a history of heart disease into a risk score offered a predictive performance of MACE at 30 days of 82.4%. Chapter 3: We identified 7 proteins differentially expressed between MACE-30d and NO MACE-4a patients, with FGF-23 being the protein with the highest discriminatory power between groups. Validation of these results by ELISA confirmed this finding. The ML model defined by three variables: age, hypertension, and plasma FGF-23 levels offered an 85% predictive power for early MACE. The functional study revealed that FGF-23 in neutrophils increased NETosis, inhibited ROS production, and reduced phagocytic and migratory capacity. In monocytes, it increased FT and activated different signaling pathways. No functional effects were observed in HUVECs.

**Conclusions.** This work provides new data on different approaches in the search for molecular biomarkers predictive of MACE in patients with CAP.

1. The frequency of CHIP-related mutations is increased in patients with CAP and MACE-30d, although it does not affect OS in this subgroup of high-risk patients. Either CVD has implications for OS in this subgroup of patients, or the small sample size prevents us from drawing unequivocal conclusions in this regard.
2. The inclusion of miR-320a-3p levels with clinical variables in a score allows for the identification of patients with CAP at cardiovascular risk at 30 days with 82.4% accuracy.
3. Plasma FGF-23 levels together with clinical variables in an ML model have shown potential prognostic value for MACE at 30 days in these patients. The functional effect of FGF-23 in different cell types could justify its role as a biomarker for MACE in a thrombo-inflammatory scenario.

# **LISTADO DE ABREVIATURAS**

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>3'-5' UTR</b>	Región 3'/5' no traducida
<b>ACMG</b>	Colegio Americano de Genética Médica y Genómica
<b>Ago</b>	Argonauta
<b>ApoE</b>	Apolipoproteína E
<b>ARIC</b>	<i>Atherosclerosis Risk in Communities</i>
<b>ATS</b>	<i>American Thoracic Society</i>
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CANTOS</b>	<i>Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study</i>
<b>CD40L</b>	Ligando de CD40
<b>cfDNA</b>	Fragmentos cortos de ADN libre circulante
<b>CH</b>	Hematopoyesis clonal
<b>CHIP</b>	Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado
<b>citH3</b>	Histona H3 citrulinada
<b>CURB-65</b>	Confusión, Urea, Frecuencia respiratoria, Presión arterial y Edad ( $\geq 65$ ).
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ECV</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ERC</b>	Enfermedad renal crónica
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FA</b>	Fibrilación auricular
<b>FGF-23</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos 23
<b>FGFR</b>	Receptor de factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FT</b>	Factor tisular
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>HSC</b>	Célula madre hematopoyética
<b>IAM</b>	Infarto agudo de miocardio
<b>IC</b>	Insuficiencia cardiaca
<b>IC-FEp</b>	Insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada
<b>IDSA</b>	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
<b>IFN-I</b>	Interferón tipo-I
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1 beta
<b>IL-6</b>	Interleucina-6

<b>IL-6R</b>	Receptor de la interleucina-6
<b>IRAK1</b>	Quinasa 1 asociada al receptor de IL-1
<b>IRVS</b>	Soporte respiratorio intensivo o vasopresor
<b>Ldlr</b>	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
<b>LMA</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MACE</b>	Eventos cardiovasculares adversos mayores
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>mRNA</b>	ARN mensajero
<b>MR-proADM</b>	Proadrenomedulina de la región media
<b>MR-proANP</b>	Péptido natriurético pro-auricular de la región media
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>NAAT</b>	Prueba de amplificación de ácidos nucleicos
<b>NAC</b>	Neumonía adquirida en la comunidad
<b>NET</b>	Trampas extracelulares de neutrófilos
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa B
<b>NMP</b>	Neoplasia mieloproliferativa
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>onco-miR</b>	miRNA oncogénico
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PAR</b>	Receptor activado por proteasas
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PBS</b>	Solución tamponada con fosfato
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>PCT</b>	Procalcitonina
<b>PEA</b>	Ensayo de extensión de proximidad
<b>PESA</b>	<i>Progression of Early Subclinical Atherosclerosis</i>
<b>PF-4</b>	Factor plaquetario-4
<b>Ply</b>	Neumolisina
<b>pre-miRNA</b>	miRNA precursor
<b>pri-miRNA</b>	miRNA primario
<b>PSI</b>	<i>Pneumonia severity index</i>

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>RISC</b>	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAsa</b>	Ribonucleasa
<b>RNA-seq</b>	Secuenciación de ARN
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RT-qPCR</b>	PCR cuantitativa con transcriptasa inversa
<b>SMD</b>	Síndrome mielodisplásico
<b>STEMI</b>	Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST
<b>TAVI</b>	Implante valvular aórtico transfemoral
<b>TBS</b>	Solución tamponada con Tris
<b>TC</b>	Tomografía computarizada
<b>TIO</b>	Osteomalacia inducida por tumores
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll
<b>Tn</b>	Troponina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TRAF6</b>	Factor 6 asociado a receptores TNF
<b>TOPMed</b>	<i>Trans-omics for Precision Medicine</i>
<b>UCI</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>UK Biobank</b>	<i>United Kingdom Biobank</i>
<b>VAF</b>	Frecuencia alélica variante
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>VWF</b>	Factor von Willebrand
<b>XLH</b>	Hipofosfatemia ligada al cromosoma X

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## **1. NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD (NAC): CONTEXTO GENERAL**

### **1.1. Epidemiología y fisiopatología de la NAC**

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (2021), y del *Global Burden of Disease Study* (GBD), las infecciones de las vías respiratorias inferiores son la enfermedad transmisible con mayor mortalidad del mundo, posicionándose como la quinta causa principal de muerte a nivel global, con 2,5 millones de muertes anuales.<sup>1,2</sup> La NAC es una infección frecuente, con una elevada tasa de morbimortalidad, y con un impacto considerable en los sistemas sanitarios de todo el mundo.<sup>3</sup> Este pronóstico desfavorable suele estar relacionado con la gravedad de la NAC, así como con las características de los pacientes, como la edad, factores genéticos, estado inmunológico (personas inmunodeprimidas) y comorbilidades asociadas, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes mellitus, insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedad coronaria y hepatopatía.<sup>4</sup> Cabe destacar que una novena parte de los pacientes hospitalizados con NAC requerirán ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI) debido a insuficiencia respiratoria grave, sepsis grave y shock séptico, con tasas de mortalidad muy elevadas, situándose cerca del 50%.<sup>5,6</sup>

En cuanto a la etiología de la NAC, se ha observado que los patógenos causales más comunes en población adulta son *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) y *Haemophilus influenzae* (gripe) (1,2-19% de casos), aunque se han reportado diferencias en función del área demográfica, relacionadas con cambios en la pauta de vacunación, tipo de vacuna utilizada, tasas de vacunación neumocócica infantil y contra la influenza en adultos, así como hábitos de tabaquismo y accesibilidad a la terapia antibiótica temprana en diferentes regiones.<sup>7,8</sup> Existen numerosos desafíos con relación al diagnóstico, tratamiento y manejo clínico a largo plazo en los pacientes con NAC. En base a esto, es necesario un enfoque personalizado en el tratamiento de la NAC para abordar su complejidad y heterogeneidad, acorde a la gravedad clínica, los biomarcadores séricos y factores de riesgo para patógenos específicos.<sup>9</sup>

La NAC ocurre cuando patógenos (bacterias, virus u hongos) proliferan descontroladamente en el tracto respiratorio inferior, ocasionando una inflamación local considerable, con el posterior daño tisular.<sup>10</sup> En condiciones fisiológicas, los macrófagos del espacio alveolar se encargan de la eliminación del patógeno. En la NAC, se excede la

capacidad fagocítica de estas células, activándose vías de respuesta inflamatoria, junto al reclutamiento de neutrófilos y monocitos a la circulación sistémica. Los productos liberados por estas células (enzimas líticas, oxidantes y material nuclear) atacan al epitelio alveolar, con la consiguiente liberación exacerbada de gammaglobulinas y fibrinógeno, y un intercambio de gases deficiente. Esto desencadena el cuadro clínico de la NAC, con disnea, pirexia, y en los casos más graves, hipoxia e hipercapnia.<sup>11</sup> En los pacientes con NAC grave, la alta mortalidad se asocia al desarrollo de la insuficiencia orgánica extrapulmonar por diversos mecanismos: invasión bacteriana directa y bacteriemia, inflamación sistémica por activación del complemento y liberación de citocinas, inmunoparesia e incapacidad para la eliminación de patógenos. Este cuadro fisiopatológico puede derivar en lesión renal y hepática aguda, insuficiencia cardiovascular y shock séptico.<sup>12</sup> En base a esto, hay que prestar especial atención a la evidencia que vincula a la propia infección con el riesgo de complicaciones a largo plazo, como enfermedades cardiovasculares (ECV), disfunción respiratoria persistente y deterioro cognitivo, especialmente en pacientes de edad avanzada y personas con NAC grave y mal pronóstico.<sup>13</sup>

### 1.2. Cuadro clínico y diagnóstico

En cuanto a las manifestaciones clínicas predominantes en la NAC destacan la tos (frecuentemente con expectoración), disnea y dolor torácico pleurítico derivado de la infiltración inflamatoria del espacio alveolar; que pueden ir acompañados de taquipnea, ruidos respiratorios y signos de consolidación como matidez a la percusión o egofonía. El enfoque diagnóstico de la NAC es variable pero los criterios más aceptados implican la identificación de signos clínicos e infiltrados radiológicos de consolidación pulmonar, temperatura corporal anormal, taquipnea y taquicardia. La inflamación sistémica se extiende a parámetros de laboratorio alterados [recuento total de leucocitos ( $<4.000/\mu\text{L}$  o  $>10.000/\mu\text{L}$ ), recuento de neutrófilos ( $>15\%$ ) o concentraciones elevadas de proteína C reactiva (PCR) o procalcitonina (PCT)]. Hay que destacar que ningún signo clínico por sí solo presenta un buen poder predictivo para la identificación de pacientes con infiltración radiográfica.<sup>14,15</sup> En cuanto a los métodos estándar para identificar la infiltración alveolar destacan la radiografía torácica, imágenes por tomografía computarizada (TC) o la ecografía pulmonar; siendo el *gold standard* la evaluación radiográfica, recomendándose la TC en los casos inciertos o no concluyentes, según las directrices de la *Infectious Diseases Society of America (IDSA)* y la *American Thoracic*

*Society* (ATS). Por su parte, el hallazgo de broncogramas aéreos dinámicos se considera una característica ecográfica patognomónica de neumonía.<sup>16</sup> El diagnóstico definitivo se confirma mediante el análisis microbiológico que permite la identificación del patógeno, bien en muestras de sangre o esputo. La detección de antígenos se emplea para la detección de patógenos específicos, como las pruebas de antígenos urinarios para *S. pneumoniae* y *L. pneumophila*, y en muestras de hisopos de las vías respiratorias superiores.<sup>17</sup> A su vez se ha demostrado que las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos al ingreso (NAAT) para la detección de patógenos virales, reducen el tiempo hasta el uso de antimicrobianos, el inicio del tratamiento antiviral y la duración de la hospitalización.<sup>18</sup>

### 1.3. Escalas de gravedad clínica

Los criterios más estandarizados y aceptados para definir la NAC grave son los de la IDSA y la ATS; con criterios mayores (requerimiento de ventilación mecánica invasiva o shock séptico que requiere tratamiento con vasopresores) y criterios menores [frecuencia respiratoria  $\geq 30$  respiraciones por minuto; relación presión arterial de oxígeno/fracción inspirada de oxígeno de  $\leq 250:1$ ; presencia de infiltrados multilobulares; confusión o desorientación; uremia con nitrógeno ureico en sangre  $\geq 20$  mg/dL; leucopenia ( $< 4.000$  glóbulos blancos/ $\mu\text{L}$ ); trombocitopenia ( $< 100.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ), hipotermia (temperatura central  $< 36$  °C); e hipotensión que requiere reanimación agresiva con líquidos. El diagnóstico de NAC grave se confirma con la presencia de un criterio mayor o 3 criterios menores presentes en el paciente.<sup>19</sup> Dentro de los *scores* de gravedad de la NAC disponibles y más aplicables en la práctica clínica destacan el CURB-65 y el *Pneumonia Severity Index* (PSI-FINE).<sup>20</sup>

- El **CURB-65**, con una puntuación de 0-5, evalúa la mortalidad y el requerimiento de ingreso en la NAC (0-1, riesgo bajo; 2, posible ingreso;  $\geq 3$  grave, considerar ingreso en UCI). En cuanto a las variables incluye: confusión, urea  $> 7$  mmol/L, frecuencia respiratoria  $\geq 30$  respiraciones por minuto, presión arterial sistólica  $< 90$  mmHg o diastólica  $\leq 60$  mmHg, y edad  $\geq 65$  años.<sup>21</sup>
- El **PSI**, puntuación I-V, predice la mortalidad a 30 días de la NAC (I-II bajo riesgo; III riesgo moderado; IV-V riesgo alto, considerar ingreso en UCI). Incluye 20 variables: demográficas (edad, sexo y lugar de residencia), de comorbilidad (enfermedades crónicas y estado de inmunosupresión), de exploración física

(frecuencia respiratoria y cardiaca, presión arterial, confusión/desorientación, temperatura) y de laboratorio y radiológicas (pH arterial, sodio, glucosa, urea, hematocrito, leucocitos, plaquetas, oxígeno en sangre, infiltrados multilobulares, derrame pleural).<sup>21,22</sup>

Existen otros *scores* como el SMART-COP [predice la necesidad de soporte respiratorio intensivo o vasopresor (IRVS) en UCI], SAPS II (ofrece una puntuación general de gravedad de la NAC y mortalidad en UCI), *Pneumonia Shock* (predice la mortalidad en UCI en caso de shock séptico asociado a la NAC) o APACHE II (predice mortalidad y evalúa la gravedad dentro de las primeras 24-72 horas de ingreso en pacientes con neumonía grave en UCI).<sup>22-24</sup>

### 1.4. Impacto de la NAC sobre la morbimortalidad cardiovascular

En las últimas décadas, se está prestando especial interés a la incidencia de ECV en pacientes con infección, como NAC o sepsis. Se ha descrito en estudios con diferentes cohortes que la NAC incrementa el riesgo de ECV entre un 10-30%, siendo las consecuencias más frecuentes la insuficiencia cardiaca (IC), la fibrilación auricular (FA) y el infarto de miocardio (IM).<sup>25</sup> Este mayor riesgo de desarrollar ECV se ha relacionado con la inflamación sistémica, la disfunción endotelial y estados protrombóticos derivados de la fase de infección aguda.<sup>26</sup> Los principales mecanismos putativos implicados en la patogénesis de la lesión miocárdica en la neumonía neumocócica grave incluyen los efectos cardiotóxicos de la citolisina neumocócica formadora de poros, la neumolisina (Ply) y otros productos derivados de la infección bacteriana, así como una antigenemia (presencia de antígenos en sangre) persistente que podría predisponer al desarrollo de un fenotipo proinflamatorio/protrombótico sistémico como inductor de futuros ECV.<sup>27,28</sup> Es por ello por lo que la prevención de infecciones neumocócicas mediante esquemas de vacunación o el uso de agentes activos contra Ply, constituyen prometedoras estrategias para mitigar el impacto de la NAC y sus ECV concomitantes.

En un estudio prospectivo de más de 1300 pacientes hospitalizados por NAC reportaron tasas de ECV de un 26,7%, siendo la gran mayoría (89,1%) detectados en la primera semana al ingreso, y más de la mitad en las primeras 24 horas. En cuanto a los factores de riesgo asociados destacaron la edad avanzada, antecedentes cardiovasculares previos, hipertensión arterial y gravedad de la infección, entre otras. Cabe destacar que aquellos pacientes que desarrollaron complicaciones cardiacas tuvieron un mayor riesgo de

mortalidad a 30 días, tras ajustar por la puntuación inicial del índice de gravedad de la NAC (OR 1,6; IC 95% 1,04-2,5).<sup>26</sup> En el estudio prospectivo observacional FADOI-ICECAP con 1266 pacientes con NAC, evaluaron la incidencia acumulada de ECV durante la hospitalización en 26 Unidades de Medicina Interna. Informaron de tasas de ECV en el 23,8% de los pacientes, ocurriendo en los primeros 3 días de la hospitalización en el 75% de la cohorte; con tasas de mortalidad intrahospitalaria, tasa de re-hospitalización y estancias hospitalarias medias significativamente superiores en pacientes que desarrollaron ECV concomitante a la infección respiratoria.<sup>29</sup> Un estudio colaborativo del grupo español NEUMONAC con casi 2000 pacientes con NAC, reportó tasas de ECV temprano del 10,42%, y un 6,64% de eventos tardíos, con tasas de mortalidad a 1 año del 16%, concluyendo que el desarrollo de ECV en pacientes con NAC fue un factor de riesgo independiente relacionado con la mortalidad temprana (OR 2,37) y tardía (OR 4,05).<sup>30</sup> Es por ello que identificar a este subgrupo de pacientes de alto riesgo es fundamental para redefinir la actuación clínica, especialmente al ingreso.

## 2. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA TROMBO-INFLAMACIÓN

El término de inmunotrombosis se acuñó por primera vez en el año 2013 por Engelmann y Massberg definido por un escenario fisiológico que conecta la activación de la coagulación y la respuesta inmunitaria innata, que ante situaciones patológicas puede ocasionar una activación exacerbada de la cascada de la coagulación, provocando la eliminación de los patógenos en caso de infección.<sup>31</sup> Este proceso ayuda a suprimir la invasión tisular y la diseminación de patógenos, y a reducir su supervivencia en el organismo. Sin embargo, si no se controla, la inmunotrombosis es un proceso biológico importante que favorece las patologías asociadas con la trombosis como accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, coagulopatía intravascular diseminada durante la sepsis y trombosis venosa profunda.<sup>31</sup> Surge así el concepto de trombo-inflamación, aunando las interacciones entre la coagulación y la inflamación, con especial interés en el sistema vascular, que juega un papel importante en la trombosis. Este fenómeno se inicia principalmente por factores humorales del sistema inmunitario innato, aunque también intervienen diferentes componentes celulares, como los leucocitos, plaquetas y células endoteliales (**Figuras 1-2**).<sup>32</sup> En cuanto a su fisiopatología destacan diferentes mecanismos:

- La principal respuesta fisiológica ante una lesión es la **activación de la cascada de la coagulación**. Ante una lesión vascular, las células mononucleares, plaquetas y células endoteliales, liberan factor tisular (FT), iniciándose así la cascada de la coagulación extrínseca, al unirse con el FVII y calcio, formando un complejo que activa al FX. Por otro lado, la vía intrínseca comienza con la activación del FXII (zimógeno) tras la exposición al colágeno endotelial. Ambas vías convergen en la activación del FX en la vía común, en una reacción mediada por un complejo conocido como tenasa.<sup>33</sup> La trombina representa un factor de coagulación crítico que vincula tanto la coagulación como la inflamación, convirtiéndola en un objetivo terapéutico clave en un contexto de trombo-inflamación.<sup>34</sup>
- Otro de los mecanismos relevantes en trombo-inflamación es la **activación del sistema del complemento**, clave en la interconexión entre el sistema inmune innato, la coagulación, la fibrinólisis e interacciones celulares en diversas patologías infecciosas.<sup>35</sup> Se ha reportado, que la activación del complemento

interactúa con los receptores tipo Toll (TLR), activando la inflamación y la coagulación.<sup>36</sup> Entre los factores del complemento, son de particular relevancia el C3a y C5a (anafilotoxinas) ya que regulan positivamente la producción de mediadores inflamatorios al unirse a sus receptores. Además, el factor C5a tiene efecto procoagulante mediante una remodelación de la membrana leucocitaria y una inducción de los neutrófilos para liberar trampas extracelulares de neutrófilos (NET), a la vez que aumenta la expresión de FT en monocitos y células endoteliales, induciendo un *feedback* positivo con la cascada de la coagulación.<sup>37,38</sup> También se ha reportado que el C5a puede inhibir la fibrinólisis al activar el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) en mastocitos y basófilos.<sup>39</sup>

- Los **leucocitos**, como neutrófilos y monocitos, juegan un papel importante en trombo-inflamación, y en la respuesta inmune primaria. Expresan una gran diversidad de receptores como TLR, receptores Fc $\gamma$ , receptores acoplados a proteína G (GPCR), receptores de adhesión y receptores activados por proteasas (PAR).<sup>40</sup> En respuesta a una infección (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMP), los TLR desencadenan una liberación prolongada de citocinas, induciendo respuestas proinflamatorias y procoagulantes. Por su parte, los GPCR actúan como receptores para quimioatrayentes y quimiocinas, mientras que los receptores de adhesión y Fc $\gamma$  juegan un papel en la agregación leucocito-plaqueta y en la interacción células-endotelio.<sup>41,42</sup> Los neutrófilos activados inducen una respuesta inflamatoria, liberando proteasas y radicales de oxígeno, finalmente conduciendo a diversos tipos de muerte celular como necrosis, necroptosis y piroptosis.<sup>43</sup> Además se sabe que los neutrófilos, y también otros tipos celulares como los monocitos, liberan estructuras de DNA en forma de red con componentes intracelulares (histonas, proteínas). Estas NET participan en la defensa del huésped ante una infección, con papel relevante en trombo-inflamación.
- Las **plaquetas** son otro tipo celular con un rol activo en la trombosis, la hemostasia y la inflamación, al presentar receptores de patógenos en superficie y regulando la respuesta inmune innata mediante la producción de citocinas y la liberación de factores de coagulación.<sup>44</sup> La activación plaquetaria y su interacción

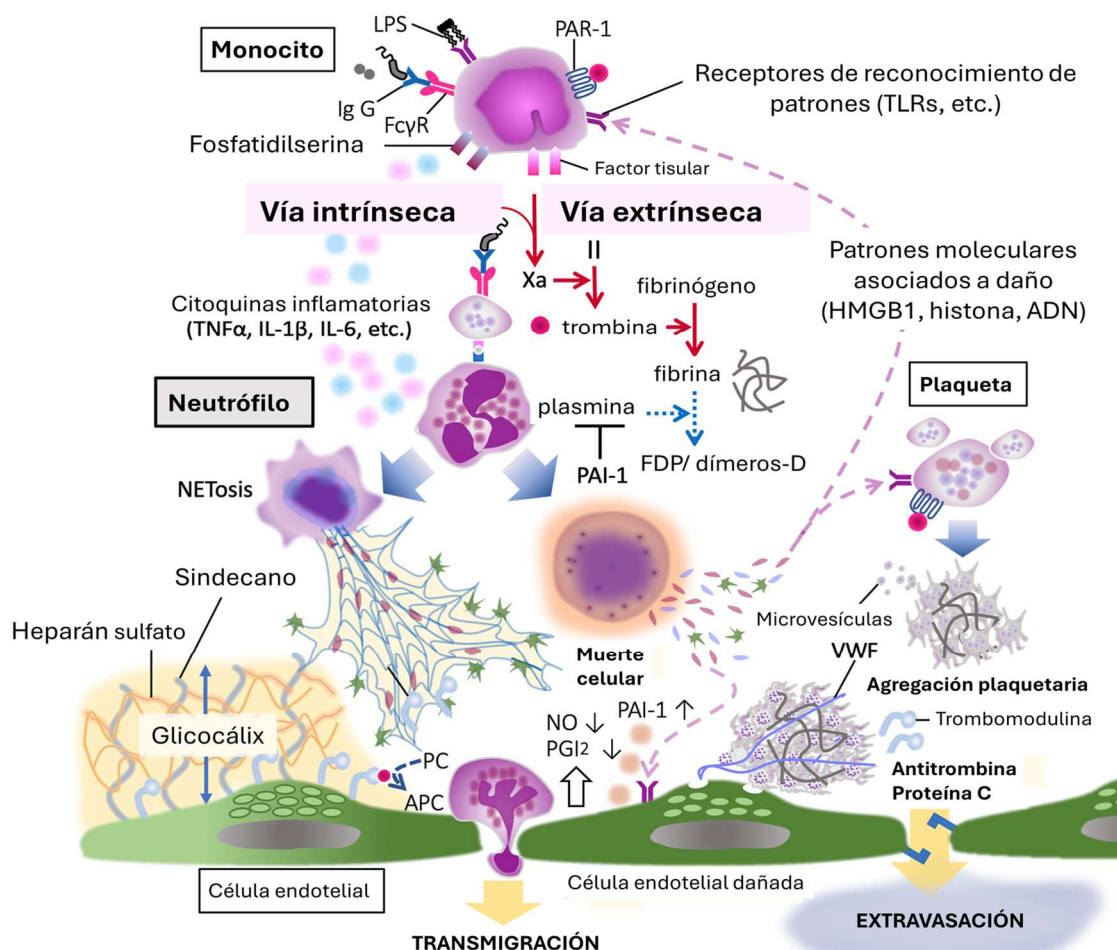
con neutrófilos y monocitos/macrófagos estimulan la formación de NET, induciendo un escenario de inflamación y coagulación.<sup>45</sup> Las plaquetas liberan una gran heterogeneidad de mediadores inflamatorios y hemostáticos como el factor plaquetario 4 (PF-4), el factor von Willebrand (VWF), el factor VIII y la selectina-P, entre otros.<sup>42</sup> Se ha descrito que el PF-4 favorece la eliminación del patógeno al unirse a los polianiones bacterianos de forma dependiente de la carga (opsonización), a través del receptor plaquetario Fc $\gamma$ RIIA.<sup>46</sup> A su vez, las plaquetas reconocen lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gramnegativas a través de TLR4, sintetizando citocinas, iniciando la agregación y liberando su contenido granular en respuesta a una infección.<sup>47</sup> La expresión del ligando CD40 (CD40L) en la membrana plaquetaria también se ha relacionado con la implicación de estas células en la trombo-inflamación. El CD40L interacciona con su receptor (CD40), presente en monocitos/macrófagos y células endoteliales, a la vez que se une a las integrinas  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y  $\alpha$ M $\beta$ 2, favoreciendo la adhesión celular.<sup>48</sup> Recientemente se ha investigado el papel del receptor tipo C2 similar a la lectina (CLEC-2), un receptor de activación plaquetaria activado por la proteína transmembrana podoplanina, en la trombo-inflamación, al participar en la interacción leucocito-plaqueta, promoviendo la formación de microcoágulos en circulación.<sup>49</sup>

- La **disfunción o daño endotelial** tras la inflamación intravascular es otro de los mecanismos en trombo-inflamación. Este escenario se caracteriza por una disminución de la producción de óxido nítrico, prostaglandina I<sub>2</sub>, un aumento de la expresión de FT, la eliminación de trombomodulina y una liberación de VWF. Esto conlleva a una inhibición de la fibrinólisis, lo que imposibilita la disolución del coágulo de fibrina.<sup>50</sup> El glicocálix que recubre la superficie endotelial, compuesto de proteoglicanos, glicosaminoglicanos y glicoproteínas, proporciona actividad antitrombótica, ya que su componente principal, el heparán sulfato presenta un sitio de unión para la antitrombina.<sup>51,52</sup> Tras una lesión vascular o infección, esta barrera se interrumpe, expresando moléculas de adhesión para la unión de los agregados leucocitos/plaquetas, junto con una mayor extravasación vascular de factores anticoagulantes (antitrombina y proteína C), potenciando la formación de trombos.<sup>53,54</sup> Al igual que los otros tipos celulares, las células endoteliales también expresan receptores inmunitarios innatos, tales como TLR y PAR, y cuya activación modula la permeabilidad microvascular y la

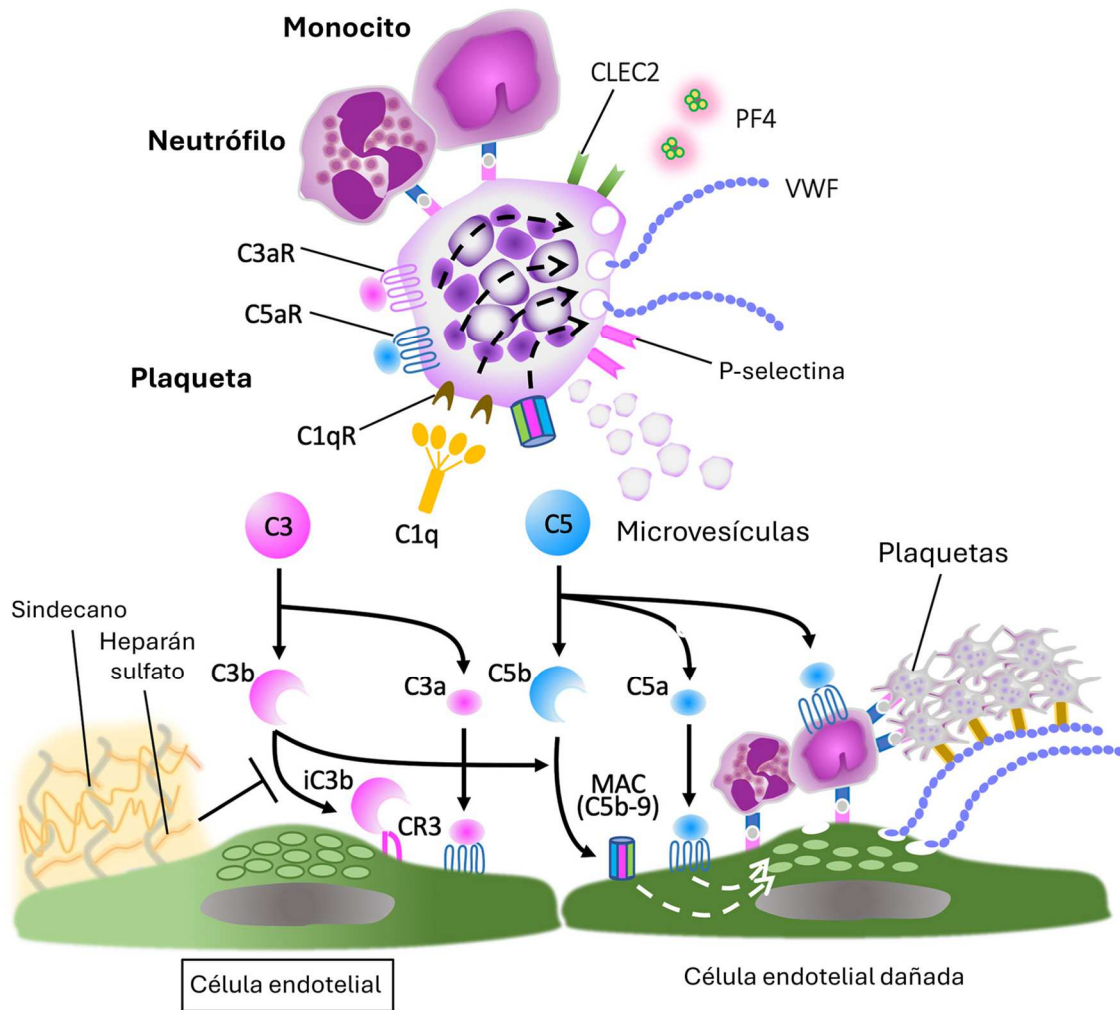
expresión de moléculas de adhesión.<sup>55</sup> La antitrombina activa a PAR-1 provocando cambios funcionales en las células endoteliales, adquiriendo un fenotipo proinflamatorio y procoagulante, mayor permeabilidad, e inducción de la expresión de proteínas protrombóticas, junto con una producción aumentada de citocinas inflamatorias.<sup>56</sup> La fibrinólisis también se ve alterada debido a la mayor producción de PAI-1 en la barrera endotelial, conduciendo a la aparición de microtrombos, daño celular e hipoxia celular, y provocando una respuesta deficiente en los sistemas de defensa del huésped ante la infección.<sup>57</sup>

- Finalmente, también se ha estudiado la implicación de los **eritrocitos** en la respuesta inmunitrombótica. Durante la eriptosis, proceso apoptótico característico de este tipo celular, se produce un aumento de la expresión de fosfatidilserina en la membrana celular, pudiendo desempeñar un papel activo en la coagulación y formación de trombos.<sup>58</sup> Estos eritrocitos fosfatidilserina-positivos pueden adherirse a las células endoteliales vía receptor CXCL16, proceso desencadenado por un escenario de estrés oxidativo en condiciones de infección sistémica grave.<sup>59,60</sup>

En conjunto, la trombo-inflamación representa un proceso complejo y dinámico en el que convergen los sistemas inmunitario, hemostático y vascular, evidenciando una estrecha interrelación entre coagulación e inflamación. La activación desregulada de diferentes tipos celulares como leucocitos, plaquetas, células endoteliales y componentes humorales como el complemento, puede derivar en un escenario de daño tisular y trombosis patológica. Así, el equilibrio entre las respuestas proinflamatorias y anticoagulantes se postula como un elemento crítico para mantener la homeostasis vascular, mientras que su alteración constituye la base fisiopatológica de diversas enfermedades trombóticas e inflamatorias. Comprender en profundidad los mecanismos celulares y moleculares de la trombo-inflamación resulta esencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas que permitan modular selectivamente esta respuesta.



**Figura 1. Trombo-inflamación en infección.** Los monocitos expresan diversos receptores, como los receptores Toll, el receptor Fcγ (FcγR) y el receptor activado por proteasas (PAR)-1, e inducen respuestas inflamatorias y procoagulantes. Los monocitos activados expresan el factor tisular y la fosfatidilserina, que inician las cascadas de coagulación intrínseca y extrínseca, respectivamente. Los monocitos también liberan citocinas proinflamatorias y estimulan a los neutrófilos. Los neutrófilos activados expulsan trampas extracelulares (NET), lo que facilita aún más la inflamación y la coagulación. Los neutrófilos dañados liberan patrones moleculares asociados al daño (DAMP), y las plaquetas liberan vesículas extracelulares procoagulantes y contenidos de gránulos protrombóticos, como el factor von Willebrand (VWF) y el factor plaquetario 4 (PF4). El VWF ayuda a la agregación plaquetaria y el PF4 neutraliza el heparán sulfato. La superficie endotelial vascular aumenta la trombogenicidad al disminuir la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandina I2 (PG I2) y aumentar la producción del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). La trombomodulina, que convierte la proteína C (PC) en proteína C activada (APC), se desprende de la membrana celular, y la antitrombina y la proteína C se extravasan con el aumento de la permeabilidad vascular. **FDP**, productos de degradación de la fibrina/fibrinógeno; **HMGB1**, caja 1 del grupo de alta movilidad; **Ig G**, inmunoglobulina G; **IL**, interleucina; **LPS**, lipopolisacárido; **TNF**, factor de necrosis tumoral. Figura adaptada de *Iba T. et al., J Thromb Haemost. (2024)*.<sup>32</sup>



**Figura 2. Activación del sistema del complemento en enfermedades inflamatorias.** C3a y C5a se forman a través de la escisión de C3 y C5, respectivamente. C3a actúa como una anafilatoxina y también recluta y activa células inmunes, como neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. La unión del receptor C3aR y la unión de iC3b al receptor del complemento (CR) 3 en el endotelio pueden desencadenar vías de señalización dentro de las células endoteliales, lo que lleva a su activación. El heparán sulfato, suprime la escisión de C3b. C3b también induce un ciclo de retroalimentación positiva en la cascada del complemento al catalizar C5, lo que resulta en la formación del complejo de ataque a la membrana C5b-C9 (MAC). Las señales del MAC y la unión del receptor C5aR estimulan la liberación del factor de von Willebrand (VWF). De manera similar, las señales de C3a-C3aR, C1q-C1qR y MAC activan las plaquetas y estimulan la liberación del factor plaquetario 4 (PF-4) y el VWF, la expresión del receptor tipo C similar a la lectina 2 (CLEC2) y la P-selectina, lo que conduce a la regulación positiva de las interacciones célula-célula. Figura adaptada de *Iba T. et al., J Thromb Haemost. (2024).*<sup>32</sup>

### **3. BIOMARCADORES EN EL ESTUDIO DE LA TROMBO-INFLAMACIÓN Y RIESGO CARDIOVASCULAR EN NAC**

#### **3.1. Ómicas para la búsqueda de biomarcadores**

Las “ómicas” se definen como un conjunto de disciplinas para la caracterización y análisis exhaustivos de moléculas biológicas con el fin de establecer su estructura, función e implicación en determinadas patologías; siendo los métodos de análisis más destacados: genómicos, transcriptómicos y proteómicos. La implementación y creciente desarrollo de un escenario “multi-ómico” ha permitido ofrecer nuevas oportunidades para expandir la utilidad de los biomarcadores plasmáticos, como su incorporación al fenotipado molecular y el desarrollo de estrategias de tratamiento precisas, con el objetivo de ofrecer una medicina de precisión personalizada a cada paciente.<sup>61</sup>

A continuación, se describen con más detalle las aproximaciones ómicas que se han utilizado en esta memoria de Tesis.

#### **3.1.1. Enfoque genómico: Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP)**

La hematopoyesis clonal (CH) es un término que hace referencia a la presencia de poblaciones clonales en células madre hematopoyéticas (HSC). La hematopoyesis es generalmente un proceso policlonal y equipotencial de HSC, que origina células mieloides, linfoides, eritroides y megacariocíticas. Por el contrario, la CH se asocia a mutaciones somáticas en genes que confieren una ventaja selectiva de expansión en la médula, y ocurre frecuentemente en HSC envejecidas, con baja capacidad de corregir errores genéticos. La CH también puede inducirse ante presiones selectivas externas como terapias citotóxicas o tabaquismo.<sup>62</sup> Para su expansión, la CH requiere de mutaciones cooperativas en genes adicionales. Como resultado, se puede inducir una transformación maligna, conduciendo al desarrollo de una neoplasia hematológica, aunque la CH también se detecta en personas sanas, con más frecuencia en edades avanzadas.<sup>63,64</sup>

En el año 2015 se definió el término de CHIP, acorde a los siguientes criterios: la CHIP debe ocurrir en ausencia de variación morfológica en las células sanguíneas, la mutación debe estar presente en una frecuencia alélica variante (VAF)  $\geq 2\%$  en sangre periférica y en ausencia de criterios diagnósticos de enfermedad hematológica. Cabe destacar que el *cut off* clínico de la VAF en CHIP, difiere en los diferentes estudios de investigación en

función de la resolución de las diferentes plataformas de secuenciación.<sup>65</sup> Cabe dilucidar si la CHIP representa una consecuencia natural del envejecimiento del sistema hematopoyético o un estado preleucémico del síndrome mielodisplásico (SMD) o leucemia mieloide aguda (LMA). En estudios con modelos murinos se ha informado que dos genes frecuentemente mutados en la CHIP, *Dnmt3a* y *Tet2*, promueven la autorrenovación de las HSC, sustentando la hipótesis de la expansión clonal como mecanismo compensatorio del potencial proliferativo reducido del nicho hematopoyético en edades avanzadas.<sup>66,67</sup> Por su parte, en el desarrollo y evolución de la neoplasia entran en juego otros factores más allá de la presencia de una CHIP, como el tamaño del clon, número de mutaciones o presencia de mutaciones específicas en genes de reparación del DNA o de la maquinaria de *splicing*, así como alteraciones en el microambiente medular o el sistema inflamatorio, o tratamiento quimioterápico.<sup>68-71</sup>

### **3.1.1.1. CHIP y ECV**

La presencia de mutaciones CHIP implica un mayor riesgo relativo de desarrollar una neoplasia hematológica, pese al pequeño riesgo absoluto, 0,5-1% anual.<sup>72</sup> Estudios epidemiológicos de grandes cohortes han reportado una mayor frecuencia de mutaciones clonales dependiente de la edad, donde los genes *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1* fueron los más recurrentemente mutados. A su vez, la presencia de una mutación se asoció con un aumento del riesgo hematológico (HR 11,1), de la mortalidad por todas las causas (HR 1,4) y mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardíaca coronaria incidente (HR 2) y accidente cerebrovascular isquémico (HR 2,6).<sup>73</sup> A su vez, en un estudio que incluyó 4726 pacientes con enfermedad coronaria y más de 3500 controles informaron que los portadores de CHIP presentaron un riesgo 1,9 veces mayor de desarrollar enfermedad coronaria frente a los no portadores, y un riesgo 4 veces mayor de infarto agudo de miocardio (IAM), relacionándose mutaciones en los genes *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* y *JAK2* con la patología cardiovascular. Por su parte, el modelo murino deficiente en *Tet2* presentó una aterosclerosis acelerada.<sup>74</sup> En un contexto de IC crónica se ha encontrado una frecuencia de mutaciones CHIP del 18,5% en una población de 200 pacientes. Las mutaciones se encontraron mayoritariamente en *DNMT3A*, *TET2*, *KDM6A* y *BCOR*, en pacientes mayores y con antecedentes de hipertensión. La presencia de mutaciones en *TET2* o *DNMT3A* (HR 2,1) y la edad (HR 1,04) se relacionaron de forma independiente con un resultado adverso en cuanto a mortalidad combinada con hospitalización por IC.<sup>75</sup> Se han detectado mutaciones somáticas impulsoras en *DNMT3A/TET2* en el 33,3% en

pacientes con estenosis valvular aórtica grave sometidos a implante valvular aórtico transfemoral (TAVI), observando que aquellos pacientes portadores de CHIP presentaron un aumento de la mortalidad por todas las causas post-TAVI, con una polarización del linaje de linfocitos T proinflamatorios en portadores en *DNMT3A* y aumento de monocitos no clásicos en portadores en *TET2*.<sup>76</sup> Además, recientemente se ha publicado un trabajo con 3692 participantes incluidos en el estudio de cohorte prospectivo observacional *Progression of Early Subclinical Atherosclerosis* (PESA) donde han informado que los portadores de mutaciones CHIP presentaron tasas significativamente más altas de desarrollar aterosclerosis femoral *de novo* en un seguimiento a 3 años, correlacionándolo con el tamaño del clon mutante. Así mismo, la presencia de aterosclerosis subclínica no tuvo un efecto significativo en la expansión de clones hematopoyéticos mutantes, confirmando una asociación unidireccional de la CH como inductora de la enfermedad aterosclerótica.<sup>77</sup>

### 3.1.1.2. CHIP e infección

Más allá de su papel como factor de riesgo para neoplasias hematológicas o ECV, las consecuencias de la CH también pueden involucrar respuestas inmunitarias frente a agentes infecciosos, modulando tanto la susceptibilidad a infecciones graves como la capacidad de la respuesta inmunitaria innata.<sup>78</sup>

Un análisis basado en datos del *United Kingdom Biobank* (UK Biobank) identificó que la presencia de CHIP se asoció de forma significativa con la incidencia de neumonía, sugiriendo que pacientes portadores de mutaciones clonales presentan una predisposición incrementada a las infecciones respiratorias. Este incremento en la susceptibilidad se ha vinculado, parcialmente, a alteraciones funcionales en diferentes tipos celulares como neutrófilos y monocitos derivados de clones mutados, con especial interés en mutaciones en *TET2*.<sup>79</sup>

Aunque la evidencia específica de CHIP en la fisiopatología de sepsis no está bien esclarecida, estudios sobre estados inflamatorios crónicos sugieren que la presencia de clones mutados en genes epigenéticos (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*) o reparadores del DNA está asociada con cambios funcionales en células inmunitarias que podrían justificar una respuesta desregulada ante agentes infecciosos graves.<sup>80</sup> En base a esta perspectiva, se ha informado que en pacientes hospitalizados con infección por SARS-CoV-2 presentaron una prevalencia elevada de CHIP, correlacionándose con manifestaciones clínicas como

linfopenia persistente y neutrofilia, evidencias ambas de una mayor severidad inflamatoria y riesgo tromboembólico.<sup>81,82</sup>

En conjunto, estas evidencias posicionan a la CHIP no únicamente como precursor de hematopatías malignas o patologías cardiovasculares, sino también como un modulador potencial de la respuesta inmune frente a infecciones, abriendo una nueva área de investigación basada en la interacción entre CH, inflamación crónica, ECV y susceptibilidad a infecciones severas.

### **3.1.2. Enfoque transcriptómico: microRNA (miRNA)**

Hace más de 3 décadas de las primeras investigaciones que pusieron de manifiesto el papel de los miRNA en el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, y en *Drosophila*.<sup>83,84</sup> No fue hasta el año 2001 cuando los miRNA fueron reconocidos como una amplia clase de pequeños RNA en eucariotas superiores, impulsando una prometedora línea de investigación sobre este nuevo paradigma regulador de expresión génica.<sup>85,86</sup>

Los miRNA son RNA de aproximadamente 22 nucleótidos (nt) derivados de la transcripción de miRNA primario (pri-miRNA), con estructura de horquilla. La gran mayoría de miRNA conservados se sintetizan mediante una vía canónica en la que están involucradas dos enzimas Ribonucleasa (RNAsa) III.<sup>87</sup> El miRNA precursor (pre-miRNA) de alrededor de 55-70 nt es generado en el núcleo por el complejo nuclear catalítico formado por Drosha III (Drosha) y DGCR8. Una vez exportado al citoplasma, por una exportina dependiente de Ran-GTP (XPO-5), es escindida cerca del bucle terminal por la RNAsa Dicer, produciendo un dúplex de miRNA que interactúa con un miembro de la familia de proteínas Argonauta (Ago). El miRNA monocatenario maduro funcional guía al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) para silenciar al RNA mensajero (mRNA) diana, bien por inhibición de la traducción o por la degradación del propio mRNA. Esta regulación de la expresión génica de mRNA a través de los miRNA se produce mediante la unión a la región semilla (“seed”, 2-8 nt) del miRNA (localizada en 3') complementaria a su mRNA diana. Un mismo mRNA puede ser objetivo de varios miRNA (mediante regiones *seed* canónicas o no canónicas en los extremos 3' o 5'-UTR o en la propia secuencia codificante), agregando complejidad a la regulación y a los algoritmos predictores de potenciales sitios de unión.<sup>88,89</sup> Existen otras vías de

biogénesis de los miRNA (no canónicas) que son independientes de Drosha y/o de Dicer.<sup>90</sup>

Actualmente hay anotados un total de 2654 secuencias maduras de miRNA en humanos (miRBase versión 22.1), como potenciales reguladores del transcriptoma humano, con un papel en una gran variedad de procesos biológicos (fisiológicos y patológicos) en la mayoría de los organismos vivos.<sup>91</sup>

### 3.1.2.1. miRNA en trombo-inflamación

Existe una importante interconexión entre los miRNA, la respuesta inmunitaria e inflamatoria y sus consecuencias en el desarrollo de ECV.<sup>92,93</sup>

En este contexto, se ha investigado como los miRNA pueden regular las **respuestas inflamatorias** como potenciales actores pro/anti-inflamatorios y su relación con la **inmunidad innata**. A continuación, se exponen algunos ejemplos de miRNA con un papel relevante en trombo-inflamación.

Se ha demostrado que **miR-19b** activa al factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) en células humanas y murinas, mediante el uso de miméticos de este miRNA, potenciando la activación inflamatoria en sinoviocitos primarios tipo fibroblastos en un contexto de artritis reumatoide, una patología con importante carga inflamatoria.<sup>94</sup>

**miR-21** (categorizado como “onco-miR”) es uno de los miRNA con mayor expresión en muchos tejidos y está involucrado en multitud de procesos celulares, entre ellos la inflamación. Este miRNA regula la expresión del supresor tumoral PDCD4 (proteína proinflamatoria) a través de la vía MyD88 y NF- $\kappa$ B tras el tratamiento con LPS en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), reflejando una función potencialmente antiinflamatoria.<sup>95</sup> De manera contraria, se ha demostrado que miR-21, junto con miR-29a y miR-147, actúan como ligandos de TLR7/8, induciendo la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) en macrófagos.<sup>96</sup> A su vez, la sobreexpresión de miR-21 se ha relacionado con enfermedades autoinmunes, en un escenario antiinflamatorio e inmunosupresor.<sup>97</sup>

Se ha descrito que **miR-146a/b** desempeña un papel en el control de la señalización de TLR, y de citocinas mediante un *feedback* que regula negativamente la quinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (IRAK1) y del factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6), ambas proteínas de señalización en la respuesta inmunitaria innata.<sup>98</sup> Además se sabe que la

expresión de miR-146a se induce tras la infección por virus, y en este contexto infeccioso puede facilitar la propagación viral al reducir la producción de interferón tipo I (IFN-I), o aumentar la activación de NF- $\kappa$ B, vía RNF11 (regulador negativo de NF- $\kappa$ B).<sup>99,100</sup>

Otro miRNA con un papel relevante en la respuesta inmune innata y adaptativa es **miR-155**, cuya transcripción se ve regulada en respuesta a varias señales inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PAMP, ligandos de TLR, alarminas o hipoxia.<sup>101</sup> La sobreexpresión de miR-155 inhibe la producción de citocinas proinflamatorias (IL-8 y TNF- $\alpha$ ), a la vez que la IL-10 (antiinflamatoria) regula negativamente la expresión de este miRNA.<sup>102</sup> También se han reportado efectos proinflamatorios de miR-155 mediante la inhibición del supresor de la señalización de citocinas 1 (SOCS1), y una activación de la vía JAK2/STAT3, induciendo respuestas inflamatorias por macrófagos y la señalización de IFN-I.<sup>103</sup>

Otros miRNA relacionados con inflamación e inmunidad son los de la familia de **let-7** (dirigidos a la región 3'UTR del mRNA de *TLR4*, produciendo una disminución general de la inflamación inducida por LPS),<sup>104</sup> **miR-223** (regulando positivamente por TLR9 a través de la unión de NF- $\kappa$ B a su promotor; dirigido a NLRP3, disminuyendo la activación de la caspasa-1 y el procesamiento posterior de IL-1 $\beta$ ),<sup>105,106</sup> **miR-181b** (regula la expresión de importina- $\alpha$ 3, encargada de la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, y correlacionado con la inflamación vascular en células epiteliales vasculares),<sup>107</sup> o **miR-147** (inducido por NF- $\kappa$ B y STAT1 $\alpha$  de forma dependiente de MYD88 y TRIF, regulando las respuestas inflamatorias en macrófagos murinos a través de Tlr2/3/4),<sup>108</sup> entre otros.<sup>109</sup>

### 3.1.2.2. miRNA en ECV

En cuanto al vínculo funcional entre los miRNA y la función cardiaca, se ha reportado como la inactivación de la enzima Dicer (como se ha mencionado anteriormente, clave en la etapa final de maduración de los miRNA en el citosol) en un modelo murino condujo a una expresión aberrante de proteínas contráctiles cardíacas y una acusada desorganización sarcomérica.<sup>110</sup> A su vez, una disminución en la expresión de *DICER* en humanos se ha relacionado con miocardiopatía dilatada de rápida progresión, IC y mortalidad posnatal.<sup>111</sup> La inhibición de la interacción entre **miR-103** y el factor Krüppel-like 4 (KLF4) redujo la aterosclerosis, la acumulación de macrófagos en el foco de la lesión, y la expresión endotelial de la citocina quimiotáctica CXCL1, en un modelo murino deficiente en apolipoproteína E.<sup>112</sup> En células musculares lisas vasculares murinas, la delección condicional de *Dicer* aumentó la formación de neoíntima, al

producirse una disminución de los niveles de miRNA antiproliferativos como **miR-27a-3p**, con un papel clave en la reparación vascular, previniendo la estenosis vascular.<sup>113</sup>

Se ha demostrado el papel de **miR-21** en la aterogénesis, mediante la regulación de varios tipos celulares y vías de señalización. La sobreexpresión de **miR-21** induce la angiogénesis, activando la vía de señalización AKT y ERK1/2, aumentando la producción de óxido nítrico en células endoteliales;<sup>114</sup> contribuye a una mayor proliferación y migración desde la media a la íntima en células del músculo liso vasculares,<sup>115</sup> a la vez que una deficiencia de este miRNA en macrófagos promueve la apoptosis, la necrosis de la placa aterosclerótica y mayor inflamación vascular durante la aterogénesis.<sup>116</sup> En cuanto a su papel como biomarcador en complicaciones cardiovasculares, destacar que en pacientes sépticos con disfunción cardíaca asociada se ha reportado un incremento de los niveles plasmáticos de **miR-21-3p**, convirtiéndolo en una potencial diana terapéutica en este subgrupo de pacientes de elevado riesgo;<sup>117</sup> a la vez que se ha informado que los niveles de miR-21 podrían emplearse como indicador predictivo de la reestenosis vascular en la enfermedad oclusiva arterial de las extremidades inferiores 6 meses después de la terapia intervencionista.<sup>118</sup>

Otro importante miRNA relacionado con patología cardiovascular es **miR-34a**.<sup>119</sup> Niveles elevados de este miRNA inducen apoptosis de las células endoteliales microvasculares cardíacas en un modelo murino, regulando positivamente la producción de citocinas inflamatorias (Il-1 $\beta$ , Il-6), e inhibiendo la angiogénesis al inhibir al factor de crecimiento endotelial vascular (*Vegf*) y bloquear la señalización de la vía Notch1.<sup>120</sup> Bajo condiciones de hipoxia celular en los cardiomiocitos, el aumento de miR-34a induce la apoptosis vía Zeb1.<sup>121</sup> Se ha informado de un aumento de los niveles de expresión de miR-34a en tejidos valvulares de pacientes con enfermedad valvular aórtica calcificada, en comparación con aquellos con insuficiencia aórtica, convirtiéndolo en una prometedora diana de inhibición terapéutica para frenar el desarrollo de esta patología.<sup>122</sup>

En cuanto a **miR-33**, existen dos isoformas en humanos, miR-33a expresado en PBMC y miR-33b con expresión hepática; funcionando como un regulador del eflujo de colesterol en macrófagos y biogénesis del HDL.<sup>123</sup> En modelos murinos deficientes en miR-33 se ha observado que induce la obesidad, la hiperlipidemia y resistencia a la insulina, al tiempo que en macrófagos reduce los depósitos lipídicos y la inflamación, con una menor carga de la placa aterosclerótica. Los efectos observados son proaterogénicos o protectores en función del tipo celular.<sup>124</sup> Este miRNA también juega un importante papel

en la fibrosis cardíaca tras una lesión miocárdica. Fibroblastos murinos deficientes en miR-33 mostraron una menor fibrosis cardíaca inducida por la constricción aórtica transversal y una mayor preservación del contenido de colesterol de las balsas lipídicas en este tipo celular.<sup>125</sup>

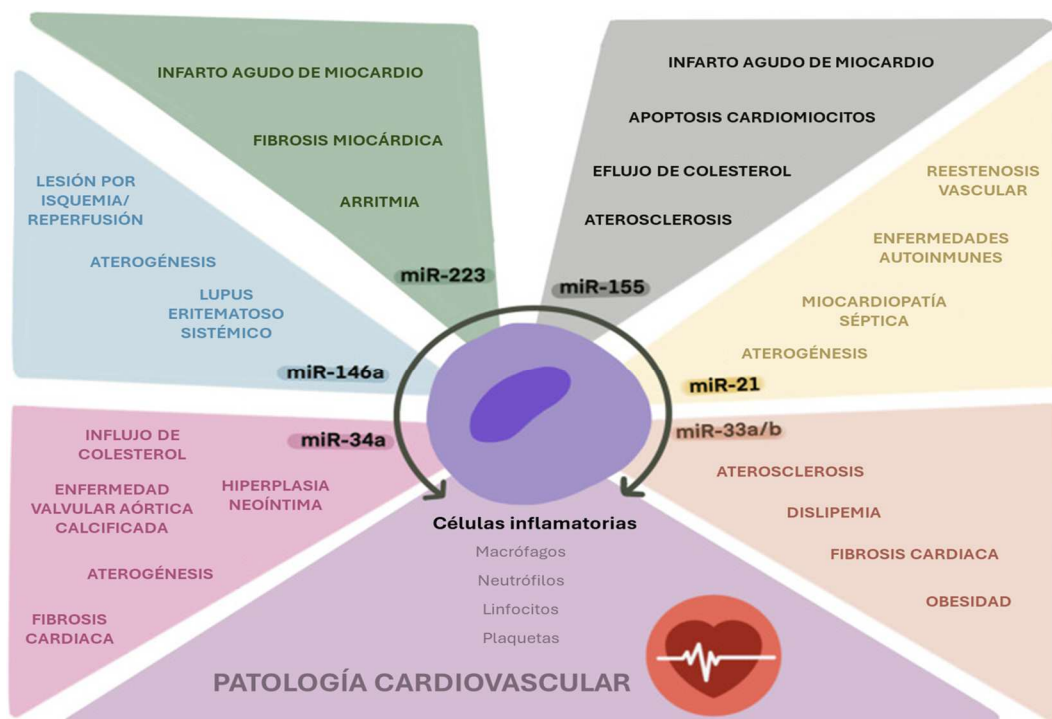
Existen otros miRNA de interés en ECV. **miR-146a**, reconocido inhibidor de la vía de señalización NF- $\kappa$ B, también juega un importante papel en el desarrollo de la aterosclerosis. Se ha informado de un aumento de los niveles de miR-146a en las válvulas cardíacas de pacientes con aterosclerosis.<sup>126</sup> La deficiencia de miR-146a en el compartimento hematopoyético de ratones *Ldlr*<sup>-/-</sup> moduló los niveles plasmáticos de colesterol y la expresión de sus dianas (*Irak1* y *Traf6*) en la pared arterial, pero no aceleró la aterosclerosis en el modelo murino.<sup>127</sup> Por otra parte, se ha reportado el efecto ateroprotector de miR-146a, ya que la deficiencia de este miRNA en células mieloides y endoteliales incrementan el riesgo de desarrollar aterosclerosis en ratones.<sup>128,129</sup> En un contexto de FA, el genotipo de miR-146a rs2431697-TT (que disminuye los niveles del miRNA hasta en un 50% en un escenario de lupus eritematoso sistémico)<sup>130</sup> en monocitos se asoció con ECV adversos, mejorando la predicción de la puntuación CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc. A su vez, los monocitos con este polimorfismo presentaron una respuesta proinflamatoria aumentada bajo condiciones de estrés inflamatorio.<sup>131</sup> Por su parte, pacientes jóvenes con IAM portadores del alelo rs2431697-T y niveles elevados de marcadores de NETosis en plasma [DNA libre (cfDNA) e histona H3 citrulinada (citH3)] presentaron un riesgo 2 veces mayor de desarrollar un evento isquémico a los 2 años de seguimiento.<sup>132</sup> Se ha informado que ratones *miR-146a*<sup>-/-</sup> mostraron una reducción significativa del tiempo de oclusión carotídea y niveles elevados de NET en trombos tras inducir la trombosis por FeCl<sub>3</sub>. Fenotípicamente los neutrófilos circulantes de este modelo murino fueron más envejecidos, hiperreactivos y proinflamatorios. Curiosamente, en pacientes con NAC, los niveles reducidos de miR-146a asociados al alelo rs2431697-T se asociaron con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares adversos mayores (MACE), justificado en parte por una mayor generación de NET en un escenario de tromboinflamación.<sup>133</sup>

De manera similar, se han reportado niveles significativamente superiores de **miR-155** en lesiones ateroscleróticas respecto a arterias sanas en muestras pareadas de 17 pacientes sometidos a angiografía.<sup>134</sup> Además, en modelos murinos se ha visto que tras un IAM se elevan dinámicamente los niveles de este miRNA;<sup>135</sup> y silenciamiento atenúa la apoptosis

de los cardiomiocitos inducida por estrés del retículo endoplasmático, al reducir la inflamación de los macrófagos.<sup>136</sup>

Finalmente se ha reportado el efecto protector de **miR-223** en aterosclerosis en un modelo murino de trasplante de médula ósea deficiente en miR-223 observando un aumento del tamaño de las placas, junto con un incremento de los lípidos y niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ .<sup>137</sup> En consonancia, se ha informado de que niveles de expresión aumentados de miR-223-3p se asocian con lesiones estables y niveles reducidos de marcadores ateroscleróticos, mediante una regulación negativa de las vías de señalización Mek1/Erk1/2 en macrófagos.<sup>138</sup> En un contexto de IAM, existen evidencias del papel dual del miR-223 en esta patología, disminuyendo la inflamación y la necroptosis inducida por isquemia/reperfusión en los cardiomiocitos;<sup>139</sup> y por otro lado lo asocian con una mayor fibrosis y arritmia tras el IAM.<sup>140</sup>

En resumen, estos datos ponen de manifiesto el papel de los miRNA en la respuesta inmunitaria, así como su implicación en inmunotrombosis y su relación con el desarrollo de ECV; postulándose como prometedores biomarcadores de ECV y potenciales dianas terapéuticas para el control de la enfermedad (**Figura 3**).



**Figura 3. Función de los principales inflama-miR en patología cardiovascular.** Ilustración esquemática de los *inflama-miR* miR-21, miR-33a/b, miR-34a, miR-146a, miR-223 y miR-155 y su implicación en el desarrollo de patologías cardiovasculares asociadas, mediante la regulación de la inmunotrombosis a través de diferentes células (macrófagos/monocitos, neutrófilos, linfocitos y plaquetas). Figura adaptada de Zapata-Martínez L. et al., *Front Immunol.* (2023).<sup>92</sup>

### 3.1.2.3. miRNA en NAC

En un contexto de patología infecciosa como la NAC también se ha estudiado el papel de los miRNA. Funcionalmente se ha reportado el papel inmunorregulador de **miR-124-3p** en macrófagos a través de su diana TRAF6, produciendo una inhibición en la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  inducida por LPS, mediado por la vía de señalización p38 MAPK y NF- $\kappa$ B.<sup>141</sup> En cuanto a su papel como biomarcadores diagnósticos en plasma, se ha identificado una firma de 4 miRNA con capacidad discriminadora entre pacientes con COVID-19 y NAC. El modelo de regresión incluyó **miR-106b-5p**, **miR-221-3p**, **miR-25-3p** y **miR-30a-5p**. El análisis ROC arrojó un AUC de 0,952, confirmando la buena capacidad discriminadora de este perfil de miRNA circulantes entre ambas patologías. Por su parte, el análisis de rutas reveló que estos miRNA estaban relacionados con la angiogénesis e inflamación.<sup>142</sup> En cuanto a la gravedad de la NAC y complicaciones secundarias graves como la sepsis, se ha descrito que la expresión de **miR-193a-5p** y **miR-542-3p** se ve aumentada en pacientes con NAC/sepsis frente a voluntarios sanos, y que el **miR-1246** es capaz de discriminar entre pacientes con NAC y sepsis, siendo su expresión mayor cuanto mayor es la gravedad de la enfermedad.<sup>143</sup> Se ha informado de que niveles bajos de **miR-223** en suero de pacientes con neumonía neumocócica se relacionan con una mayor gravedad de la enfermedad, observándose una inflamación pulmonar exacerbada y una desregulación del transcriptoma en neutrófilos murinos deficientes en este miRNA.<sup>144</sup> A su vez, niveles séricos elevados combinados de **miR-4793-3p** y **miR-1180-3p** permiten discriminar a pacientes con NAC leve o grave (AUC 0,948), superando el modelo de miRNA, a valores de dímero D, plaquetas y PCT, permitiendo una predicción temprana de pacientes con pronóstico grave, y optimizando las decisiones terapéuticas en este subgrupo.<sup>145</sup> Finalmente, también se ha relacionado el perfil de expresión de miRNA con la mortalidad temprana en pacientes con NAC. Niveles elevados de **miR-146a-5p** y **miR-16-5p** al ingreso, se han relacionado con una menor mortalidad a 30 días (AUC 0,954), tras ajustar por edad, sexo y antecedentes de broncoaspiración, y superando a las escalas pronósticas de gravedad como PSI y CURB-65.<sup>146</sup>

### 3.1.3. Enfoque proteómico: biomarcadores predictores de riesgo cardiovascular en NAC

La proteómica ha potenciado la investigación de los biomarcadores, destacando principalmente tres métodos proteómicos para la detección de proteínas plasmáticas: técnicas basadas en espectrometría de masas (MS); enfoques proteómicos basados en aptámeros de ácidos nucleicos (panel SomaScan), y ensayos proteómicos basados en anticuerpos (Olink®). A pesar de que la MS sigue siendo la técnica estándar en la investigación proteómica, presenta ciertas limitaciones en términos de rendimiento, capacidad de multiplexación, especificidad y sensibilidad.<sup>147</sup> Los métodos de detección emergentes han permitido abordar estas limitaciones en mayor medida, hecho reportado en un estudio comparativo a gran escala a través de asociaciones genéticas y de enfermedades en participantes del UK Biobank destacando que la plataforma SomaScan permitió cubrir un mayor número de proteínas, mientras que la tecnología basada en Olink® mostró una mayor precisión.<sup>148</sup>

En un escenario como la NAC, con una elevada tasa de morbimortalidad en los pacientes, debido no solo a las comorbilidades subyacentes, sino al aumento de complicaciones cardiovasculares intrahospitalarias, es necesaria la búsqueda de biomarcadores, tanto sistémicos como cardíacos, así como la elaboración de herramientas de estratificación del riesgo, para optimizar la predicción de dichos eventos en estos pacientes.<sup>149-151</sup>

#### 3.1.3.1. Biomarcadores cardiovasculares

En cuanto a los biomarcadores clásicos de daño cardíaco podemos destacar las **troponinas (Tn)**, enzimas cardíacas reconocidas por su alta sensibilidad y especificidad, y cuya elevación se asocia con la presencia de lesión miocárdica.<sup>152</sup> En el contexto de la NAC, esta lesión cardíaca puede relacionarse directamente con la invasión bacteriana (*S. pneumoniae*) del miocardio, induciendo apoptosis y necroptosis de los cardiomiocitos, con el consiguiente aumento de enzimas cardíacas; aunque también se han descrito otros mecanismos patogénicos como una sobrecarga cardíaca, contractilidad reducida, un escenario de inflamación/coagulación activada, así como hipoxia cardíaca, pudiendo desencadenar en un cuadro clínico de IAM.<sup>153-155</sup> En cuanto al valor pronóstico de los niveles de Tn se ha demostrado que resultan de utilidad para predecir la mortalidad a corto y largo plazo en pacientes con NAC grave y sepsis, e identificar aquellos casos con mayor riesgo de desarrollar el ECV post-NAC.<sup>156-158</sup>

Otros biomarcadores de daño miocárdico son los **péptidos natriuréticos**, pro-hormonas sintetizadas y liberadas en numerosos tejidos, con gran diversidad de funciones biológicas. Entre ellas, actúan como factores antirremodelación en el corazón, utilizándose ampliamente como biomarcadores diagnósticos para evaluar la IC, ya que se ha relacionado un aumento de sus niveles circulantes con sobrecarga y estrés miocárdico.<sup>159</sup> En cuanto a su papel como predictores de mortalidad en NAC, en el estudio alemán CAPNETZ que incluyó 1740 pacientes concluyeron que los niveles de MR-proANP (péptido natriurético auricular) y CT-proAVP (coceptina) fueron los predictores más potentes de mortalidad tanto a corto como largo plazo, incluso al ajustar en un análisis Cox multivariable por comorbilidades e índice de gravedad de la neumonía.<sup>160</sup> En otro ensayo multicéntrico prospectivo en un total de 925 pacientes diagnosticados con NAC se realizó un seguimiento a largo plazo de 6 años, y observaron que la adición de biomarcadores tanto cardíacos (proANP) como inflamatorios (proadrenomedulina) a las actuales escalas de riesgo de NAC en la práctica clínica habitual, mejoró las capacidades pronósticas tanto del PSI (AUC de 0,79 a 0,83;  $p < 0,0001$ ), como de la puntuación CURB-65 (AUC de 0,73 a 0,80;  $p < 0,001$ ).<sup>161</sup>

La **adrenomedulina**, potente pro-hormona vasodilatadora, es considerada un biomarcador cardíaco e inflamatorio, y cuya concentración plasmáticas aumentada se ha relacionado con IC, IAM o enfermedad arterial oclusiva periférica.<sup>162-164</sup> Por su parte, la **proadrenomedulina** de la región media (MR-proADM) parece jugar un papel en un contexto de inflamación en el tejido cardíaco lesionado.<sup>165</sup> Al igual que con los otros biomarcadores, se ha demostrado el papel útil de la MR-proADM para la mejora de la capacidad de las escalas pronósticas de la NAC,<sup>166-168</sup> y en la predicción de ECV en estos pacientes.<sup>158</sup>

El último de los biomarcadores clásicos de daño miocárdico es la **endotelina-1** (ET-1), un péptido procedente principalmente de las células del endotelio, siendo su precursor la proET-1 más estable. Los efectos fisiológicos de la ET-1 son una disminución del gasto cardíaco y vasoconstricción extendida (circulación coronaria, pulmonar, renal y esplácnica).<sup>169</sup> Por su parte, se han reportado niveles elevados en pacientes sépticos y con NAC, relacionándose directamente con la morbilidad y mortalidad a corto y largo plazo.<sup>170-172</sup>

Existen otros potenciales biomarcadores con menor evidencia en la práctica clínica pero que han mostrado utilidad pronóstica en pacientes con NAC, como la **copeptina** o las **angiopoyetinas**.<sup>173,174</sup>

### 3.1.3.2. Biomarcadores inflamatorios

En cuanto a los biomarcadores no cardiacos, hay que destacar los inflamatorios, ya que es sabido que en un contexto de infección existe una carga inflamatoria elevada.

La **PCR** es una proteína de fase aguda ampliamente utilizada como marcador de inflamación sistémica, debido a su elevación temprana en respuesta al daño agudo. Mayores niveles de PCR al ingreso se han relacionado con un mayor riesgo de complicaciones y mortalidad a corto plazo en NAC, y su combinación con las escalas PSI y CURB-65 mejora la predicción de la mortalidad a 30 días.<sup>175-177</sup> Sin embargo, niveles elevados de PCR no logran predecir el desarrollo de ECV a corto o largo plazo en pacientes con NAC.<sup>158,178</sup>

La **PCT**, precursor activo de la hormona calcitonina, se ha considerado un biomarcador más específico que la PCR para la infección bacteriana, aunque no existe un umbral de PCT que permita discriminar totalmente entre una infección viral y bacteriana en la NAC.<sup>149,179</sup> En cuanto a su aplicabilidad como biomarcador pronóstico, niveles séricos aumentados de PCT ( $\geq 10$  ng/mL) se han correlacionado fuertemente con una mayor necesidad de IRVS en pacientes con NAC,<sup>180</sup> a la vez que el aumento de los niveles de PCT, pentraxina y presepsina se relacionaron con un pronóstico adverso (mayor mortalidad) a corto plazo en pacientes con NAC.<sup>150</sup> En cuando a la capacidad predictora de ECV en NAC, la PCT no resulta de utilidad, ni por sí sola, ni en combinación con otros biomarcadores clásicos inflamatorios.<sup>158,178</sup>

Otro biomarcador estudiado es la **IL-6**, conocida citocina proinflamatoria, cuyos niveles se ven aumentados en presencia de microorganismos, generando la activación de la inmunidad y de la cascada inflamatoria de fase aguda.<sup>181</sup> Se ha reportado que pacientes con NAC con un perfil de citoquinas inflamatorias desregulado (IL-6, IL-8, IL-10, LBP, IRF5, entre otras) presentan mayor gravedad de la NAC (puntuación 3-4 en la escala CURB-65), así como una resistencia y consecuente fracaso al tratamiento, y una mayor tasa de mortalidad por todas las causas durante un año post alta hospitalaria.<sup>182-184</sup> En cuanto a su capacidad discriminatoria entre pacientes con y sin ECV posterior a la NAC, se identificaron niveles más altos de proET-1, proBNP, proADM, TnT e IL-6 en pacientes

que desarrollaron ECV, siendo buenos predictores de forma independiente, al ajustar por edad, ECV previa y sepsis, en seguimiento prospectivo durante 1 año en una cohorte de 730 pacientes.<sup>158</sup> Estos datos reflejan el papel que juegan los biomarcadores tanto cardiacos como los inflamatorios como predictores de ECV en NAC.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Como hemos tratado a lo largo de la Introducción General, la NAC no solo constituye una causa relevante de morbimortalidad, sino que se asocia a un incremento significativo del riesgo cardiovascular tanto a corto como a largo plazo. Los mecanismos subyacentes a este fenómeno no están completamente dilucidados, pero se postula que procesos relacionados con la trombo-inflamación tales como la activación inflamatoria sistémica, la disfunción endotelial o alteraciones en la respuesta inmunitaria desempeñarían un papel clave en la fisiopatología de esta enfermedad. En este contexto, la presencia de alteraciones genéticas como la CHIP, determinados perfiles de miRNA circulantes, así como firmas proteómicas plasmáticas específicas, podrían actuar como biomarcadores de susceptibilidad cardiovascular en pacientes con NAC. De este modo, la **hipótesis** central de esta Tesis es que los pacientes con NAC portadores de mutaciones CHIP, un perfil diferencial de miRNA plasmáticos y/o marcadores proteómicos específicos presentan un mayor riesgo de desarrollar un MACE tras el episodio infeccioso, en comparación con aquellos sin estas alteraciones moleculares.

En base a esto, el **Objetivo general** de esta memoria de Tesis es la caracterización molecular de biomarcadores predictores de MACE en pacientes con NAC a través de un enfoque multiómico. A lo largo de los diferentes capítulos se abordan los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la prevalencia de CHIP en una cohorte de pacientes con NAC y analizar su asociación con la aparición de MACE durante el seguimiento.
2. Caracterizar el perfil de miRNA plasmáticos en pacientes con NAC y evaluar su asociación con MACE, así como su potencial integración con variables clínicas.
3. Identificar firmas proteómicas plasmáticas diferenciales asociadas al desarrollo de MACE tras un episodio de NAC mediante técnicas de proteómica de alto rendimiento y herramientas de *machine learning*.

# **COHORTES DE PACIENTES**

A continuación, se ofrece una descripción de las cohortes de pacientes empleadas en la presente memoria de Tesis Doctoral.

### **COHORTE 1**

El estudio (estudio NEUMONAC #2011/0219 [05/07/2011]) fue aprobado por el Comité Ético (ceic@iislafe.es) del Hospital La Fe (Valencia, España) y realizado de acuerdo con las normas éticas establecidas en la Declaración de Helsinki de 1964 y sus modificaciones posteriores. La cohorte completa incluyó **258 pacientes** consecutivos ingresados en el Hospital La Fe con diagnóstico de NAC desde octubre de 2015 hasta junio de 2018. Se incluyeron pacientes con diagnóstico de NAC basado en un nuevo infiltrado radiológico con al menos dos síntomas clínicos compatibles, con edad entre 18 y 85 años, y con diagnóstico microbiológico confirmado. Los criterios de exclusión fueron: ingreso en los 15 días previos, residir en una residencia de ancianos, recibir tratamiento inmunosupresor o ser portador del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH +). Esta cohorte incluyó pacientes con MACE precoz en los 30 días siguientes al ingreso por NAC (n=38; MACE-30d), aquellos que desarrollaron un MACE entre 30 días y 1 año (n=33; MACE-1a), pacientes con MACE entre 1 y 4 años (n=21; MACE-4a) y los que no tuvieron MACE asociado en el seguimiento a 4 años (n=166; NO MACE-4a). Dentro de MACE incluimos, el síndrome coronario agudo (infarto agudo de miocardio o angina inestable), la insuficiencia cardíaca *de novo* o con empeoramiento, la arritmia *de novo* o recurrente que requiriera ingreso hospitalario o atención en urgencias, el accidente cerebrovascular (ictus o accidente isquémico transitorio) y/o la enfermedad tromboembólica venosa (trombosis venosa profunda o embolia pulmonar)<sup>158,185</sup>. Todos los pacientes que cumplían los criterios de elegibilidad dieron su consentimiento informado por escrito.

### **COHORTE 2**

Cohorte de **160 pacientes** diagnosticados de NAC en el Hospital La Fe (Valencia, España) entre enero y septiembre de 2024. Esta serie incluyó 18 pacientes que desarrollaron el MACE precoz a 30 días del ingreso hospitalario (MACE-30d) y 142 NO MACE-30d. El seguimiento de esta cohorte es de 1 año. Los criterios de inclusión y exclusión fueron los mismo que los descritos en la Cohorte 1.

**COHORTE 3**

Cohorte de **200 pacientes** diagnosticados de NAC en el Hospital La Fe (Valencia, España) entre enero y julio 2025. Esta serie incluyó 22 pacientes MACE-30d y 178 NO MACE-30d. El seguimiento de estos pacientes es de 6 meses. Los criterios de inclusión y exclusión fueron los mismo que los descritos en la Cohorte 1.

**Muestras de plasma:**

Recogimos muestras de sangre de todos los pacientes el día 1-3 del ingreso utilizando el EDTA 3,7mM como anticoagulante. Las muestras de plasma obtenidas (2500xg, 10 minutos a 22°C) se almacenaron a -80°C hasta su uso.



## **CAPÍTULO I.**

---

CHIP como marcador biológico de riesgo cardiovascular en pacientes con NAC.

# Introducción

## 1. INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado en la Introducción General, mutaciones CHIP en los genes *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1* se han relacionado directamente con un aumento del riesgo de ECV. Alteraciones en esta tríada de genes, conocida como “mutaciones DTA”, representan alrededor del 80% de todos los casos de CHIP reportados en el contexto de la leucemia mieloide.<sup>186</sup> Por su parte, mutaciones en el gen *JAK2*, se han relacionado con mayores tasas de eventos trombóticos.<sup>187</sup> A su vez, mutaciones en genes implicados en la vía de reparación del DNA (*PPM1D* y *TP53*), y factores de *splicing* del mRNA (*SRSF2* y *SF3B1*) también se han reportado en combinación con los anteriores en SMD, LMA y neoplasias mieloproliferativas (NMP).<sup>188</sup>

A continuación, se detallan las evidencias más relevantes de mutaciones relacionadas con CHIP en estos genes y su implicación en inflamación, infección y patología cardiovascular.

- El gen de la DNA metiltransferasa 3a (*DNMT3A*) codifica una enzima implicada en la metilación del DNA (sitios CpG), y funciona como un regulador epigenético de la expresión génica. En cuanto a las mutaciones con repercusión clínica reportadas en este gen, la mayoría son de pérdida de función, mutaciones *missense* en dominios reguladores y catalíticos, mutaciones *nonsense*, inserciones/deleciones (*indels*) y mutaciones en sitios de *splicing*. Estas mutaciones favorecen la autorrenovación de las HSC y promueven la expresión de genes multipotenciales, inhibiendo la expresión de factores de diferenciación afectando a todos los linajes hematopoyéticos.<sup>189,190</sup>

Funcionalmente se ha reportado una relación entre mutaciones en *DNMT3A* e inflamación, como impulsoras en el desarrollo de patologías cardiovasculares. En macrófagos murinos con *Dnmt3a* mutado se ha observado una inducción de genes inflamatorios en respuesta al LPS, con sobreexpresión de *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Il-6* y *Ccl5*. Además, en un ambiente de infección crónica, una mayor exposición a *Ifn-γ* favorece una expansión clonal de HSC con mutaciones de pérdida de función en *Dnmt3a*.<sup>191</sup> Este escenario proinflamatorio tiene consecuencias en la función cardíaca. En un modelo murino con mutaciones inactivadoras en *Dnmt3a* y *Tet2* mediante CRISPR/Cas9 se produjo una mayor hipertrofia cardíaca mediada por

angiotensina II, acompañada de una disminución de la función miocárdica, y una mayor fibrosis de los cardiomiocitos y a nivel renal; junto una desregulación de la expresión de citocinas proinflamatorias.<sup>192</sup> En humanos se ha analizado el transcriptoma en PBMC de pacientes con IC con mutaciones portadoras en *DNMT3A*, observándose una sobreexpresión de interleucinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-8) en monocitos, activación del inflamasoma NLRP3, junto a un aumento de proteínas inflamatorias de macrófagos CCL3 y CCL35, y resistina (proteína que media en la adhesión monocito-endotelio); junto a una polarización de linaje T proinflamatorio.<sup>193</sup>

- El gen de la Tet metilcitosina dioxigenasa 2, *TET2* (*ten-eleven translocation-2*), es el segundo gen CHIP más frecuentemente mutado, encargado de oxidar a los grupo metilo insertados por *DNMT3A*. Al igual que con *DNMT3A*, *TET2* tiene un papel importante como freno regulador de la inflamación. Macrófagos murinos deficientes en *Tet2* muestran un perfil inflamatorio activado tanto espontáneo como en respuesta a LPS, aumentando la expresión del mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6 y Arginasa 1.<sup>194</sup> Ratones deficientes en *Tet2* fueron más susceptibles al choque endotóxico y a la colitis inducida por dextrano-sulfato-sodio, exhibiendo un fenotipo proinflamatorio e incremento en la producción de IL-6. Desde el punto de vista mecanístico se ha descrito que *Tet2* recluta a Hdac2, reprimiendo la transcripción de IL-6 a través de la desacetilación de histonas como vía para resolver el escenario inflamatorio.<sup>195</sup> La deficiencia en este gen también se ha relacionado con una inducción de la activación del inflamasoma Nlrp3, acompañado de un marcado aumento del tamaño de la placa aterosclerótica, tras la reconstitución parcial de la médula ósea con células deficientes en *Tet2* en ratones propensos a la aterosclerosis (*Ldlr*<sup>-/-</sup>). El bloqueo farmacológico del inflamasoma Nlrp3 con MCC950 produjo una reducción del tamaño de la placa en los ratones deficientes en *Tet2*.<sup>196</sup> Por su parte, se ha reportado que la deficiencia en *Tet2* se asocia con mayor IC en ratones debido a la elevada señalización IL-1 $\beta$ /Nlrp3.<sup>197</sup> Estos resultados abren la puerta a la inhibición del inflamasoma NLRP3 como diana terapéutica en patología cardiovascular.<sup>196,197</sup>

El análisis de genoma completo del programa *Trans-omics for Precision Medicine* (TOPMed) que incluyó cerca de 100.000 participantes reveló que pacientes

portadores de mutaciones CHIP en *TET2* presentaron un aumento de la expresión de IL-1 $\beta$ .<sup>198</sup> El análisis de exoma completo en más de 35.000 individuos del UK Biobank identificó la mutación codificante *p.Asp358Ala* del gen del receptor de IL-6 (*IL-6R*) como indicador genético de la inhibición de IL-6, informando que en aquellos pacientes con clones CHIP en *DNMT3A* y *TET2*, la presencia de dicha mutación atenuó el riesgo de desarrollar ECV.<sup>199</sup> Otro estudio del UK Biobank determinó la prevalencia de CHIP y su asociación con la aparición de FA, mostrando que individuos con *TET2* mutados presentaron un aumento de la incidencia de FA; y que la inactivación de *Tet2* en un modelo murino condujo a una liberación alterada de calcio del retículo sarcoplásmico al citosol en cardiomiocitos, contribuyendo a la arritmogénesis auricular.<sup>200</sup> Resultados del ensayo clínico aleatorizado CANTOS (*Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study*) revelaron que los pacientes con mutaciones CHIP en *TET2* presentaron un menor riesgo de MACE tras el tratamiento antiinflamatorio con canakinumab (inhibidor de IL-1 $\beta$ ).<sup>201</sup>

- El tercer gen más frecuentemente mutado en CHIP es *additional sex combs-like 1* (*ASXLI*), actuando como regulador epigenético como parte del complejo de represión *Polycomb* implicado en el silenciamiento génico. En cuanto al tipo de mutaciones en este gen son típicamente *frameshift* o *nonsense* cerca del extremo 5' provocando una ganancia de función y modificaciones aberrantes de histonas (H3K4me3, H3K27me3 y H2AK119Ub).<sup>202</sup> La pérdida o expresión aberrante de *ASXLI* se ha relacionado con transformación mieloide, a la vez que se ha observado un funcionamiento deficiente de las HSC murinas, por lo que no está bien dilucidado en papel de *ASXLI* en la CH.<sup>203</sup>

En cuanto a su papel en la inflamación y patología cardiovascular se ha evidenciado la relación causal entre la CH mediada por *Asx1l* y la insuficiencia cardíaca en un modelo murino causada por la producción elevada de citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) a nivel de macrófagos cardíacos.<sup>204</sup> El estudio TOPMed reveló que pacientes con mutaciones en *ASXLI* presentaron recuentos más altos de neutrófilos y monocitos y niveles significativamente superiores de fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2), considerada un factor de riesgo independiente establecido en la enfermedad arterial coronaria.<sup>198</sup> Recientemente

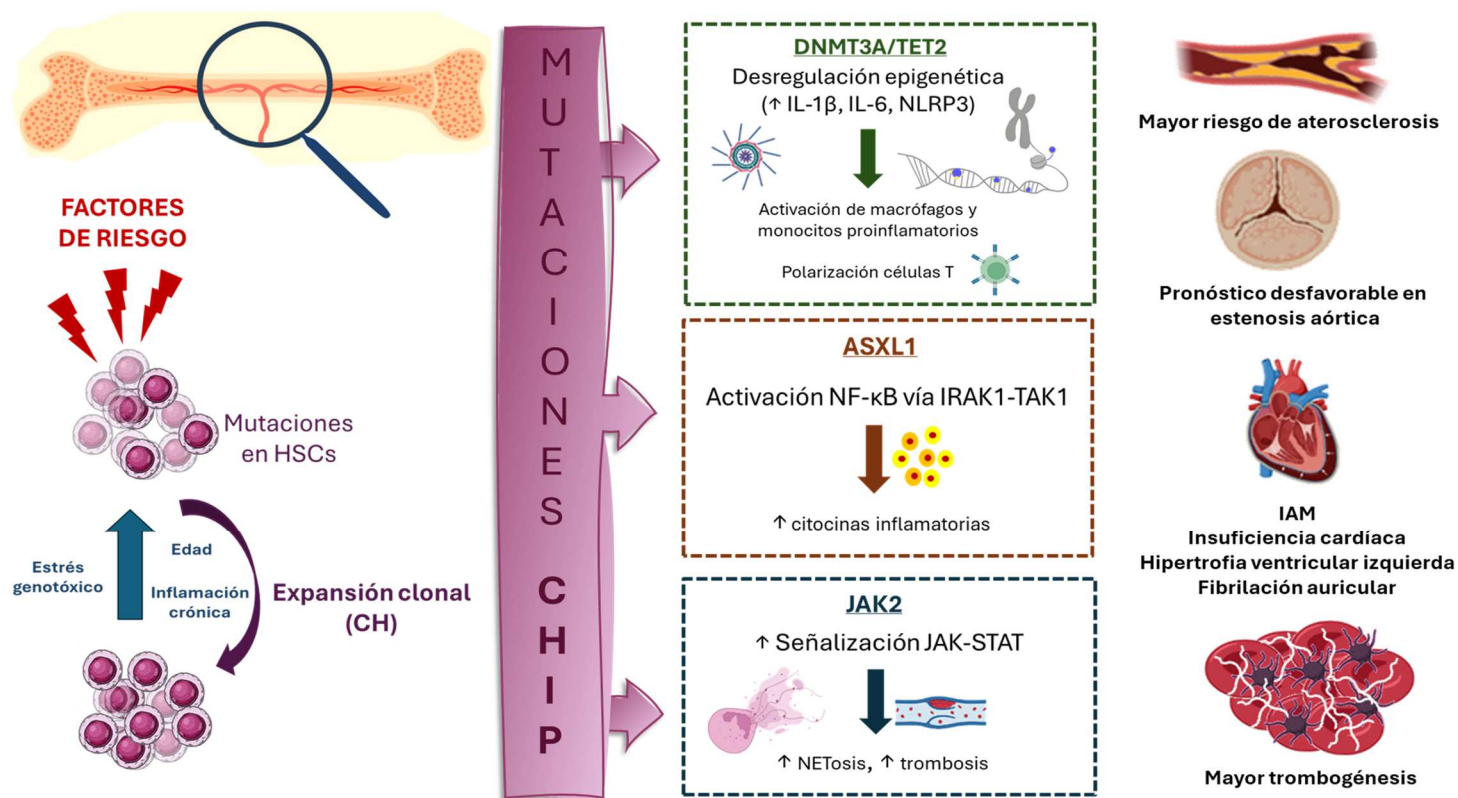
se ha proporcionado evidencia mecanicista de cómo *ASXL1* suprime la señalización inmune innata a través de la inhibición de la interacción de IRAK1-TAK1 en el citoplasma. En células murinas con mutación en *Asxl1* esta función se pierde, resultando en una activación de Nf- $\kappa$ b, y una inhibición de Irak1/4. De esta manera se observó un efecto ateroprotector en el modelo de ratón mutante para *Asxl1*<sup>205</sup>. El estudio prospectivo de cohortes del *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC) y UK Biobank reveló que aquellos pacientes con mutación en *ASXL1* presentaron un cociente de riesgo de 1,45 en cuanto al desarrollo de FA (1,12 para CHIP en general y 1,29 para mutaciones en *TET2*), acompañado de mayores niveles de troponina cardíaca de alta sensibilidad (hs-Tnt) y un mayor índice de masa ventricular izquierda.<sup>206</sup>

- El último de los genes más frecuentemente mutado en CHIP es *Janus Kinase 2* (*JAK2*), una tirosina quinasa encargada de la fosforilación y activación de *TET2* en respuesta a citocinas, lo que induce cambios epigenéticos en la hematopoyesis.<sup>207</sup> Cabe destacar que los pacientes portadores de mutaciones CHIP en *JAK2* son de menor edad en comparación con los portadores en *ASXL1* y *TET2*. Además, presentan un perfil proinflamatorio con un aumento de IL-6 e IL-18 circulante, junto con una sobreexpresión de selectina-P. Curiosamente presentan una disminución del colesterol total y una tendencia hacia menores niveles de LDL, pese a conllevar un riesgo de hasta 10 veces mayor de enfermedad de la arteria coronaria (el riesgo más elevado de enfermedad cardíaca entre las variantes CHIP).<sup>74,198</sup>

Una de las mutaciones clásica de *JAK2* de ganancia de función, *p.V617F*, se ha vinculado estrechamente con la aparición de NMP crónicas (NMPc) (policitemia vera, trombocitopenia esencial y mielofibrosis), lo que se ha relacionado a su vez con el desarrollo de patologías cardiovasculares tales como IAM, trombosis venosa profunda y accidente cerebrovascular. De hecho, esta mutación se ha asociado a un incremento de la formación de NET como inductor de la trombosis en NMP, posiblemente relacionado con una mayor expresión de la enzima PAD4 en neutrófilos que expresan la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup>. La inhibición de la vía de señalización Jak-Stat con el uso de ruxolitinib anuló la formación de NET y redujo los eventos trombóticos en un modelo murino de estenosis venosa profunda.<sup>208</sup> La

inhibición selectiva de *Jak2* con el fármaco TG101349 (fedratinib) redujo la aterogénesis al suprimir la mielopoyesis excesiva en ratones ApoE<sup>-/-</sup>.<sup>209</sup> También se ha visto una aterosclerosis acelerada en ratones deficientes en *Ldlr* con *Jak2*<sup>V617F</sup>, relacionada con una mayor infiltración neutrofílica en zonas lesionadas, acompañada de un aumento de la eritrofagocitosis, promoviendo una mayor acumulación de hierro en la placa y mayor formación de núcleos necróticos, contribuyendo a la inestabilidad de la placa. A su vez, los macrófagos mostraron una sobreexpresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, activación del inflamasoma, aumento de la señalización de p38 MAPK y reducción de los niveles de c-Mer tirosina quinasa (MerTK).<sup>210</sup> En esta activación se ha descrito el inflamasoma Aim2 como inductor de la aterosclerosis, en ratones con mutación en *Jak2*, y donde el bloqueo farmacológico de Il-1R con anakinra llevó a una menor inestabilidad de la placa aterosclerótica.<sup>211</sup> Finalmente, se ha observado una mayor inflamación miocárdica e IC acelerada en ratones trasplantados con HSC portadoras de la mutación *Jak2*<sup>V617F</sup>.<sup>212</sup>

Estos hallazgos ofrecen una clara evidencia del papel que juega la CHIP como nuevo factor de riesgo cardiovascular, asociado a un estado inflamatorio crónico definido por un perfil proinflamatorio de citocinas, activación del inflamasoma y polarización de células T (**Figura 4**). Además, ofrece una potencial perspectiva terapéutica para el control de ECV adversos asociados a la presencia de mutaciones CHIP.



**Figura 4. Interrelación entre CHIP, inflamación y riesgo cardiovascular.** La adquisición de mutaciones *drivers* en genes como *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* o *JAK2* debido a factores de riesgo en el nicho medular (edad avanzada, inflamación crónica o estrés genotóxico) conduce a una expansión clonal de las HSC, en un fenómeno conocido como hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP). Este proceso se ha vinculado estrechamente con una desregulación epigenética e inducción de un estado proinflamatorio sistémico, asociado con la aparición de complicaciones cardiovasculares tales como un mayor riesgo de aterosclerosis, un pronóstico desfavorable en la estenosis aórtica, insuficiencia cardíaca, infarto agudo de miocardio, hipertrofia ventricular izquierda, fibrilación auricular, así como una mayor trombogénesis. **HSCs**, células madre hematopoyéticas; **CH**, hematopoyesis clonal; **IAM**, infarto agudo de miocardio. Figura creada con *BioRender*.

# Pacientes, Materiales y Métodos

## 2. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Pacientes

Para el estudio de mutaciones CHIP se seleccionó una serie de 96 pacientes de la **Cohorte 1**, anteriormente descrita; incluyéndose 38 MACE-30d y 58 NO MACE-30d.

### 2.2. Extracción de ácidos nucleicos

La purificación del DNA genómico de los pacientes con NAC incluidos en este estudio se realizó a partir de la capa leucocitaria (*buffy coat*) del tubo anticoagulado con EDTA de sangre periférica obtenida tras centrifugación a 1500xg durante 15 min (22°C) mediante un kit comercial, Puregene Blood Kit (#158389, Qiagen, Barcelona, España) siguiendo las especificaciones del fabricante. La cuantificación de las muestras de DNA se realizó mediante el equipo Qubit® 4.0 Fluorometer, empleando los reactivos del kit Qubit™ dsDNA BR Assay (#Q33265, Invitrogen, Madrid, España). El DNA se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

### 2.3. Secuenciación de DNA

La determinación de la presencia de mutaciones CHIP se llevó a cabo mediante secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS) empleando un panel customizado de los 4 genes relacionados con patología cardiovascular descritos anteriormente; *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* y *JAK2* (Twist Bioscience, Diagnostica Longwood, Zaragoza, España). Las características del panel se resumen en la **Tabla 1**. En su diseño se utilizaron las bases de datos RefSeq, CCDS y GENCODE para recuperar las coordenadas de los exones codificantes de los genes de interés, con un relleno de 30pb en los intrones. Se aplicaron filtros de rigor medio para eliminar las sondas en secuencias repetitivas. Para el ensamblaje del genoma se empleó el genoma de referencia hg38.

La generación de las librerías individuales se realizó siguiendo el protocolo *Library Preparation EF 2.0. with Enzymatic Fragmentation and Twist Universal Adapter Sytem*, empleando el kit *Twist Library Preparation EF kit 1, 2.0* (#104207, Twist Bioscience, Diagnostica Longwood, Zaragoza, España) (**Figura 5A**).

**Tabla 1. Características del diseño del panel customizado para el análisis por NGS.**

Genoma	hg38
Longitud de la sonda	120
Porcentaje medio de GC (%)	48,45
Rigurosidad	media
Tamaño del objetivo (pb)	23141
Regiones objetivo totales	83
Regiones objetivo con sondas	83
Número de sondas	228
Número de sondas eliminadas debido a repeticiones	0
Número de sondas eliminadas debido a bases ambiguas	0
Regiones objetivo completas no cubiertas (n°)	0
Regiones objetivo completas no cubiertas (%)	0
Regiones objetivo completas no cubiertas (pb)	0
Tamaño cubierto (pb)	23141
Cobertura total (%)	100
Tamaño de diseño (pb)	23619

Se partió de una concentración inicial de 50 ng totales (40  $\mu$ L a 1,25 ng/ $\mu$ L) de DNA, para el primer paso **de fragmentación, reparación de extremos y la adición de colas de dA** (poliadenilación) en una única reacción. Las condiciones del programa del termociclador (Applied Biosystems™ Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, FisherScientific, Madrid, España) se reflejan en la **Tabla 2**. El siguiente paso fue la ligación de los fragmentos de ADN reparados con los adaptadores Universales Twist en una reacción a 20°C durante 15 minutos, seguida de la purificación de los fragmentos ligados a los adaptadores mediante el empleo de bolas magnéticas. Posteriormente, se amplificaron dichos fragmentos mediante PCR usando los cebadores UDI Twist (*Unique Dual Index Sequences*) (#101308, Twist Bioscience, Diagnostica Longwood, Zaragoza, España), y el programa del termociclador indicado en la **Tabla 3**.

Tras ello, se realizó una segunda purificación por bolas magnéticas, obteniendo finalmente las librerías individuales indexadas. Previo al protocolo de enriquecimiento, se realizó un control de calidad (QC) mediante la determinación de la concentración de las librerías individuales en el fluorímetro Qubit empleando el kit de alta sensibilidad dsDNA HS Assay (#Q32854, Invitrogen); y el análisis de tamaño de fragmentos (pb) usando el sistema electroforético LightBench® (Coastal Genomics, Burnaby, BC, Canadá) empleando geles de agarosa al 2%.

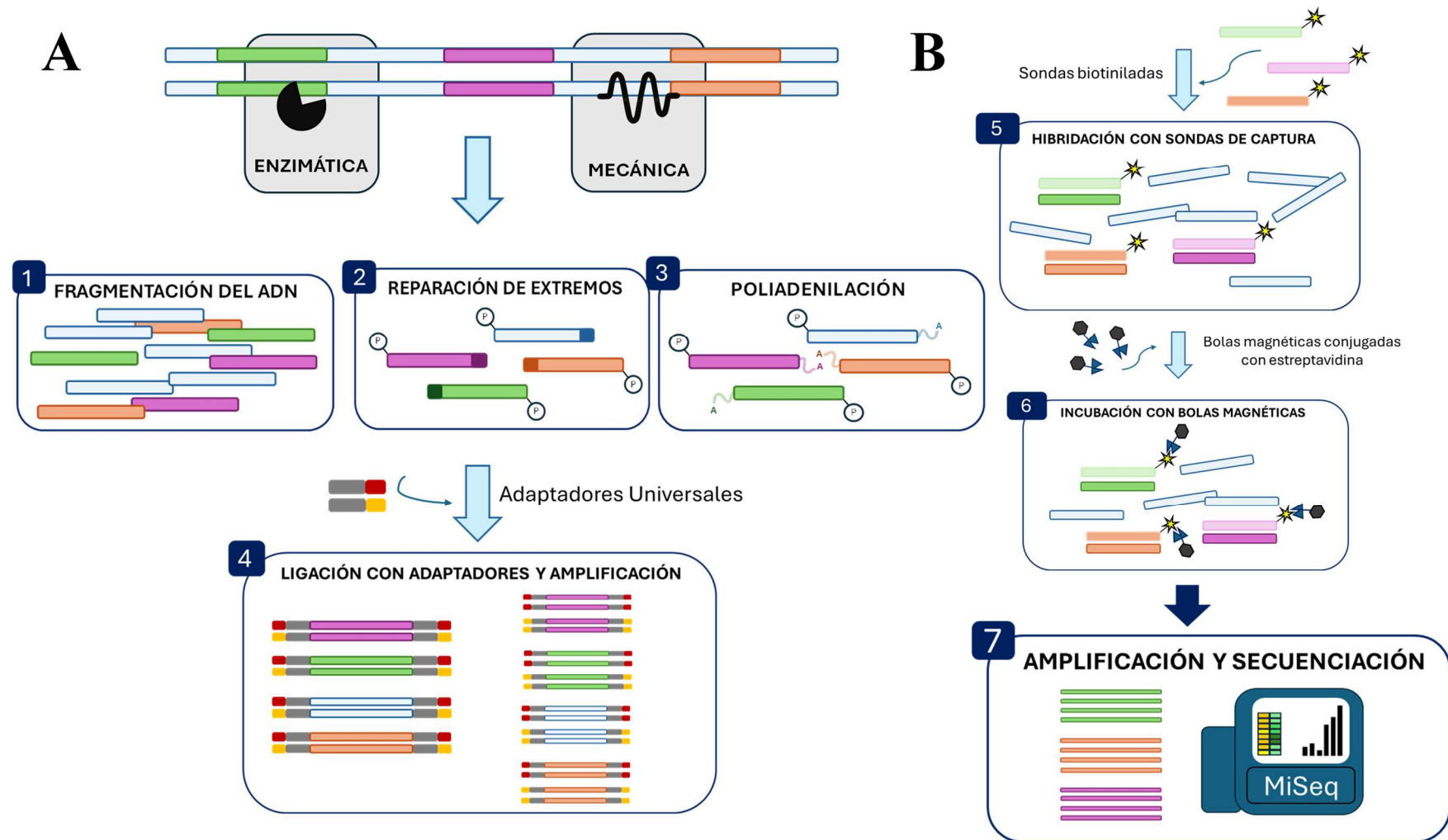
**Tabla 2. Programa del termociclador para la fragmentación, reparación de extremos y adición de colas de dA al DNA.**

Paso	Temperatura	Tiempo
1	4°C	HOLD
2	37°C	20 minutos
3	65°C	30 minutos
4	4°C	HOLD

**Tabla 3. Programa del termociclador para la amplificación por PCR de los fragmentos de DNA indexados.**

Paso	Temperatura	Tiempo	Nº ciclos
Inicialización	98°C	45 segundos	1
Desnaturalización	98°C	15 segundos	8
Templado " <i>Annealing</i> "	60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	1 minuto	1
Hold	4°C	Infinito	

Para el enriquecimiento de las librerías de DNA, se siguió el protocolo *Twist Target Enrichment Standard Hybridization v1* (**Figura 5B**). El primer paso consistió en la unión de las librerías individuales indexadas previa la hibridación. Para ello, se preparó un pool por cada 8 librerías individuales indexadas a una concentración final de 1500 ng por pool (187,5 ng/librería), tras lo cual se liofilizaron en un sistema concentrador de vacío. Posteriormente se realizó la hibridación de las sondas de captura con el pool de librerías liofilizadas a una temperatura de 70°C durante 16 horas en un termociclador. Tras este tiempo, se incubó la muestra de hibridación con bolas de estreptavidina seguido de una amplificación por PCR post-captura, acorde al programa indicado en la **Tabla 4**. Tras la amplificación, se purificaron los pools capturados mediante bolas magnéticas. Finalmente se llevó a cabo otro QC determinando la concentración final y el tamaño de los fragmentos obtenidos siguiendo la misma metodología anteriormente indicada.



**Figura 5.** Workflow esquemático de la secuenciación por captura del DNA. (A) Protocolo de generación de librerías. (B) Enriquecimiento de las librerías previo a la secuenciación.

A continuación, se diluyó cada *pool* de 8 muestras hasta obtener una concentración de 4 nM. Los *pools* fueron entonces desnaturalizados con hidróxido de sodio (NaOH) a 2 nM (#221465, Sigma-Aldrich, Madrid, España). Tanto los *pools* desnaturalizados, como la librería control del fago PhiX (20151542, Illumina, Madrid, España), se diluyeron con el tampón de hibridación HT1 (#20015892, Illumina) hasta obtener una concentración de 20 y 10 pM respectivamente. Seguidamente se preparó una mezcla de carga de 600  $\mu$ L conteniendo los *pools* de DNA a 10 pM y el DNA del fago PhiX a 0,1 pM. Finalmente, la mezcla se cargó en un cartucho de secuenciación v2 de 500 ciclos (#MS-102-2003, Illumina). La secuenciación se llevó a cabo en el equipo MiSeq™ System de Illumina.

**Tabla 4. Programa del termociclador para la amplificación por PCR post-captura.**

Paso	Temperatura	Tiempo	Nº ciclos
Inicialización	98°C	45 segundos	1
Desnaturalización	98°C	15 segundos	15
Templado "Annealing "	60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	1 minuto	1
Hold	4°C	Infinito	

#### 2.4. Análisis de secuenciación de DNA

Los ficheros *fastq* procedentes de la secuenciación se procesaron, eliminando las secuencias de los adaptadores y lecturas de baja calidad con el programa *fastp* v.0.23.4. A continuación se alinearon las lecturas mapeando contra el genoma de referencia GRCh38 con *bwa-mem* v.0.7.18. A los ficheros alineados se le marcaron duplicados y se recalibró la calidad de las secuencias con GATK (*MarkDuplicates* 4.5.0 y *BaseRecalibrator* v.4.5.0). Con los ficheros resultantes de alineamiento se llevó a cabo el llamado de variante con GATK v.4.6.0 *Mutect2*. Las variantes obtenidas fueron a continuación anotadas con VEP (*Variant Effect Predictor*) v.115.

Sobre la lista de variantes anotadas, se realizó una curación aplicando una serie de criterios previamente establecidos en la literatura.<sup>77</sup> Las variantes germinales fueron excluidas del análisis, considerándose únicamente las variantes con impacto alto o moderado según los criterios VEP, con una profundidad de lectura de referencia  $\geq 300$ , profundidad alternativa  $\geq 4$  y con una evidencia de la variante en ambas cadenas *forward/reverse* (F1R2 y F2R1)  $\geq 2$ . Además, se eliminaron todas aquellas variantes con una frecuencia del alelo minoritario (*minor allele frequency*, MAF), por encima del 1%,

eliminado de este modo los polimorfismos descritos en la población. Finalmente se estableció un umbral mínimo de frecuencia alélica de la variante (VAF) del 2% para identificar mutaciones relacionadas con CHIP. Estas mutaciones se verificaron mediante predictores *in silico* de patogenicidad y su reporte en el Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer (COSMIC).

## 2.5. Análisis estadístico

Las variables continuas se representaron como el valor de la media  $\pm$  desviación estándar, o mediana y rango intercuartil (RIQ) según correspondiera; y las variables categóricas como porcentajes. Las comparaciones de las variables categóricas entre grupos se realizaron mediante la prueba exacta de Fisher y el test *Chi-cuadrado de Pearson* ( $\chi^2$ ) dependiendo del tamaño muestral y de la distribución normal de los datos (test *Shapiro-Wilk* y *Kolmogorov-Smirnov*). Por su parte, el análisis estadístico de las variables numéricas se llevó a cabo mediante las pruebas *t-test Student/ANOVA*, para grupos de datos con distribución normal, y *Mann-Whitney/ Kruskal-Wallis test*, para conjuntos de datos con distribución anormal. Se consideró la significación estadística en los valores de  $p < 0,05$ . La supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de evento (SLE), se han representado mediante curvas Kaplan-Meier, y el análisis entre grupos se ha realizado mediante el método estadístico Log-rank (*Mantel-Cox test*). Los programas usados para el análisis estadístico han sido *IBM SPSS Statistics 21* (Armonk, NY, EE. UU.) y *GraphPad Prism 9.0 Software, LLC* (San Diego, CA, EE. UU.).

# **Resultados**

---

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Incidencia de CHIP en pacientes con NAC

El estudio de la presencia de mutaciones CHIP se realizó en una cohorte de 96 pacientes con NAC, con MACE-30d (n=38) y sin MACE-30d (n=58). Las características generales de esta cohorte se reflejan en la **Tabla 5**. La mediana de edad fue de 77,5 años, con sobrerrepresentación del sexo masculino; y observándose que un 63,5% de los pacientes desarrollaron sepsis posterior a la NAC. Estudiamos las características clínicas en función de la presencia de CHIP, evaluando a los pacientes con mutaciones CHIP (n=22) frente al resto de la cohorte sin mutaciones en los cuatro genes analizados (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* y *JAK2*) (n=74). De manera general, los pacientes con mutaciones CHIP fueron de mayor edad (82 vs. 77 años;  $p=0,039$ ), y con prevalencia del sexo femenino (54,5 vs. 27%;  $p=0,022$ ), junto con una mayor mortalidad a 4 años (59,1 vs. 35,1%;  $p=0,052$ ) (**Tabla 5**).

La incidencia de mutaciones CHIP en los 4 genes estudiados fue de un 22,9% en la cohorte global del estudio, siendo el gen *TET2* el más frecuentemente mutado (11,5%), seguido de *DNMT3A* (10,4%) y *ASXL1* (4,2%). Cabe destacar que no hemos encontrado mutaciones CHIP en el gen *JAK2* en nuestra cohorte de pacientes, posiblemente debido al limitado tamaño muestral (**Tabla 5**).

Cuando analizamos las variables significativas diferenciando por el gen mutado, encontramos que las mutaciones en *DNMT3A* (*DNMT3A<sup>Mut</sup>*) se asociaron significativamente con el sexo femenino (70% en el grupo *DNMT3A<sup>Mut</sup>* vs. 27% en la cohorte sin CHIP;  $p=0,006$ ) (**Tabla 6A**). A su vez las mutaciones en *TET2* (*TET2<sup>Mut</sup>*) se asociaron con la edad (82 vs. 77 años en *TET2<sup>Mut</sup>* y cohorte sin CHIP respectivamente;  $p=0,018$ ) (**Tabla 6B**). De manera general, aunque no siendo estadísticamente significativo, se observó un aumento de la mortalidad a 4 años en los pacientes con mutaciones CHIP en los 3 genes (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*) (**Tablas 6A-C**).

Tabla 5. Características generales de la cohorte de estudio (N=96).

	Cohorte global (N=96)	CHIP (n=22)	No-CHIP (n=74)	p-value
Edad (años) (mediana; RIQ)	77, 5 (73-85)	82 (73,8-82,3)	77 (72-84)	<b>0,039</b>
Sexo (masculino/femenino) (N)	63/33	10/12	54/20	<b>0,022</b>
Sepsis, N (%)	61 (63,5)	11 (50)	51 (68,9)	0,130
Asistencia, N (%)	3 (3,1)	1 (4,5)	2 (2,7)	0,546
Obesidad, N (%)	40 (41,7)	9 (40,9)	31 (41,9)	>0,999
Enfermedad cardíaca crónica, N (%)	40 (41,7)	8 (36,4)	32 (43,2)	0,629
Dislipidemia, N (%)	55 (57,3)	10 (45,5)	45 (60,8)	0,227
Diabetes mellitus, N (%)	37 (38,5)	9 (40,9)	28 (37,8)	0,808
Hipertensión arterial, N (%)	66 (68,8)	17 (77,8)	49 (66,2)	0,435
EPOC, N (%)	20 (20,8)	2 (9,1)	18 (24,3)	0,147
CCI $\geq 3$ , N (%)	18 (18,8)	4 (18,2)	14 (18,9)	>0,999
PSI_FINE $\geq 4$ , N (%)	61 (63,5)	17 (77,3)	44 (59,5)	0,141
CURB-65 $\geq 3$ , N (%)	33 (34,4)	4 (18,2)	29 (39,2)	0,079
Mortalidad a 4 años, N (%)	39 (40,6)	13 (59,1)	26 (35,1)	0,052
Mutaciones CHIP, N (%)	22 (22,9)			
<i>DNMT3A</i> , N (%)	10 (10,4)			
<i>TET2</i> , N (%)	11 (11,5)			
<i>ASXL1</i> , N (%)	4 (4,2)			

Se representan los pacientes con mutaciones CHIP (n=25) frente a pacientes sin mutaciones CHIP (n=71). Para las comparaciones entre ambos grupos se han utilizado los test estadísticos U Mann-Whitney y Fisher's exact dependiendo de la tipología de la variable. **RIQ**, Rango intercuartílico; **EPOC**, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; **CCI**, *Charlson Comorbidity Index*; **PSI**, *Pneumonia Severity Index*; **CURB-65**, Acrónimo de Confusión, Urea (BUN > 7 mmol/L), Frecuencia respiratoria ( $\geq 30$ /min), Presión arterial (sistólica <90 o diastólica  $\leq 60$ ) y Edad ( $\geq 65$ ). **CHIP**, hematopoyesis clonal de potencial indeterminado.

En cuanto al perfil mutacional de los genes analizados, las mutaciones encontradas en *TET2* fueron mayoritariamente variantes *frameshift* y *missense*. Identificamos 2 variantes *nonsense* en 2 pacientes con MACE-30d. En otro paciente con MACE-30d, encontramos 2 mutaciones concomitantes en este gen. La gran mayoría de las mutaciones identificadas se han clasificado como probablemente patogénicas (LP) según los predictores *in silico*, en base a la Clasificación Americana de Genética Médica y Genómica (ACMG). Respecto al gen *DNMT3A*, la gran mayoría de las mutaciones fueron *missense*, detectándose mutaciones concomitantes en 3 pacientes. Además, 1 de las mutaciones detectadas, la *Arg882His*, se encontró en 3 pacientes, dos de los cuales con MACE-30d, y el tercero presentó el MACE a 1 año. Esta variante se clasificó *in silico* como patogénica (P), en base a la ACMG, además de mostrar evidencia clínica somática (*Tier 1*, clasificación AMP) en un contexto de neoplasia hematológica. En cuanto a las mutaciones

en el gen *ASXL1*, las 4 identificadas fueron del tipo *nonsense*, clasificándose como LP y P. Finalmente es interesante mencionar que de los 22 pacientes con mutaciones CHIP identificadas, 3 (13,6%) presentaron mutaciones concomitantes en 2 genes distintos, desarrollando MACE-30d (Tabla 7).

**Tabla 6. Análisis de variables en función del gen CHIP estudiado.**

A

	<i>DNMT3A</i> (n=10)	No-CHIP (n=74)	p-value
Edad (años) (mediana; RIQ)	77,5 (72-85)	77 (72-84)	0,743
Sexo (masculino/femenino) (N)	3/7	54/20	<b>0,006</b>
Mortalidad a 4 años, N (%)	5 (50)	26 (35,1)	0,361

B

	<i>TET2</i> (n=11)	No-CHIP (n=74)	p-value
Edad (años) (mediana; RIQ)	84 (78-88)	77 (72-84)	<b>0,018</b>
Sexo (masculino/femenino) (N)	7/4	54/20	0,496
Mortalidad a 4 años, N (%)	6 (54,5)	26 (35,1)	0,215

C

	<i>ASXL1</i> (n=4)	No-CHIP (n=74)	p-value
Edad (años) (mediana; RIQ)	81 (75-84,8)	77 (72-84)	0,399
Sexo (masculino/femenino) (N)	2/2	54/20	0,315
Mortalidad a 4 años, N (%)	2 (50)	26 (35,1)	0,615

Se comparan pacientes con mutaciones en (A) *DNMT3A*, (B) *TET2* y (C) *ASXL1* versus el grupo sin mutaciones CHIP en estos genes. Para las comparaciones entre ambos grupos se han utilizado los test estadísticos *U Mann-Whitney* y *Fisher's exact* dependiendo de la tipología de la variable. **RIQ**, Rango intercuartílico

### 3.2. Relación de CHIP y MACE

Cuando estudiamos la cohorte global en función de desarrollar un MACE temprano, se observó que el grupo con MACE-30d presentó mayor porcentaje de enfermedad cardíaca crónica (57,9 vs. 31,3%;  $p=0,012$ ), de diabetes (60,5 vs. 24,1%;  $p<0,001$ ), de hipertensión arterial (84,2 vs. 58,6%;  $p=0,013$ ), junto con una mayor gravedad en las escalas de riesgo FINE (78,9 vs. 53,4%;  $p=0,017$ ) y CURB-65 (47,4 vs. 35,9%;  $p=0,047$ ), respecto al grupo NO MACE- 30d (Tabla 8).

CAPÍTULO I. Resultados

**Tabla 7. Mutaciones relacionadas con la hematopoyesis clonal identificadas en la población de estudio (N=96).**

ID_NAC	CASO_CONTROL	GEN	Nº MUTACIONES	Mutación 1	Mutación 2	Mutación 3	VAF	CONSECUENCIA	SIGNIFICADO CLINICO
604	Control	<i>DNMT3A</i>	1	Leu344Gln			0,024	missense	VUS
643	Caso	<i>DNMT3A</i>	1	Tyr735Cys			0,039	missense	P
681	Caso	<i>ASXL1</i>	1	Gln522Ter			0,033	nonsense	LP
698	Caso	<i>DNMT3A</i>	2	Arg882His	Cys562ValfsTer89		0,069; 0,034	missense; frameshift	P
721	Caso	<i>TET2</i>	1	Ser1586TyrfsTer28			0,375	frameshift	LP
739	Caso	<i>ASXL1</i>	1	Arg774Ter			0,235	nonsense	LP
		<i>TET2</i>	1	Ser354Ter			0,043	nonsense	P
801	Control	<i>ASXL1</i>	1	Trp1037Ter			0,022	nonsense	P
950	Caso	<i>TET2</i>	1	Gly1297Arg			0,02	missense	VUS
855	Caso	<i>DNMT3A</i>	1	Ala380Pro			0,042	missense	VUS
		<i>TET2</i>	1	Lys306Ter			0,025	nonsense	LP
862	Caso	<i>TET2</i>	2	Cys1281TrpfsTer18	Cys1378Tyr		0,024; 0,102	frameshift; missense	LP; VUS
871	Control	<i>TET2</i>	1	Arg1261Leu			0,376	missense	VUS
874	Control	<i>DNMT3A</i>	3	Pro799Ser	Pro799Thr	Gln573_Ala574del	0,038; 0,097	missense; inframe deletion	VUS
892	Caso	<i>ASXL1</i>	1	Trp960Ter			0,146	nonsense	LP
901	Control	<i>TET2</i>	1	Pro1115TyrfsTer14			0,024	frameshift	LP
650	Caso	<i>DNMT3A</i>	1	Arg882His			0,276	missense	P
654	Caso	<i>DNMT3A</i>	1	Ala741Gly			0,418	missense	LP
		<i>TET2</i>	1	Met638Ter			0,388	frameshift	LP
753	Control	<i>DNMT3A</i>	1	Ala910Val			0,024	missense	VUS
784	Control	<i>TET2</i>	1	Pro1194Arg			0,042	missense	VUS
843	Control	<i>DNMT3A</i>	1	Arg882His			0,07	missense	P
896	Caso	<i>TET2</i>	1	Ala290CysfsTer5			0,025	frameshift	LP
972	Control	<i>DNMT3A</i>	2	Pro799Ser	Pro799Thr		0,052	missense	VUS
975	Control	<i>TET2</i>	1	Val1100AlafsTer3			0,102	frameshift	LP

Se ha estudiado un panel customizado de 4 genes CHIP relacionados con patología cardiovascular: *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* y *JAK2*. **ID\_NAC**, identificador del paciente en la cohorte de NAC, **Caso**, paciente con NAC y MACE a 30 días del ingreso; **Control**, paciente con NAC sin MACE a 30 días del ingreso; **VAF**, frecuencia de alelo variante; **VUS**, significado incierto; **LP**, probablemente patogénica; **P**, patogénica.

La incidencia de mutaciones CHIP fue mayor en los pacientes con MACE-30d respecto a los NO MACE-30d (31,6 vs. 17,2%;  $p=0,102$ ). Al estudiar los genes por separado la frecuencia de mutaciones fue mayor en los MACE-30d, aunque no de manera significativa: *TET2* (18,4 vs. 6,9%;  $p=0,083$ ), *DNMT3A* (13,2 vs. 8,6%;  $p=0,477$ ) y *ASXL1* (7,9 vs. 1,7%;  $p=0,139$ ) (**Tabla 8**).

**Tabla 8. Características generales de la cohorte en función de la presencia de MACE.**

	Cohorte global (N=96)	MACE-30d (n=38)	NO MACE-30d (n=58)	p-value
Edad (años) (mediana; RIQ)	77, 5 (73-85)	79 (73-85,3)	77 (72-84)	0,213
Sexo (masculino/femenino) (N)	63/33	26/12	37/21	0,667
Sepsis, N (%)	61 (63,5)	26 (68,4)	35 (60,3)	0,520
Asistencia, N (%)	3 (3,1)	1 (2,6)	2 (3,4)	>0,999
Obesidad, N (%)	40 (41,7)	17 (44,7)	23 (39,7)	0,675
Enfermedad cardíaca crónica, N (%)	40 (41,7)	22 (57,9)	18 (31,1)	<b>0,012</b>
Dislipidemia, N (%)	55 (57,3)	21 (55,3)	34 (58,6)	0,834
Diabetes mellitus, N (%)	37 (38,5)	23 (60,5)	14 (24,1)	<b>&lt;0,001</b>
Hipertensión arterial, N (%)	66 (68,8)	32 (84,2)	34 (58,6)	<b>0,013</b>
EPOC, N (%)	20 (20,8)	8 (21,1)	12 (20,7)	>0,999
CCI $\geq$ 3, N (%)	18 (18,8)	7 (18,4)	11 (18,9)	>0,999
PSI_FINE $\geq$ 4, N (%)	61 (63,5)	30 (78,9)	31 (53,4)	<b>0,017</b>
CURB-65 $\geq$ 3, N (%)	33 (34,4)	18 (47,4)	15 (25,9)	<b>0,047</b>
Mortalidad a 4 años, N (%)	39 (40,6)	20 (52,6)	19 (32,8)	0,059
Mutaciones CHIP, N (%)	22 (22,9)	12 (31,6)	10 (17,2)	0,102
<i>DNMT3A</i> , N (%)	10 (10,4)	5 (13,2)	5 (8,6)	0,477
<i>TET2</i> , N (%)	11 (11,5)	7 (18,4)	4 (6,9)	0,083
<i>ASXL1</i> , N (%)	4 (4,2)	3 (7,9)	1 (1,7)	0,139

Se representan los pacientes con MACE a 30 días (MACE-30d, n=38) frente a pacientes sin MACE a 30 días (NO MACE-30d, n=58). Para las comparaciones entre ambos grupos se han utilizado los test estadísticos *U Mann-Whitney* y *Fisher's exact* dependiendo de la tipología de la variable. **RIQ**, Rango intercuartílico; **EPOC**, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; **CCI**, *Charlson Comorbidity Index*; **PSI**, *Pneumonia Severity Index*; **CURB-65**, Acrónimo de Confusión, Urea (BUN > 7 mmol/L), Frecuencia respiratoria ( $\geq$ 30/min), Presión arterial (sistólica <90 o diastólica  $\leq$ 60) y Edad ( $\geq$ 65). **CHIP**, hematopoyesis clonal de potencial indeterminado.

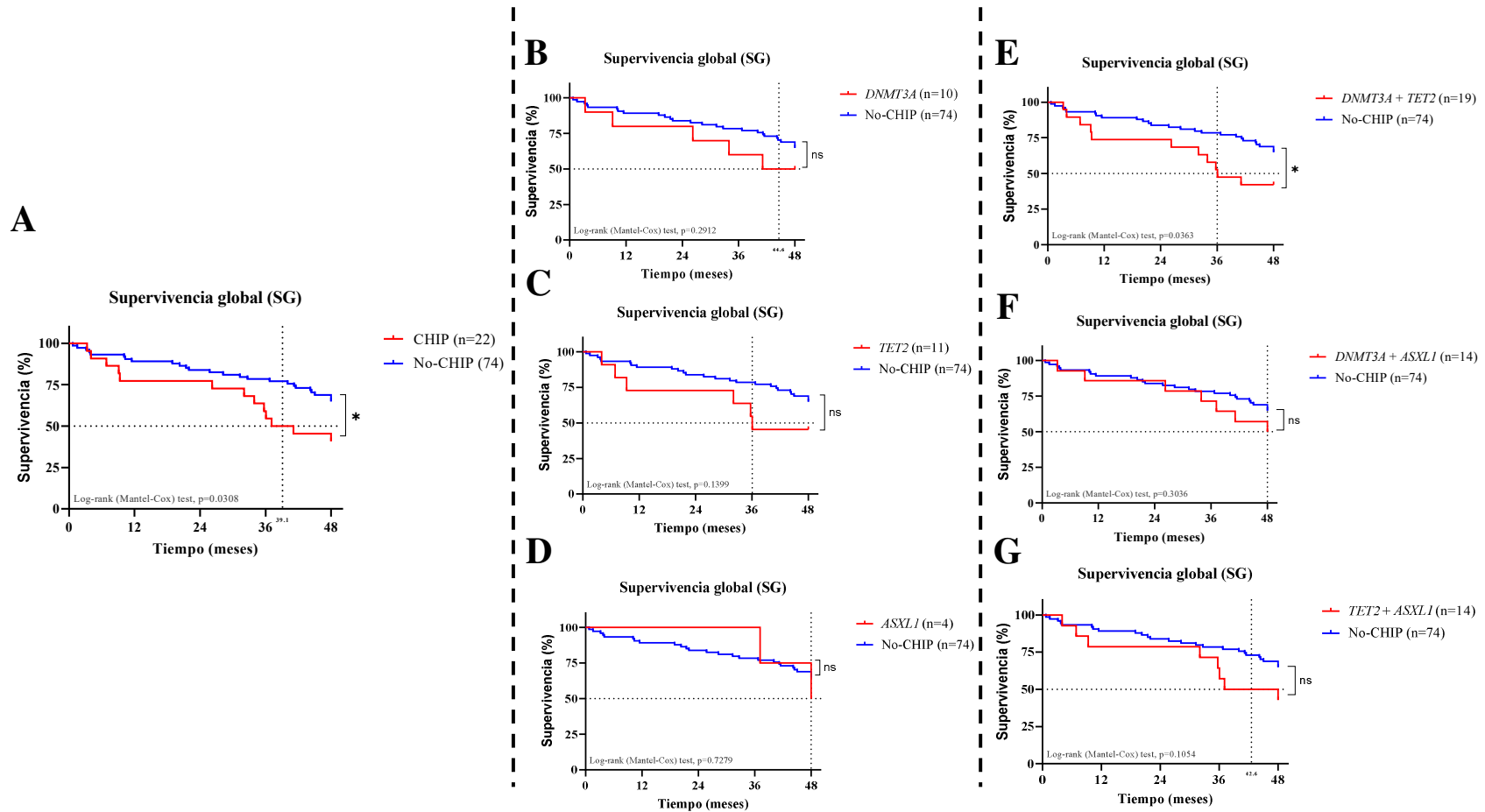
### 3.3. Relación entre mutaciones CHIP y supervivencia

El análisis de la supervivencia global (SG) a 4 años en la cohorte del estudio de mutaciones CHIP (N=96), reveló que aquellos pacientes portadores de mutaciones en los genes estudiados (n=22) presentaron una menor SG respecto a los pacientes sin mutaciones (n=74); alcanzándose la mediana de supervivencia a los 39,1 meses en el grupo con mutaciones ( $p=0,031$ , *Log-rank test*) (**Figura 6A**). Esto evidencia que portar mutaciones CHIP influye en la SG de pacientes con NAC. Además, se evaluó el peso de cada gen de manera individual en la SG, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los 3 genes analizados, *DNMT3A* (n=10;  $p=0,291$ ) (**Figura 6B**), *TET2* (n=11;  $p=0,140$ ) (**Figura 6C**), *ASXL1* (n=4;  $p=0,728$ ) (**Figura 6D**). Dado que no se encontraron diferencias, posiblemente debido al bajo número de pacientes con mutaciones CHIP al

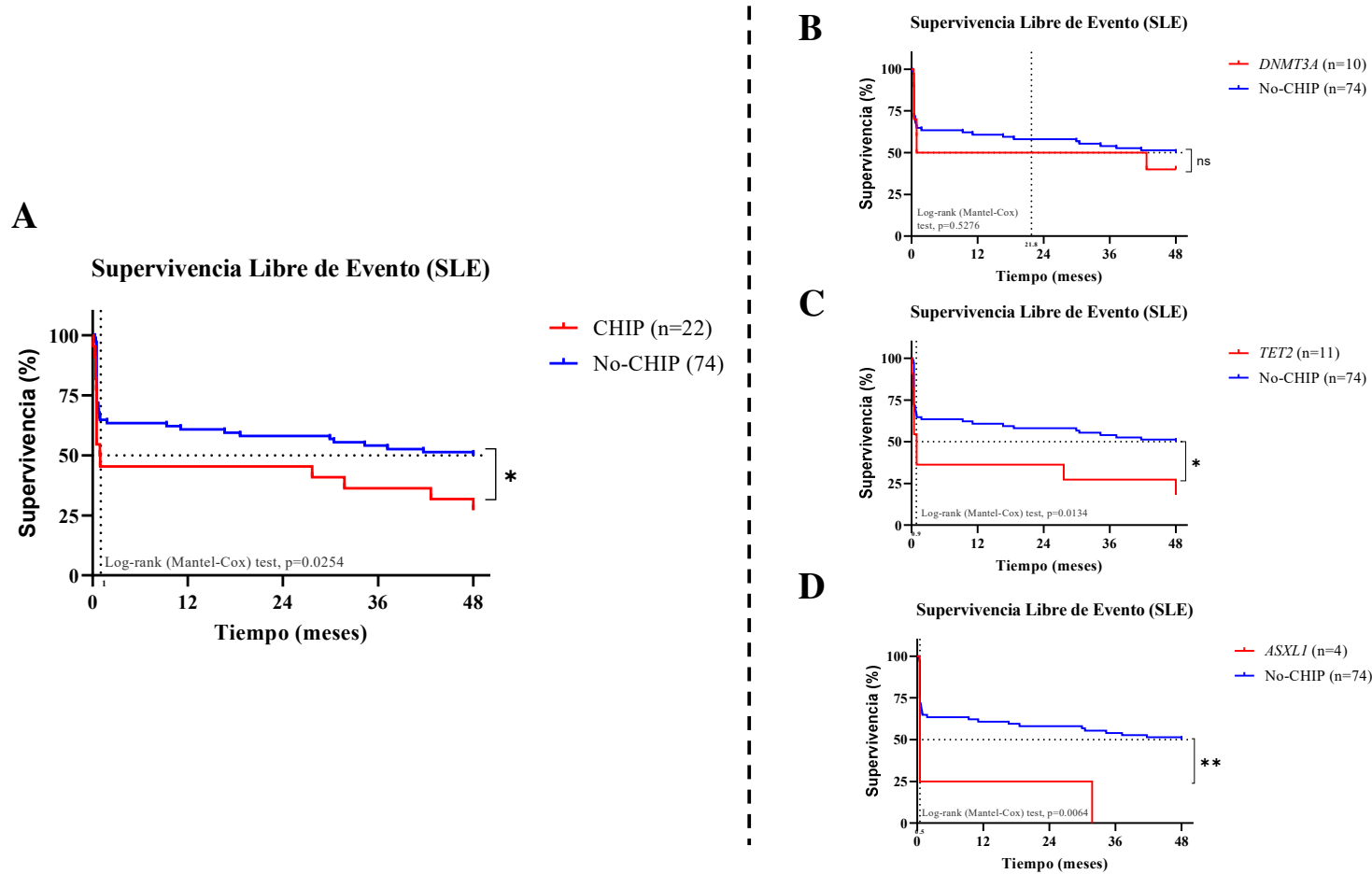
analizar los genes de manera individual, se analizó la SG haciendo agrupaciones de 2 genes: *DNMT3A+TET2* (n=19,  $p=0,036$ ) (**Figura 6E**), *DNMT3A+ASXL1* (n=14,  $p=0,304$ ) (**Figura 6F**), *TET2+ASXL1* (n=14,  $p=0,105$ ) (**Figura 6G**). Estos resultados parecen indicar que las mutaciones en los genes *DNMT3A* y *TET2* tienen un mayor peso en la SG de estos pacientes.

También se analizó la supervivencia libre de evento (SLE) cardiovascular en esta cohorte, observándose que el grupo de pacientes portadores de CHIP presentaron una menor SLE respecto a los no portadores ( $p=0,025$ ) (**Figura 7A**). Al igual que en el análisis de SG, se estudió la influencia en la SLE de las mutaciones en cada gen por separado, *DNMT3A* ( $p=0,528$ ) (**Figura 7B**), *TET2* ( $p=0,013$ ) (**Figura 7C**), *ASXL1* ( $p=0,006$ ) (**Figura 7D**). Estos resultados indicaron que mutaciones en el gen *TET2* tuvieron un impacto directo en la SLE, mostrando una posible relación con el desarrollo del MACE en pacientes con NAC. A pesar de que el análisis arrojó diferencias significativas respecto a la SLE en el gen *ASXL1*, no podemos afirmar que su impacto sea directo ya que, de los 4 pacientes con mutaciones en este gen, 3 presentaron MACE-30d del ingreso.

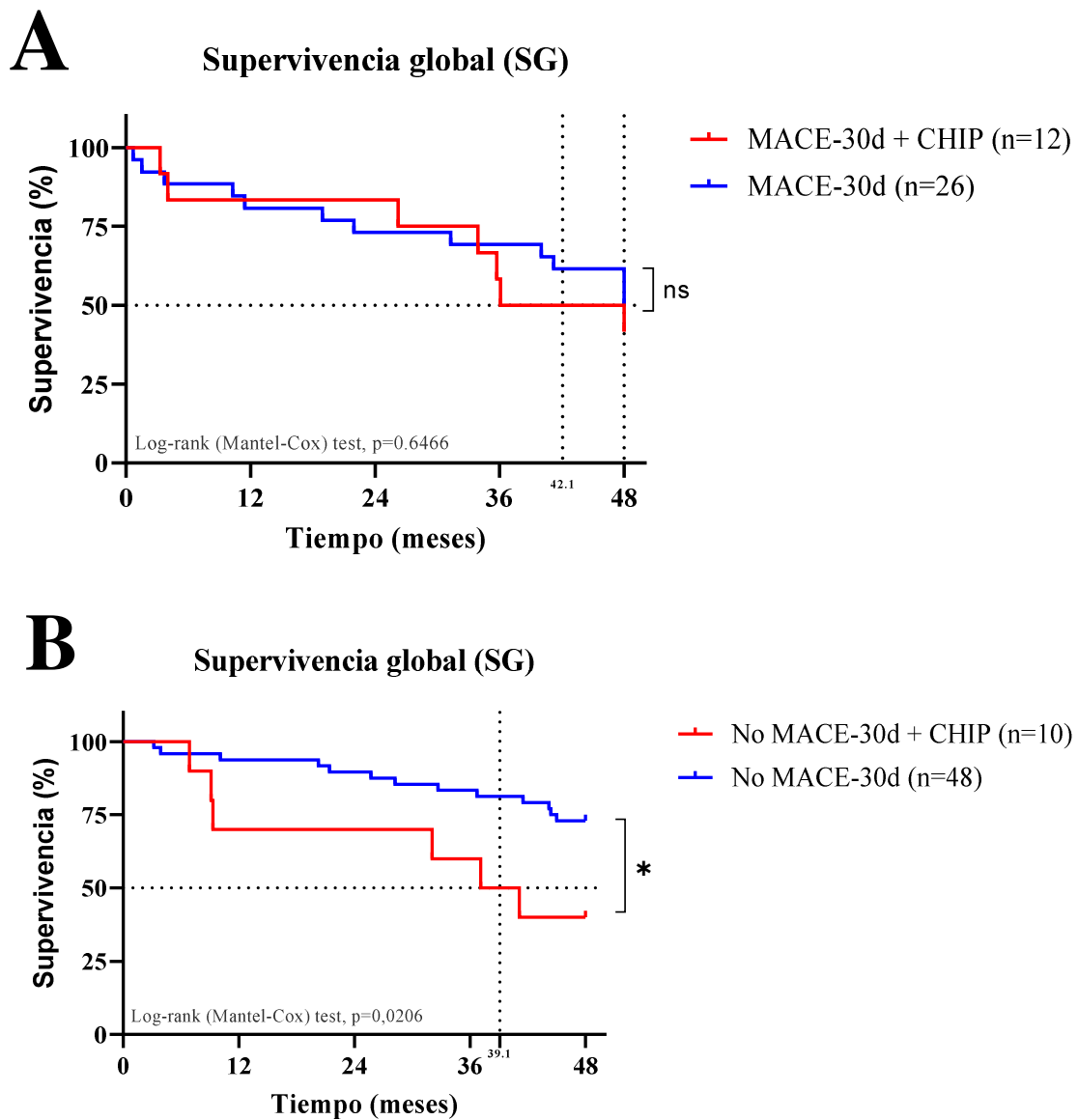
Finalmente evaluamos la SG en función de desarrollar un MACE-30d y la presencia de mutaciones CHIP. En los pacientes con MACE-30d (N=38), no observamos diferencias significativas en la SG en base a la presencia de mutaciones CHIP (n=12) respecto al grupo sin mutaciones (n=26) ( $p=0,647$ ). La mediana de supervivencia fue menor en el grupo con mutaciones CHIP (42,1 vs. 48 meses) (**Figura 8A**). En cambio, cuando analizamos los pacientes NO MACE-30d (N=58), los portadores de mutaciones CHIP (n=10) presentaron una menor SG (mediana de supervivencia de 39,1 meses) frente a los pacientes no portadores (n=48) ( $p=0,021$ ) (**Figura 8B**). Estos resultados parecen indicar que en el grupo NO MACE-30d, la presencia de mutaciones CHIP implica una reducción de la SG a largo plazo; mientras que en el grupo MACE-30d, sería el propio ECV el que tendría implicaciones en la SG de este subgrupo de pacientes.



**Figura 6. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) en la cohorte de estudio CHIP (N=96).** (A) Se compara la SG de pacientes con mutaciones CHIP en *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1* (n=22) versus pacientes sin mutaciones CHIP en estos genes (n=74) (CHIP vs. No-CHIP;  $p=0,031$ ). Análisis de la SG en función de mutaciones en (B) *DNMT3A* (n=10) ( $p=0,291$ ); (C) *TET2* (n=11) ( $p=0,140$ ); (D) *ASXL1* (n=4) ( $p=0,728$ ). Análisis de SG en función de combinación de mutaciones en (E) *DNMT3A+TET2* (n=19) ( $p=0,036$ ); (F) *DNMT3A+ASXL1* (n=14) ( $p=0,304$ ); (G) *TET2+ASXL1* (n=14) ( $p=0,105$ ). Para las comparaciones de las curvas de supervivencia entre los diferentes subgrupos se ha utilizado la prueba estadística *Log-rank (Mantel-Cox)*. \*  $p<0,05$ ; ns, no significativo.



**Figura 7. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de evento (SLE) en la cohorte de estudio CHIP (N=96).** (A) Se compara la SLE de pacientes con mutaciones CHIP en *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1* (n=25) versus pacientes sin mutaciones CHIP en estos genes (n=71) (CHIP vs. No-CHIP;  $p=0,022$ ). Análisis de la SLE en función de mutaciones en (B) *DNMT3A* (n=10) ( $p=0,377$ ); (C) *TET2* (n=12) ( $p=0,029$ ); (D) *ASXL1* (n=6) ( $p=0,065$ ). Para las comparaciones de las curvas de supervivencia entre los diferentes subgrupos se ha utilizado el test estadístico *Log-rank (Mantel-Cox)*. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; ns, no significativo.



**Figura 8.** Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) en los pacientes con mutaciones CHIP en función de desarrollar un MACE. (A) Se compara la SG de pacientes con MACE a 30 días con mutaciones CHIP en *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1* (n=12) versus pacientes con MACE a 30 días sin mutaciones CHIP en estos genes (n=26) (MACE-30d+CHIP vs. MACE-30d;  $p=0,646$ ). (B) Análisis de la SG de pacientes sin MACE a 30 días con mutaciones CHIP (n=10) versus pacientes sin MACE a 30 días sin mutaciones CHIP (n=48) (No MACE-30d+CHIP vs. No-MACE-30;  $p=0,021$ ). Para las comparaciones de las curvas de supervivencia entre los diferentes subgrupos se ha utilizado el test estadístico *Log-rank (Mantel-Cox)*. \*  $p<0,05$ ; ns, no significativo.

# Discusión

#### 4. DISCUSIÓN

La CHIP se reconoce como un estado premaligno asociado con un aumento del riesgo de neoplasias hematológicas y con resultados clínicos adversos. Este fenómeno se caracteriza por la expansión clonal de HSC portadoras de mutaciones somáticas adquiridas en individuos sin evidencia de enfermedad hematológica. Estas mutaciones, a menudo leucemogénicas, afectan con frecuencia a genes reguladores epigenéticos como *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1*, los cuales son altamente prevalentes en la población sana con CHIP. La identificación de estas alteraciones somáticas ha posicionado a la CHIP como un biomarcador emergente para la detección de estadios premalignos y la evaluación del riesgo clínico.<sup>62</sup>

En este capítulo, hemos descrito que las mutaciones somáticas que conducen al crecimiento clonal de células hematopoyéticas en un escenario de CHIP fueron frecuentes en nuestra cohorte de estudio, ya que el 22,9% de los pacientes con NAC portaron estas alteraciones genética. Este porcentaje va en consonancia con la avanzada edad de nuestra población de pacientes con NAC, con una mediana de edad de 77,5 años; lo que concuerda con lo reportado que establece una asociación directa y significativa entre la edad avanzada y la aparición de CHIP.<sup>63</sup>

En relación con la gravedad de la neumonía, en nuestra cohorte, un alto porcentaje de pacientes desarrolló sepsis. Recientemente se han comunicado los resultados de un estudio multicéntrico prospectivo observacional que incluyó a pacientes con sepsis y leucocitosis que requirieron ingreso en UCI, excluyendo a individuos con neoplasia maligna previa. Observaron que el 47% de los pacientes presentaban variantes somáticas en genes CHIP, siendo *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1* los más frecuentes. Además, revelaron que la CH se asociaba a una mayor incidencia de disfunción orgánica durante el ingreso en UCI, y tasas más elevadas de citopenias de nueva aparición. Por lo que la sepsis, como ejemplo de “hematopoyesis de estrés”, podría contribuir a una mayor adquisición de mutaciones CHIP, influyendo en la evolución de la enfermedad.<sup>213</sup>

A su vez, estudios epidemiológicos han observado que portar mutaciones asociadas a CHIP se correlacionan con un mayor riesgo de infecciones bacterianas y virales; con un riesgo aumentado de episodios sépticos.<sup>214</sup> Investigaciones en neumonía bacteriana han mostrado que la CHIP impulsa el *inflammaging* y la senescencia inmune, demostrando que los portadores de CHIP (en concreto mutaciones en *TET2*) tuvieron un riesgo 1,23

veces mayor de desarrollar neumonía respecto a los no portadores, asociado a deficiencias inmunitarias innatas.<sup>215</sup>

En nuestros pacientes con NAC, hemos estudiado un panel customizado de 4 genes relacionados con patología cardiovascular, identificando al gen *TET2* como el más frecuentemente mutado, seguido de *DNMT3A* y *ASXL1*; siendo *TET2* el más representado en el subgrupo de pacientes que desarrollaron un MACE de manera temprana al ingreso, y *DNMT3A* el gen más frecuentemente mutado en el subgrupo de pacientes sin MACE. Curiosamente, no hemos identificado mutaciones en el gen *JAK2* en nuestra cohorte, posiblemente debido al limitado tamaño muestral del estudio.

Como se ha mencionado, el grupo de pacientes con mutaciones CHIP fueron de mayor edad, con una prevalencia del sexo femenino, y una tendencia significativa a una mayor tasa de mortalidad a 4 años. Hemos identificado una mayor representación de mujeres en el grupo de mutaciones en el gen *DNMT3A*, y una mayor edad en aquellos pacientes con mutaciones en *TET2*. Resultados de un estudio reciente realizado en alrededor de 450.000 participantes del UK Biobank mostraron que mutaciones en el gen *DNMT3A* se observaron con mayor prevalencia en mujeres independientemente de la edad, en contraste con los datos epidemiológicos de la prevalencia de CH asociada a la edad y al sexo masculino. En este sentido, modelos murinos sugieren que la exposición a estrógenos podría favorecer la expansión clonal de células hematopoyéticas con mutaciones en *Dnmt3a*, lo que podría reflejar su predominancia en el sexo femenino.<sup>216</sup> Por su parte, el análisis de datos de más de 24.000 pacientes con cánceres no hematológicos del estudio PanCancer identificó al gen *DNMT3A* como el gen mutado con mayor frecuencia, siendo estas mutaciones más frecuentes en mujeres de manera significativa (38,94 vs. 31,37%), al contrario que mutaciones en el gen *ASXL1*.<sup>217</sup>

La presencia de CHIP se asocia con un mayor riesgo de mortalidad por cualquier causa y con un mayor riesgo de muerte por cáncer y ECV.<sup>78</sup> En nuestra cohorte de pacientes con NAC hemos observado que portar mutaciones CHIP en los genes *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1* conlleva a una reducción significativa de la supervivencia global a 4 años, a la vez que implica un menor tiempo hasta la aparición del ECV. En pacientes con aterosclerosis la presencia de mutaciones CHIP se asoció de forma independiente con resultados adversos, especialmente en pacientes con clones con mutaciones en *TET2* y genes del espliceosoma (*SF3B1/SRSF2/U2AF1*).<sup>218</sup> En la enfermedad arterial coronaria la CHIP se

ha identificado como un predictor de mortalidad, con especial interés en las mutaciones en *TET2* al conferir un fenotipo proaterogénico en macrófagos y una mayor activación inflamatoria.<sup>219</sup>

Curiosamente, nuestros resultados muestran que la presencia de mutaciones asociadas a CHIP tuvo un impacto diferencial sobre la SG a largo plazo según la aparición de MACE en el contexto de un ingreso por NAC. En concreto, entre los pacientes que desarrollaron un MACE precoz ( $\leq 30$  días desde el ingreso), la presencia de mutaciones CHIP no se asoció con un peor pronóstico en términos de mortalidad a largo plazo. Por el contrario, en aquellos pacientes que no presentaron MACE, portar mutaciones CHIP se asoció significativamente con una menor supervivencia a los 4 años de seguimiento.

Este hallazgo es coherente con la evidencia que sugiere que el impacto pronóstico de CHIP no es uniforme y puede depender del contexto clínico y del perfil de riesgo cardiovascular del paciente. En estudios que han analizado cohortes de pacientes con ECV establecida, la CHIP no se asoció significativamente con un incremento global de MACE tras ajustar por covariables clínicas y terapias estándar (HR 1,07).<sup>220</sup> Por otro lado, algunos estudios observacionales y ensayos clínicos han mostrado que la CHIP no siempre predice un incremento de riesgo cardiovascular significativo en poblaciones específicas. En el análisis del estudio ASPREE en adultos sanos mayores de 70 años, la presencia de CHIP no se asoció con un riesgo aumentado de MACE en comparación con quienes no presentaban CHIP, incluso después de considerar diferentes cargas clonales por VAF ( $\geq 2-10\%$ ). Únicamente portar mutaciones CHIP se asoció con un mayor riesgo de sangrado clínicamente significativo.<sup>221</sup> Estos resultados respaldan la idea de que en poblaciones con comorbilidad significativa o en presencia de tratamientos de prevención cardiovascular óptimos, la presencia de CHIP puede tener un menor efecto pronóstico sobre eventos clínicos mayores. Así, la asociación entre mutaciones CHIP y menor SG a largo plazo observada en los pacientes que no desarrollaron MACE sugiere que la CHIP podría actuar como un marcador de riesgo subclínico en ausencia de ECV agudos manifiestos. Estudios de cohortes y metaanálisis han demostrado que la CHIP se asocia con un aumento de la mortalidad global (HR  $\sim 1.34$ ) y de ECV en poblaciones generales, aunque el riesgo de mortalidad cardiovascular específica puede depender del tamaño del clon, de genes específicos mutados, así como de características inherentes del paciente<sup>78</sup>. En una cohorte de cirugía de bypass coronario, mutaciones CHIP con clon grande (VAF  $\geq 2\%$ ) se asociaron con un mayor riesgo de mortalidad a largo plazo, aunque no se

relacionó con la aparición de MACE; mientras que clones pequeños (VAF 0,1-2%) no mostraron asociación significativa con resultados adversos.<sup>222</sup>

En conjunto, estos resultados apoyan la base de que la CHIP no debe considerarse un factor pronóstico homogéneo, sino un modulador de riesgo cuya relevancia clínica se ve influenciada por el contexto clínico y la presencia de eventos agudos. Desde un punto de vista clínico, nuestros hallazgos sugieren que la utilidad pronóstica de la CHIP podría ser mayor en pacientes que no han experimentado un MACE precoz tras un episodio de NAC, y es en estos pacientes donde la presencia de mutaciones podría contribuir a un mayor riesgo a largo plazo.

Finalmente, cabe destacar que una limitación importante de este estudio es el modesto tamaño muestral, y estudios adicionales en el conjunto de las 3 cohortes de las que disponemos ayudará a afinar los resultados obtenidos.



## **CAPÍTULO II.**

Estudio de la estratificación del riesgo cardiovascular en NAC mediante perfiles de miRNA circulantes.

# **Introducción**

## 1. INTRODUCCIÓN

La identificación de biomarcadores capaces de reflejar de forma temprana, dinámica y específica los procesos fisiopatológicos subyacentes a la NAC se ha convertido en una prioridad en la investigación biomédica. Como se ha tratado en la Introducción General, los biomarcadores clásicos, como las Tn, la PCR, la PCT o los péptidos natriuréticos, han demostrado un gran valor diagnóstico y pronóstico, pero presentan limitaciones en términos de especificidad, sensibilidad o capacidad para reflejar un estado de inflamación sistémica, daño endotelial o disfunción orgánica. En este escenario, los miRNA han emergido como una nueva clase de biomarcadores con un notable potencial traslacional.

Los miRNA son pequeñas moléculas de RNA no codificante, de entre 18-25 nt, altamente conservados evolutivamente, que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional mediante su unión a secuencias complementarias del mRNA diana. Este proceso conduce a la inhibición de la traducción mediante la degradación del mRNA, modulando así la síntesis proteica celular. Además, desde su descubrimiento, se ha demostrado que los miRNA constituyen un nivel adicional de control epigenético, esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular y tisular.<sup>87</sup>

El interés clínico por los miRNA se vio notablemente reforzado con el descubrimiento de su presencia extracelular, siendo el plasma el primer fluido biológico en el cual se detectaron.<sup>223</sup> A diferencia de otros tipos de RNA, los miRNA circulantes presentan una elevada resistencia a la degradación por ribonucleasas, a variaciones extremas de pH y a ciclos repetidos de congelación y descongelación.<sup>224</sup> Esta estabilidad se explica mediante mecanismos de protección como su encapsulación en vesículas extracelulares (exosomas, microvesículas), su asociación a proteínas del complejo RISC, como Ago2, o su transporte unido a lipoproteínas de alta densidad.<sup>225</sup> Estas características, junto con la posibilidad de cuantificación mediante técnicas altamente sensibles como la RT-qPCR o la secuenciación masiva, convierten a los miRNA plasmáticos en potenciales biomarcadores no invasivos.<sup>226</sup>

En un escenario de ECV, la relevancia de los miRNA ha sido ampliamente documentada tanto en modelos experimentales como en estudios clínicos. Los miRNA desempeñan un papel fundamental en procesos clave como la aterogénesis, la disfunción endotelial, la angiogénesis, la hipertrofia miocárdica y la remodelación cardiaca patológica.<sup>227</sup> Está ampliamente demostrado que diferentes miRNA músculo-específicos como miR-1, miR-

133, miR-208 y miR-499 están implicados en la regulación del desarrollo y la función del cardiomiocito, y su liberación a la circulación tras daño miocárdico se ha asociado con el IAM, correlacionándose con el tamaño del infarto y el pronóstico clínico.<sup>228</sup> Otros miRNA, como miR-21, miR-126, miR-92a o miR-155, participan en la regulación de la inflamación vascular, la función endotelial y la estabilidad de la placa aterosclerótica.<sup>229</sup>

De manera paralela, el papel de los miRNA en la regulación de la respuesta inmune y su relación con enfermedades infecciosas también se está investigando. La respuesta del huésped frente a la infección está estrechamente regulada por redes de señalización intracelular en las que los miRNA desempeñan un papel modulador clave. Algunos miRNA como miR-146a, miR-155 y miR-223 regulan vías asociadas de TLR, factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, así como la producción de citocinas proinflamatorias, actuando como mecanismos de retroalimentación positiva o negativa para controlar la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria.<sup>230</sup> Así, en un escenario como la sepsis, una entidad clínica caracterizada por una respuesta inflamatoria sistémica desregulada y disfunción orgánica potencialmente mortal, se han descritos alteraciones en los perfiles de miRNA circulantes. Estudios clínicos han demostrado que niveles plasmáticos de miRNA como miR-146a, miR-223 o miR-150 se asocian con la gravedad de la enfermedad, el desarrollo de la disfunción multiorgánica y la mortalidad, sugiriendo su utilidad como biomarcadores pronósticos.<sup>231,232</sup> Finalmente, en un escenario de NAC, donde la estratificación precoz del riesgo continúa siendo un desafío clínico, se ha sugerido que determinados perfiles de miRNA plasmáticos se asocian con la gravedad clínica, la respuesta inflamatoria sistémica y la evolución desfavorable en estos pacientes. De hecho, existen estudios que han demostrado que algunos miRNA podrían incluso discriminar la etiología de la infección o identificar pacientes con mayor riesgo de desarrollar sepsis o ECV asociados a la infección.<sup>233,234</sup>

En conjunto, la evidencia acumulada respalda la hipótesis de que los miRNA plasmáticos representan una plataforma innovadora de biomarcadores con un elevado potencial traslacional en patología cardiovascular y enfermedades infecciosas graves como la NAC y la sepsis. La caracterización sistemática de sus perfiles de expresión, su validación en cohortes clínicas bien definidas y su integración con variables clínicas y analíticas tradicionales podrían contribuir de manera significativa a mejorar la estratificación del riesgo, optimizar la toma de decisiones terapéutica y avanzar hacia una medicina personalizada.

# Pacientes, Materiales y Métodos

## 2. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Pacientes

Para el estudio de miRNA plasmáticos se seleccionó una cohorte de descubrimiento de 29 pacientes (**cohorte 1**), incluyendo 15 MACE-30d y 14 NO MACE-4a. La cohorte de validación independiente incluyó 106 pacientes (41 MACE-30d y 65 NO MACE-30d), procedentes de las 3 cohortes estudiadas.

### 2.2. Aislamiento de miRNA

La purificación del RNA, incluidos los miRNA circulantes, se realizó a partir de muestras de plasma (EDTA) de pacientes con NAC utilizando el kit comercial NucleoSpin® miRNA Plasma (#740981.50, Macherey-Nagel, Düren, Alemania), según las recomendaciones del fabricante dependiendo del volumen de plasma de partida. El ensayo de descubrimiento se realizó en RNA purificado a partir de 250 µL de plasma, mientras que la validación se realizó en RNA obtenido a partir de 50 µL de plasma. La concentración de RNA de las muestras empleadas en la cohorte de descubrimiento se midió mediante el equipo Qubit® 4.0 Fluorometer, empleando los reactivos del kit de alta sensibilidad, RNA HS Assay (#Q32852, Invitrogen).

### 2.3. Secuenciación de miRNA plasmáticos

La secuenciación de los miRNA plasmáticos se realizó empleando la tecnología *Human Exosome small RNA-seq (WBI)* mediante una estrategia de secuenciación por síntesis (SE50, *single-end*, con longitud de lectura de 50pb) de la plataforma Illumina, a través de la compañía Novogene (Beijing, China). Este sistema de secuenciación ofreció una puntuación de calidad Phred (Q30) superior al 85%, y una profundidad de secuenciación de 20M (millones) de lecturas brutas sin procesar por muestra.

### 2.4. Análisis bioinformático

El análisis bioinformático de los archivos de secuenciación (miRNA-seq) consistió en un primer paso de control de calidad de las lecturas, filtrado por longitud para la selección de *small RNA*, mapeo contra el genoma de referencia (hg38), clasificación y cuantificación de *small RNA* [incluyendo miRNA conocidos, RNA ribosómico (rRNA), RNA de transferencia (tRNA), RNA nuclear pequeño (snRNA), RNA nucleolar pequeño (snoRNA)]. Para el cálculo de los niveles de expresión de los miRNA se utilizó el método

TPM (*Transcripts Per Million*). Se realizó una predicción de “*novel miRNA*” no descritos en bases de datos, con herramientas de predicción bioinformática], y finalmente un análisis de miRNA conocidos y nuevos (incluyó análisis de estructura secundaria para conocer el plegamiento del miRNA, análisis de “*base bias*”, predicción de “*target genes*” potencialmente regulados por los miRNA, expresión diferencial de los miRNA y *miRNA Editing/Family Analysis*).

### 2.5. RT-qPCR de miRNA plasmáticos

La transcripción inversa de miRNA plasmáticos se realizó con el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (#4374966, ThermoFisher, Madrid, España). Las especificaciones de la reacción de retrotranscripción y del programa del termociclador se especifican en la **Tabla 9**. Para la reacción de PCR de las muestras se utilizó el protocolo TaqMan™ Small RNA Assay (ThermoFisher) según las recomendaciones del fabricante, empleando el equipo Lightcycler® (Roche, Madrid, España). Las especificaciones de la reacción de PCR se especifican en la **Tabla 10**.

**Tabla 9. Programa del termociclador para la reacción de retrotranscripción (RT).**

Pasos Roche LightCycler®			Reacción de PCR	
		Nº ciclos	Reactivo	Volumen/reacción (µL)
Pre Read	30 s a 95°C		Premix Ex Taq; (#RR390 Takara)	2,5
PCR	3 s a 95°C	50x	Sonda (20x)	0,25
	20 s a 60°C		cDNA (Dilución 1:10)	2
Cooling	30 s a 40°C		Agua DEPC; (#AM9915G, Invitrogen)	0,25
				<b>Vf= 5 µL</b>

**Tabla 10. Programa para la reacción de PCR.**

Pasos termociclador		Reacción de RT		
		Reactivo	Volumen/reacción (µL)	
RT	30 min a 16°C	100 mM dNTPs (con dTTP)	0,15	
		MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL	1	
	30 min a 42°C	10X Reverse Transcription Buffer	1,5	
Rnase Inhibitor, 20 U/µL		0,2		
Parada	5 min a 85°C	Primers RT Taqman	1,5	
Hold	4°C	Plasma	6,15	
		Nuclease-free water	4,5	
				<b>Vf= 15 µL</b>

Se realizó un prueba para definir el volumen de plasma a utilizar para la validación empleando las siguientes sondas de miRNA: hsa-miR-16-5p (ID\_000391, ThermoFisher), hsa-miR-17-5p (ID\_002308, ThermoFisher), hsa-miR-92a-3p (ID\_000431, ThermoFisher) y hsa-miR-146a-5p (ID\_000468, ThermoFisher). Para la validación de los resultados obtenidos en el miRNA-seq se utilizaron las siguientes

sondas de miRNA: **hsa-miR-873-5p** (ID\_002356, ThermoFisher), **hsa-320a-3p** (ID\_002277, ThermoFisher), **hsa-miR-206** (ID\_000510, ThermoFisher), **hsa-miR-423-5p** (ID\_002340, ThermoFisher), **hsa-miR-744-5p** (ID\_002324, ThermoFisher), **hsa-miR-22-3p** (ID\_000398, ThermoFisher), **hsa-miR-370-3p** (ID\_002275, ThermoFisher).

La normalización de los niveles de expresión de los 7 miRNA de interés se realizó mediante los niveles de **hsa-miR-30d-3p** (ID\_000420, ThermoFisher) [ $\Delta Cq = Ct(miRNA-interés) - Ct(miR-30d)$ ], el cuál mostró buena estabilidad entre pacientes MACE-30d vs. NO MACE-30d (Ct 27,6 vs. 27,8;  $p=0,468$ ). Los niveles de expresión de miRNA, **hsa-miR-451a** (ID\_001141, ThermoFisher) y **hsa-miR-23a-3p** (ID\_000399, ThermoFisher) fueron utilizados para evaluar el grado de hemólisis de las muestras.<sup>235</sup>

El análisis de expresión de los 7 miRNA de interés en la cohorte de validación se realizó relativizando los niveles de cada miRNA al nivel de expresión del normalizador miR-30d-3p. El grado de hemólisis se determinó utilizando  $\Delta Cq(miR-23a - miR-451a)$  en base a lo reportado en la literatura.<sup>235</sup> Aquellas muestras con un  $\Delta Cq > 7$  fueron eliminadas del análisis posterior. Los programas usados para el análisis estadístico han sido *IBM SPSS Statistics 21* (Armonk, NY, EE. UU.) y *GraphPad Prism 9.0 Software, LLC* (San Diego, CA, EE. UU.).

## 2.6. Score clínico-biológico

El modelo predictor de MACE temprano se desarrolló a partir de variables clínicas y los niveles de expresión de miRNA mediante una análisis de regresión de Cox multivariable basado en riesgos proporcionales (HR). El modelado del *score* se realizó empleando los paquetes *pROC\_1.19.0.1* y *stats\_4.4.1* de RStudio 4.4.1.

## 2.7. Análisis estadístico

El análisis de expresión de los 7 miRNA de interés en la cohorte de validación se realizó relativizando los niveles de cada miRNA al nivel de expresión del normalizador miR-30d-3p. El grado de hemólisis se determinó utilizando  $\Delta Cq(miR-23a - miR-451a)$  en base a lo reportado en la literatura.<sup>235</sup> Aquellas muestras con un  $\Delta Cq > 7$  fueron eliminadas del análisis posterior. Los programas usados para el análisis estadístico han sido *IBM SPSS Statistics 21* (Armonk, NY, EE. UU.) y *GraphPad Prism 9.0 Software, LLC* (San Diego, CA, EE. UU.).

# **Resultados**

---

### 3. RESULTADOS

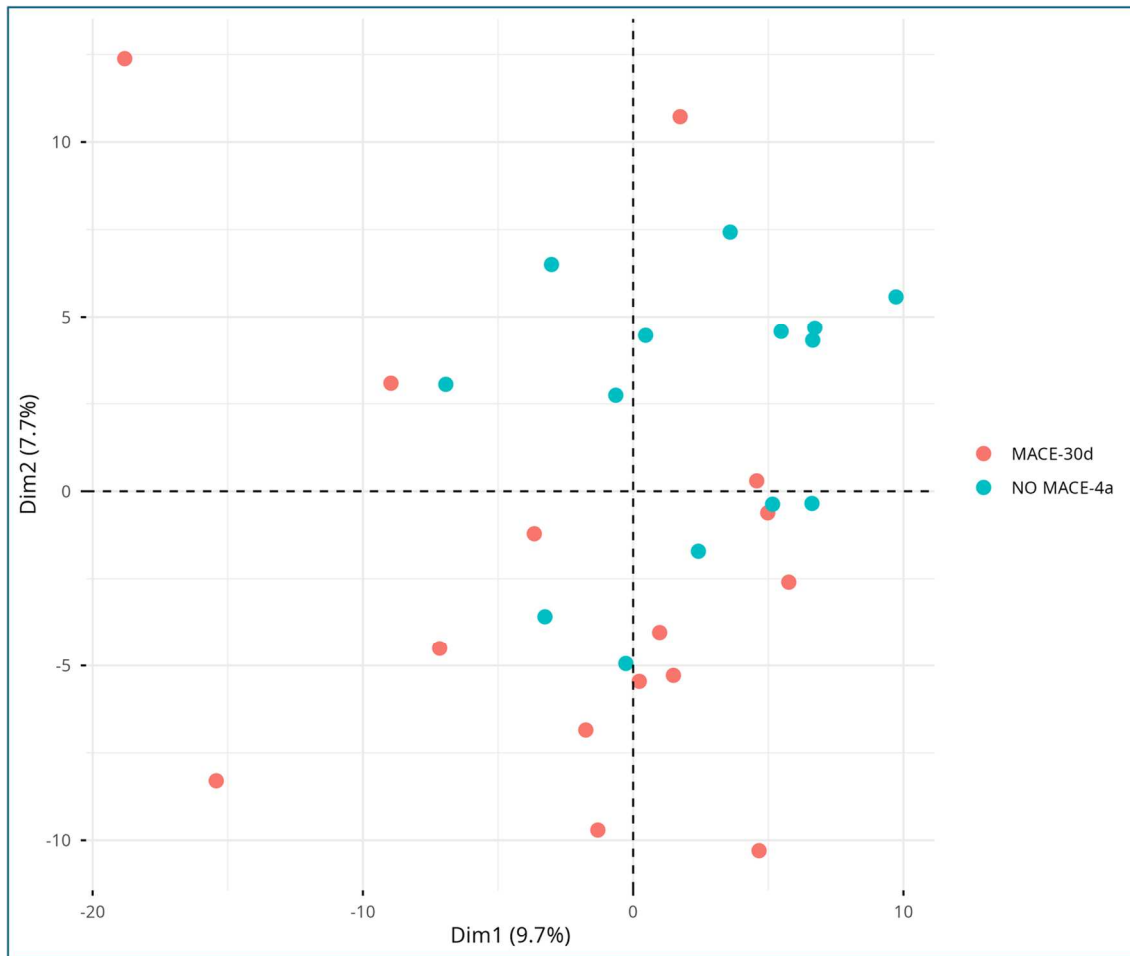
#### 3.1. Características clínicas y perfil de miRNA de la cohorte de descubrimiento

Las características clínicas y demográficas de la cohorte de descubrimiento se reflejan en la **Tabla 11**. El análisis de componentes principales (PCA) de los 29 pacientes estudiados en el miRNA-seq permitió de manera general definir las dos poblaciones estudiadas, MACE-30d y NO MACE-4a (**Figura 9**).

**Tabla 11. Características clínicas y demográficas en la cohorte de descubrimiento del miRNA-seq.**

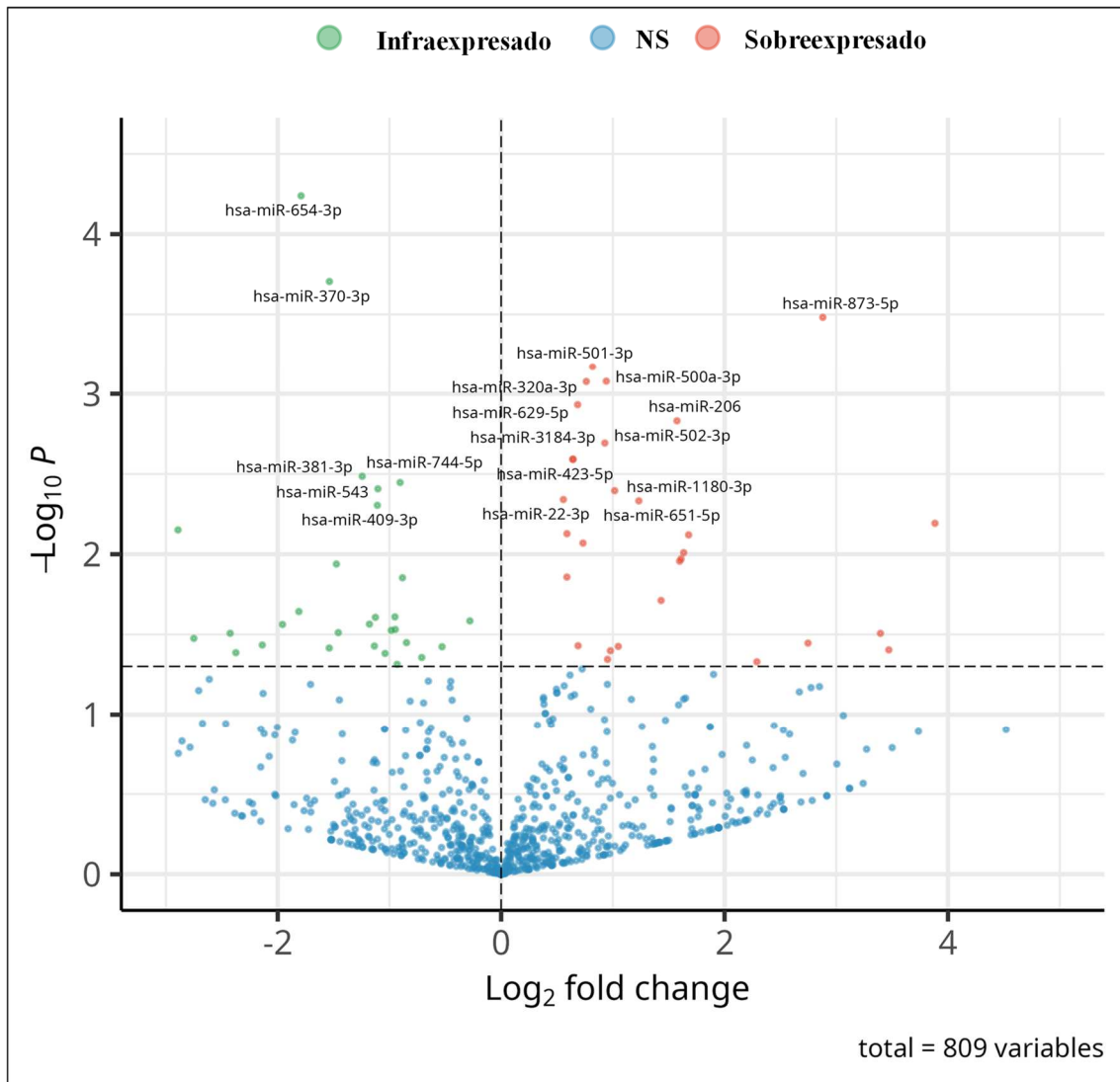
	Estudio piloto: miRNA-seq		p value
	MACE-30d (n=15)	NO MACE-4a (n=14)	
Edad (años), (mediana; RIQ)	85 (73-88)	82,5 (69-86,3)	0,246
Sexo, (hombre/mujer) (N)	10/5	7/7	0,462
Sepsis, N (%)	10 (66,7)	7 (50)	0,462
Obesidad, N (%)	7 (46,7)	6 (42,9)	>0,999
Cardiopatía crónica, N (%)	8 (53,3)	5 (35,7)	0,462
Dislipemia, N (%)	8 (53,3)	5 (35,7)	0,462
Diabetes mellitus, N (%)	8 (53,3)	3 (21,4)	0,128
Hipertensión arterial, N (%)	13 (86,7)	8 (57,1)	0,109
EPOC, N (%)	4 (26,7)	2 (14,3)	0,651
CCI $\geq$ 3, N (%)	2 (13,3)	3 (21,4)	0,651
PSI_FINE $\geq$ 4, N (%)	11 (73,3)	5 (35,7)	0,066
CURB-65 $\geq$ 3, N (%)	3 (20)	3 (21,4)	>0,999

Se seleccionaron 15 pacientes con MACE a 30 días (**MACE-30d**) frente a 14 pacientes sin MACE a 4 años (**NO MACE-4a**). Para el análisis estadístico entre ambos grupos se han empleado las pruebas, *t-test* y *Fisher's exact* dependiendo de la tipología de la variable. **RIQ**, Rango intercuartílico; **EPOC**, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; **CCI**, *Charlson Comorbidity Index*; **PSI**, *Pneumonia Severity Index*; **CURB-65**, Acrónimo de Confusión, Urea (BUN > 7 mmol/L), Frecuencia respiratoria ( $\geq$ 30/min), Presión arterial (sistólica <90 o diastólica  $\leq$ 60) y Edad ( $\geq$ 65).



**Figura 9. Análisis de componentes principales (PCA) de la cohorte del miRNA-seq.** Análisis PCA en la cohorte global de pacientes (N=29), 15 MACE-30d (representados en rojo) y 14 NO MACE-4a (representados en azul).

El análisis bioinformático del miRNA-seq en esta serie de pacientes, identificó 58 miRNA diferencialmente expresados entre ambos subgrupos (29 sobre- y 29 infraexpresados en los MACE-30d respecto a los NO MACE-4a, con un *p-value* no ajustado  $\leq 0,05$  (**Figura 10**). De estos 58 miRNA, 18 presentaron un *p-value* ajustado (FDR)  $< 0,1$ , y únicamente 3 miRNA presentaron un FDR  $< 0,05$ , 2 de ellos infraexpresados (miR-654-3p y miR-370-3p) y 1 sobreexpresado (miR-873-3p) en los MACE-30d respecto a los NO MACE-4a (**Tabla 12**) (**Figura 11**).



**Figura 10. Diagrama de dispersión *volcano plot* de la expresión de miRNA en la cohorte de descubrimiento del miRNA-seq.** Un total de 58 miRNA se encontraron diferencialmente expresadas entre MACE-30d vs. NO MACE-4a. Veintinueve sobreexpresados (representados en rojo) y 29 infraexpresados (representados en verde). Aquellos miRNA sin diferencias de expresión (NS) entre ambos grupos se representan en color azul. Aparecen etiquetados los 18 miRNA con un FDR <0,1 entre MACE-30d y NO MACE-4a.

CAPÍTULO II. Resultados

**Tabla 12. Listado de miRNA con FDR<0,1 derivados del análisis del miRNA-seq.**

miRNA	Fold change (FC)	log <sub>2</sub> (FC)	p-value	p-adj	cv	Media TPM (NO MACE-4a)	Media TPM (MACE-30d)
hsa-miR-654-3p	0,29	-1,790937654	0,000057677	0,020878951	1,0915429	54,5	15,6
hsa-miR-370-3p	0,34	-1,537089559	0,000197162	0,03568637	1,076443	70,4	24,1
hsa-miR-873-5p	7,36	2,879446632	0,000329716	0,039785772	1,6486827	1,3	10,2
hsa-miR-501-3p	1,76	0,818430221	0,000674641	0,050586438	0,5369782	145,2	255,8
hsa-miR-320a-3p	1,7	0,762361774	0,000838449	0,050586438	0,5544235	1216,5	2062,9
hsa-miR-500a-3p	1,92	0,941124244	0,000834681	0,050586438	0,5967963	22,5	43,4
hsa-miR-629-5p	1,61	0,684964185	0,001170357	0,060524185	0,4836989	244,1	392,2
hsa-miR-206	2,98	1,574089884	0,001474953	0,066741623	1,3034639	50,5	151,1
hsa-miR-502-3p	1,9	0,928172949	0,002029431	0,08162821	0,5950937	22,1	41,9
hsa-miR-423-5p	1,56	0,642427591	0,002561752	0,084304943	0,5251728	20159,1	31467,1
hsa-miR-3184-3p	1,56	0,642442581	0,002561188	0,084304943	0,5251768	20158,9	31467,1
hsa-miR-744-5p	0,53	-0,904475601	0,003574876	0,096981735	0,6334758	167,9	89,2
hsa-miR-1180-3p	2,02	1,016511486	0,00401858	0,096981735	0,8351435	75,4	152,1
hsa-miR-543	0,47	-1,10315199	0,003913414	0,096981735	0,8422759	178,5	83
hsa-miR-381-3p	0,42	-1,243801968	0,003270507	0,096981735	1,034579	74,4	31,7
hsa-miR-22-3p	1,47	0,556893426	0,004565897	0,099028858	0,4010342	4396,3	6468,8
hsa-miR-651-5p	2,35	1,232414822	0,004650526	0,099028858	0,7426904	13,3	31,5
hsa-miR-409-3p	0,46	-1,108053561	0,004957195	0,099694691	0,9149303	290,5	134,3

Se seleccionaron 18 miRNA diferencialmente expresados (FDR <0,1) entre pacientes con MACE a 30 días (**MACE-30d**) frente a 14 pacientes sin MACE a 4 años (**NO MACE-4a**). **p-adj**, p-value ajustado; **cv**, coeficiente de variación; **TPM**, transcripciones por millón.

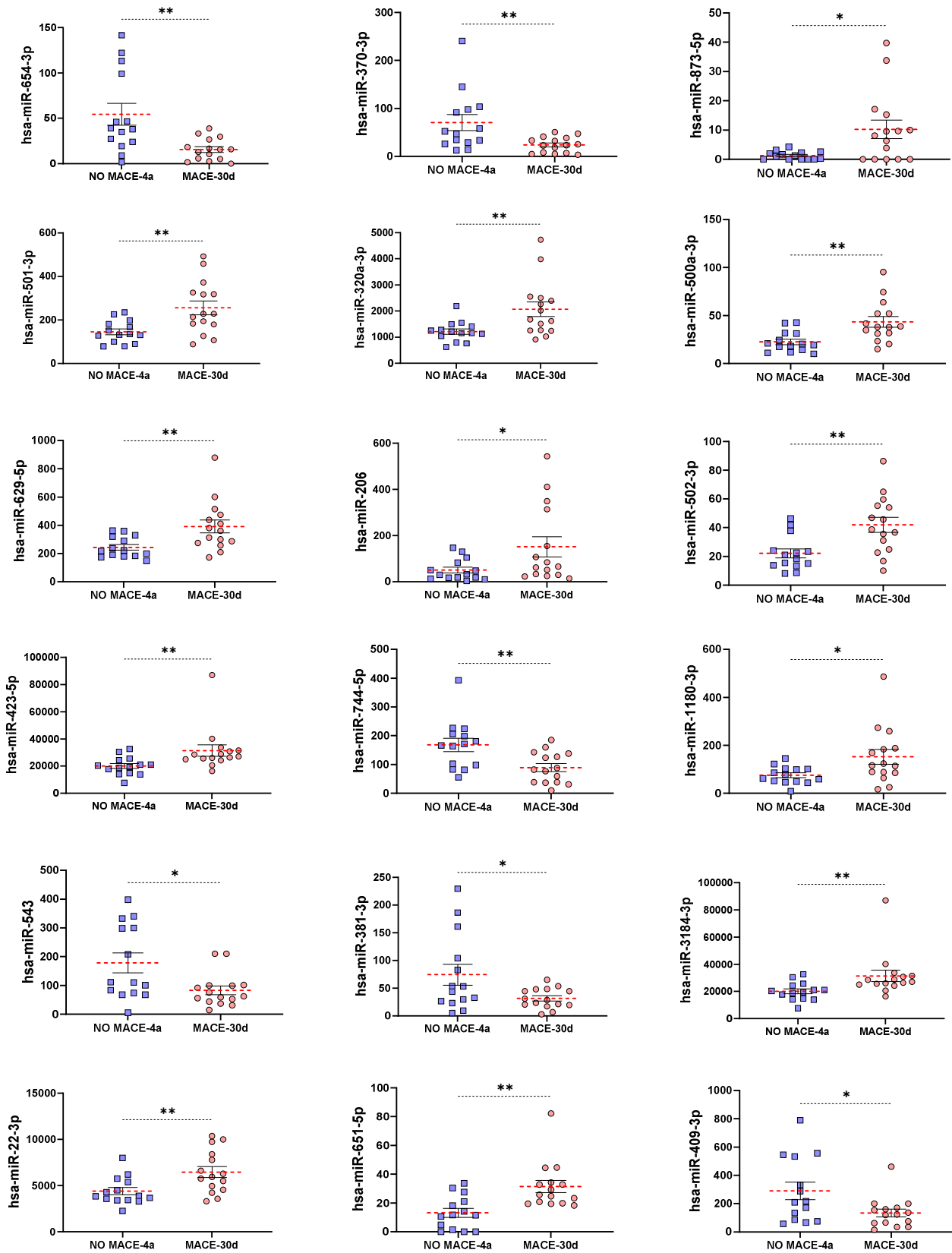


Figura 11. Niveles de expresión de los 18 miRNA con FDR <0,1 del miRNA-seq en la cohorte de descubrimiento. Se comparan 15 pacientes con MACE-30d respecto a 14 pacientes NO MACE-4a. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; (Mann-Whitney test).

### 3.2. Características clínicas y validación del miRNA-seq

Con el fin de validar parte de los miRNA diferencialmente expresados reflejados en la Tabla 12, seleccionamos una cohorte de 148 pacientes con NAC, 49 con MACE-30d y 99 NO MACE-30d, de las 3 cohortes de pacientes descritas anteriormente. La selección de esta cohorte se realizó en función del volumen mínimo de plasma disponible, con el objetivo de maximizar el número de muestras incluidas en la validación. Para ello, se evaluó si 50  $\mu$ L de plasma eran suficientes para la purificación de miRNA de baja, media, alta y muy alta expresión según los datos de miRNA-seq (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-146a-5p y hsa-miR-92a-3p), confirmando que dicho volumen permitía detectar incluso aquellos miRNA con baja expresión plasmática (**Tabla 13**).

**Tabla 13. Estudio de expresión de miRNA plasmáticos según volumen de muestra utilizado.**

	Volumen de plasma ( $\mu$ L)		Media TPM miRNA-seq
	300	50	
hsa-miR-17-5p	29,7	29,4	20
hsa-miR-16-5p	21,9	23,3	177
hsa-miR-144a-5p	27,9	29,6	997
hsa-miR-92a-3p	24,4	26,8	10315

Se realizó un prueba de expresión utilizando 50 y 300  $\mu$ L de plasma en 3 pacientes. Se representa la media de expresión (Ct) de los 4 miRNA analizados según el volumen de plasma utilizado; así como la media de expresión obtenida en el miRNA-seq para estos miRNA. **TPM**, transcripciones por millón.

A continuación, se seleccionaron 7 miRNA (miR-22-3p, miR-206, miR-320a-3p, miR-370-3p, miR-423-5p, miR-744-5p, miR-873-5p) para su validación, principalmente en función de la evidencia disponible en la bibliografía sobre su implicación en la patología cardiovascular o fold-change (FC), en el caso de miR-873-5p. Tras la medición de los 7 miRNA seleccionados, así como de miR-30d-3p, miR-23-3p y miR-451a en RNA plasmático, se analizó en primer lugar el índice de hemólisis para detectar en los análisis posteriores aquellas muestras con un grado de hemólisis  $\geq 7$ . Este análisis descartó 42 muestras potencialmente contaminadas con miRNA eritrocitario. Así, los resultados del miRNA-seq fueron validados finalmente en una cohorte de 106 pacientes con NAC, 41 con MACE-30d y 65 NO MACE-30d. Las características clínicas y demográficas de esta serie de pacientes se representan en la **Tabla 14**.

Los pacientes con MACE temprano, presentaron una mayor frecuencia de cardiopatía crónica (55 vs. 25,9%;  $p=0,006$ ), dislipemia (67,5 vs. 37,9%;  $p=0,007$ ), diabetes (50 vs. 15,3%;  $p<0,001$ ) y mayor puntuación en la escala CURB-65 (32,5 vs. 11,9%;  $p=0,020$ ), respecto al subgrupo de pacientes NO MACE-30d (Tabla 14).

**Tabla 14. Características clínicas y demográficas en la cohorte de validación.**

	COHORTE GLOBAL (N=106)	Cohorte validación		p value
		MACE-30d (n=41)	NO MACE-30d (n=65)	
Edad (años), (mediana; RIQ)	72 (63,5-80)	74 (68,5-80)	71 (55-80)	0,196
Sexo, (hombre/mujer) (N)	64/37	30/11	34/26	0,099
Obesidad, N (%)	38/67 (56,7)	20/31 (64,5)	18/36 (50)	0,323
Cardiopatía crónica, N (%)	37/98 (37,8)	22/40 (55)	15/58 (25,9)	<b>0,006</b>
Dislipemia, N (%)	49/98 (50)	27/40 (67,5)	22/58 (37,9)	<b>0,007</b>
Diabetes mellitus, N (%)	29/98 (29,6)	20/40 (50)	9/59 (15,3)	<b>&lt;0,001</b>
Hipertensión arterial, N (%)	61/101 (60,4)	29 (70,7)	32/60 (53,3)	0,099
EPOC, N (%)	24/98 (24,5)	13/40 (32,5)	11/58 (19)	0,154
CCI $\geq$ 3, N (%)	14/98 (14,3)	8/40 (20)	6/58 (10,3)	0,242
CURB-65 $\geq$ 3, N (%)	20/99 (20,2)	13/40 (32,5)	7/59 (11,9)	<b>0,020</b>

Se seleccionaron 41 pacientes con MACE a 30 días (**MACE-30d**) frente a 65 pacientes sin MACE a 30 días (**NO MACE-30d**). Para el análisis estadístico entre ambos grupos se han empleado las pruebas, *t-test* y *Fisher's exact* dependiendo de la tipología de la variable. **RIQ**, Rango intercuartílico; **EPOC**, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; **CCI**, *Charlson Comorbidity Index*; **PSI**, *Pneumonia Severity Index*; **CURB-65**, Acrónimo de Confusión, Urea (BUN > 7 mmol/L), Frecuencia respiratoria ( $\geq$ 30/min), Presión arterial (sistólica <90 o diastólica  $\leq$ 60) y Edad ( $\geq$ 65).

Los resultados de expresión de estos miRNA (FC respecto al normalizador miR-30d-3p) analizados por RT-qPCR, validaron 3 de los 7 miRNA de forma significativa. Los datos muestran en MACE-30d vs. NO MACE-30d: miR-206 (FC 0,66 vs. 0,28;  $p=0,003$ ), miR-320a (FC 7,65 vs. 5,33;  $p<0,0001$ ), miR-423 (FC 0,58 vs. 0,38;  $p=0,0001$ ). Los niveles de 2 miRNA con bajo nivel de expresión presentaron una tendencia a la significación estadística al comparar ambos subgrupos: miR-744 (0,068 vs. 0,064;  $p=0,062$ ) y miR-873 (0,06 vs. 0,02;  $p=0,054$ ). Finalmente, en esta cohorte de validación no encontramos diferencias significativas de expresión en los niveles de miR-22 (0,35 vs. 0,32;  $p=0,677$ ) y miR-370 (2,54 vs. 1,55;  $p=0,397$ ) (**Figura 12**).

De manera general, los resultados de expresión en la validación confirman la tendencia de los obtenidos por el miRNA-seq en la cohorte de descubrimiento, salvo en el caso de miR-370. Este miRNA se encontró infraexpresado en el miRNA-seq y sobreexpresado en la validación por PCR en los pacientes con MACE-30d respecto a los NO MACE-30d.

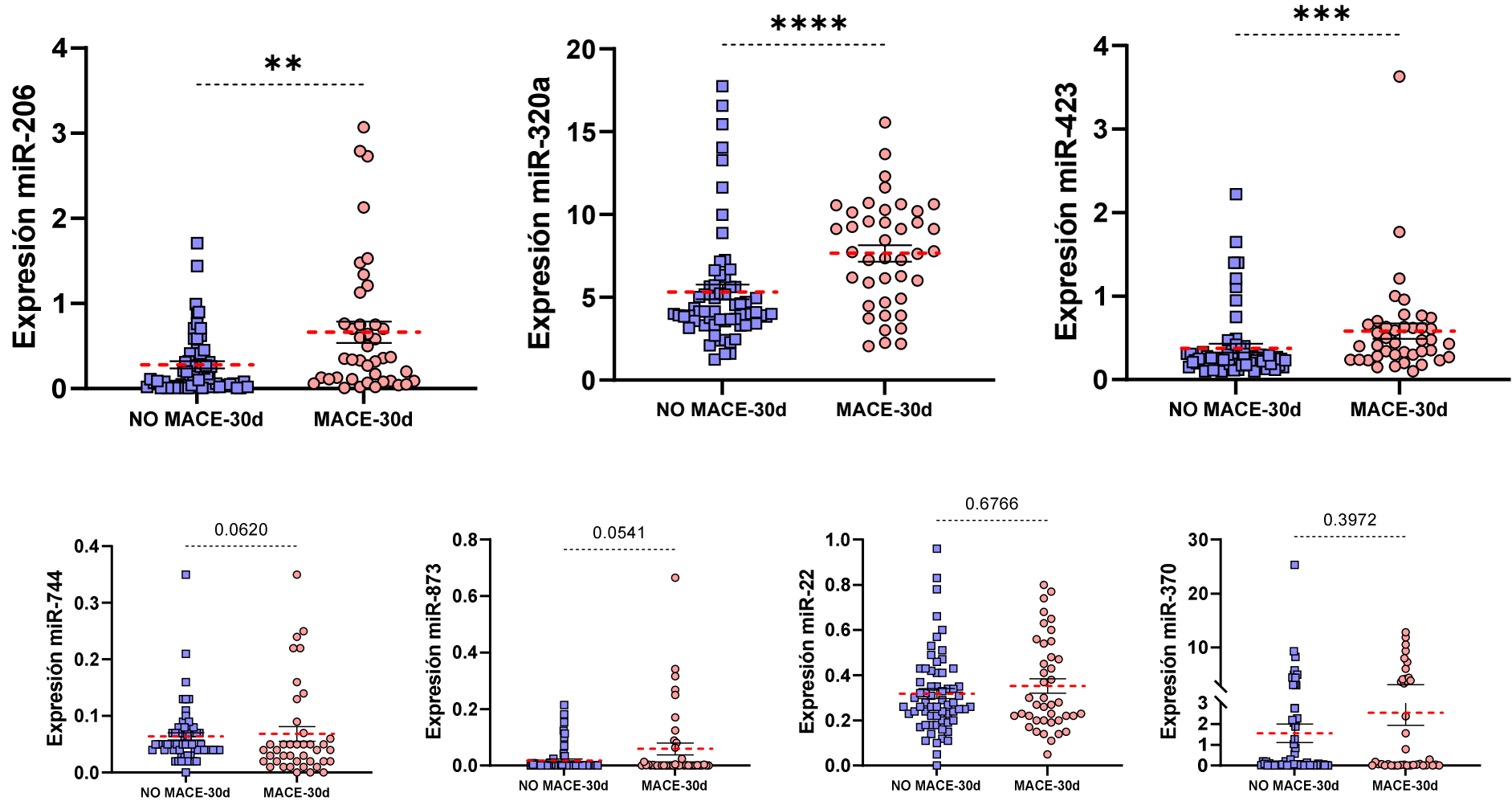
### 3.3. Perfil de miRNA y relación con el desarrollo de MACE

Una vez determinado el perfil de expresión diferencial de los 7 miRNA entre ambos subgrupos, enfrentamos los niveles de los respectivos miRNA al desarrollo de un MACE temprano en un modelo de curva ROC en la cohorte global de validación. La **Tabla 15** muestra los valores de FC de los niveles de expresión de los 7 miRNA en el grupo MACE-30d (n=41) respecto al grupo NO MACE-30d (n=65); así como los valores AUC obtenidos del modelo ROC. miR-320a con un FC de 1,4 fue el miRNA con mayor capacidad de predicción del MACE con un AUC de 0,755, seguido de miR-423 (AUC 0,745). Por su parte, miR-206 (FC 2,4) y miR-873 (FC 3,3) fueron los miRNA con mayor diferencia de expresión entre el grupo MACE-30d vs. NO MACE-30d (AUC 0,676 y 0,604, respectivamente).

**Tabla 15. miRNA sobreexpresados en pacientes MACE-30d vs. NO MACE-30d.**

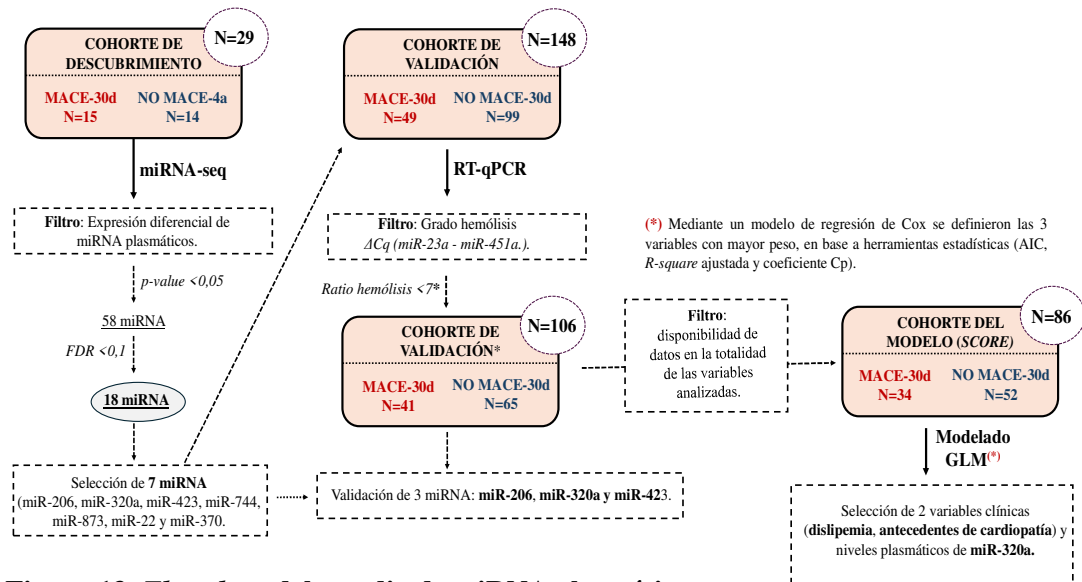
miRNA	p-value	FC	AUC
miR-22-3p	0,676	1,1	0,541
miR-206	<b>0,003</b>	2,4	0,676
miR-320a-3p	<b>&lt;0,001</b>	1,4	0,755
miR-370-3p	0,397	1,6	0,576
miR-423-5p	<b>&lt;0,001</b>	1,5	0,745
miR-744-5p	0,060	1,1	0,419
miR-873-5p	0,054	3,3	0,604

FC, *Fold change*; AUC, Área bajo la curva.



**Figura 12. Análisis de expresión de los miRNA seleccionados para la validación por PCR del miRNA-seq.** Se comparan 41 pacientes con MACE-30d respecto a 65 pacientes NO MACE-30d. Los niveles de expresión para cada miRNA se han calculado relativizando a los niveles del normalizador miR-30. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (Mann-Whitney test).

Para facilitar la comprensión de los filtros aplicados para el análisis de las diferentes cohortes estudiada a lo largo de los resultados de este capítulo, la **Figura 13** muestra un *flowchart* representativo del estudio de miRNA plasmáticos.



**Figura 13.** *Flowchart* del estudio de miRNA plasmáticos.

### 3.4. Score clínico-biológico predictor de MACE temprano

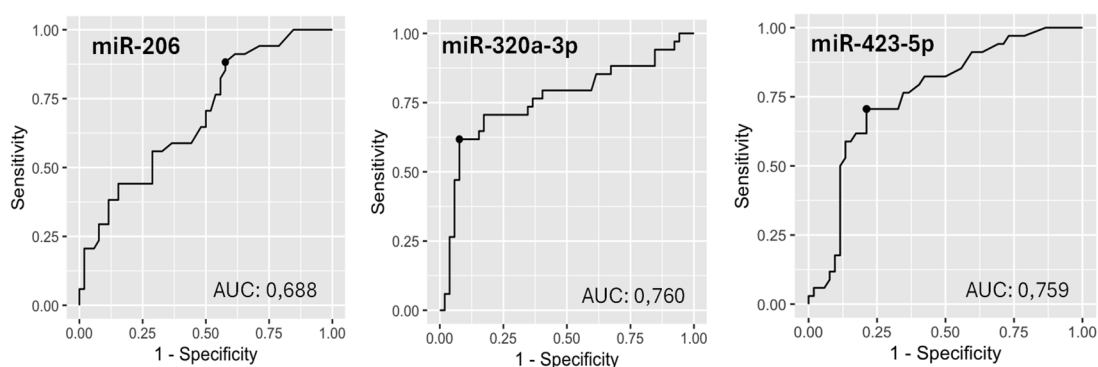
Con el fin de obtener un *score* basado en datos biológicos y clínicos que pudiera mejorar el pronóstico de MACE precoz en pacientes con NAC, se desarrolló un *score* incluyendo 86 pacientes procedentes del análisis de validación. Esta cohorte fue más reducida ya que para el modelado bioinformático era requisito que los pacientes incluidos presentaran datos en todas las variables analizadas. La **Tabla 16** muestra las características demográficas, clínicas y biológicas de este grupo de pacientes. Las variables dislipemia ( $p=0,009$ ), diabetes ( $p=0,001$ ), cardiopatía crónica ( $p=0,003$ ), CURB-65  $\geq 3$  ( $p=0,034$ ), creatina ( $p=0,001$ ) y recuento de neutrófilos ( $p=0,027$ ) presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo MACE-30d (n=34) y NO MACE-30d (n=52). Los niveles de miR-206 ( $p=0,003$ ), miR-320a ( $p<0,001$ ), y miR-423 ( $p=0,026$ ) fueron estadísticamente superiores en el grupo MACE-30d.

Cuando enfrentamos los niveles de esto 3 miRNA estudiados en la cohorte de validación al desarrollo de un MACE temprano a 30 días, en un análisis de curva ROC, se observó que miR-320a (AUC 0,760) y miR-423 (AUC 0,759) tuvieron la mejor capacidad predictiva para el pronóstico de MACE  $\leq 30$  días. Los niveles plasmáticos de miR-206 no se usaron para los análisis posteriores que ya su AUC fue inferior a 0,7 (**Figura 14**).

**Tabla 16. Características clínicas y demográficas de la cohorte de desarrollo del score clínico-biológico.**

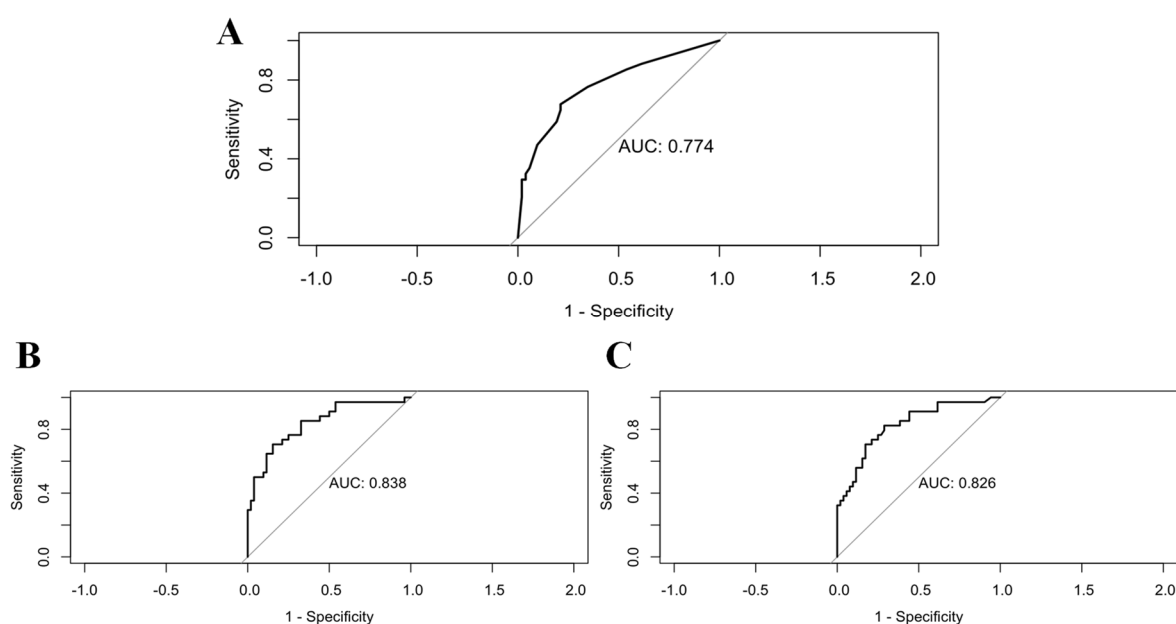
	Cohorte score clínico-biológico			p-value
	COHORTE GLOBAL N=86	NO MACE-30d n=52	MACE-30d n=34	
Edad (años), (media±SD)	68,8 ± 15,5	66,5 ± 17,4	72,4 ± 11,4	0,081
Sexo, N (mujer) (%)	33 (38,4)	22 (42,3)	11 (32,4)	0,483
Dislipemia, N (%)	42 (48,8)	19 (36,5)	23 (67,6)	<b>0,009</b>
Diabetes mellitus, N (%)	23 (26,7)	7 (13,5)	16 (47,1)	<b>0,001</b>
Cardiopatía crónica, N (%)	33 (38,4)	13 (25,0)	20 (58,8)	<b>0,003</b>
Hipertensión arterial, N (%)	50 (58,1)	26 (50,0)	24 (70,6)	0,095
EPOC, N (%)	20 (23,3)	9 (17,3)	11 (32,4)	0,176
CURB-65 ≥3, N (%)	19 (22,1)	7 (13,5)	12 (35,3)	<b>0,034</b>
CCI ≥3, N (%)	9 (10,5)	3 (5,8)	6 (17,6)	0,162
Creatina (mg/dL)	1,17	0,98	1,46	<b>0,001</b>
PCR (mg/dL)	20,7	19,1	23,1	0,154
Sodio (mEq/L)	136,8	136,9	136,6	0,670
Hematocrito (%)	38,4	37,9	39,2	0,280
Leucocitos (× 10 <sup>3</sup> /μL)	14,89	15,56	13,86	0,250
Neutrófilos (× 10 <sup>3</sup> /μL)	10,53	11,53	9,01	<b>0,027</b>
Linfocitos (× 10 <sup>3</sup> /μL)	11,8	12,9	10,2	0,117
Plaquetas (× 10 <sup>3</sup> /μL)	278,9	292,1	258,8	0,156
miR-206 (media FC±SD)	0,39 ± 0,50	0,26 ± 0,33	0,58 ± 0,65	<b>0,003</b>
miR-320a (media FC±SD)	5,87 ± 3,19	4,72 ± 2,57	7,64 ± 3,28	<b>&lt;0,001</b>
miR-423 (media FC±SD)	0,47 ± 0,52	0,37 ± 0,41	0,62 ± 0,62	<b>0,026</b>

Se seleccionó una cohorte global de 86 pacientes, 34 con MACE a 30 días (**MACE-30d**) frente a 52 sin MACE a 30 días (**NO MACE-30d**). Para el análisis estadístico entre ambos grupos se han empleado las pruebas, *t-test* y *Fisher's exact* dependiendo de la tipología de la variable. **SD**, Desviación estándar; **EPOC**, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; **CCI**, *Charlson Comorbidity Index*; **PSI**, *Pneumonia Severity Index*; **CURB-65**, Acrónimo de Confusión, Urea (BUN > 7 mmol/L), Frecuencia respiratoria (≥30/min), Presión arterial (sistólica <90 o diastólica ≤60) y Edad (≥65); **PCR**, Proteína C reactiva; **FC**, Fold change.



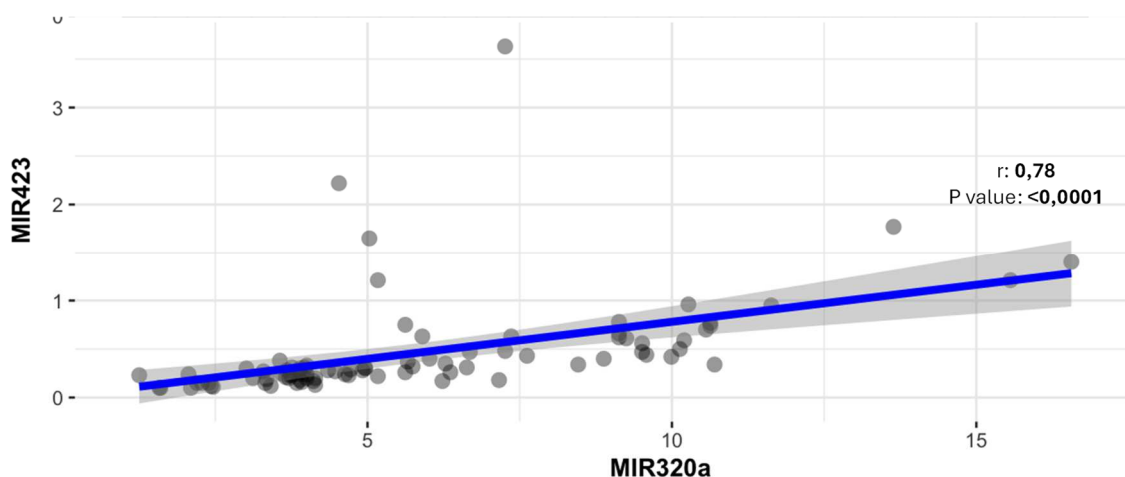
**Figura 14. Modelos ROC de los niveles plasmáticos de miRNA enfrentados al desarrollo de MACE temprano.** Se representan las AUC para los 3 miRNA analizados en la cohorte del score clínico-biológico (N=86): **miR-206** (0,688), **miR-320a-3p** (0,760) y **miR-423-5p** (0,759).

El modelo clínico incluyendo 4 variables (dislipemia, diabetes, cardiopatía crónica y CURB-65  $\geq 3$ ) ofreció un AUC de 0,774 (**Figura 15A**). La adición de los niveles plasmáticos de miR-320a (AUC: 0,838) y miR-423 (AUC: 0,826) mejoró significativamente el poder predictivo del modelo clínico (**Figura 15B-C**). Por su parte, la incorporación de los niveles combinados de ambos miRNA no mejoró el poder predictor del modelo, respecto a cada miRNA individual.



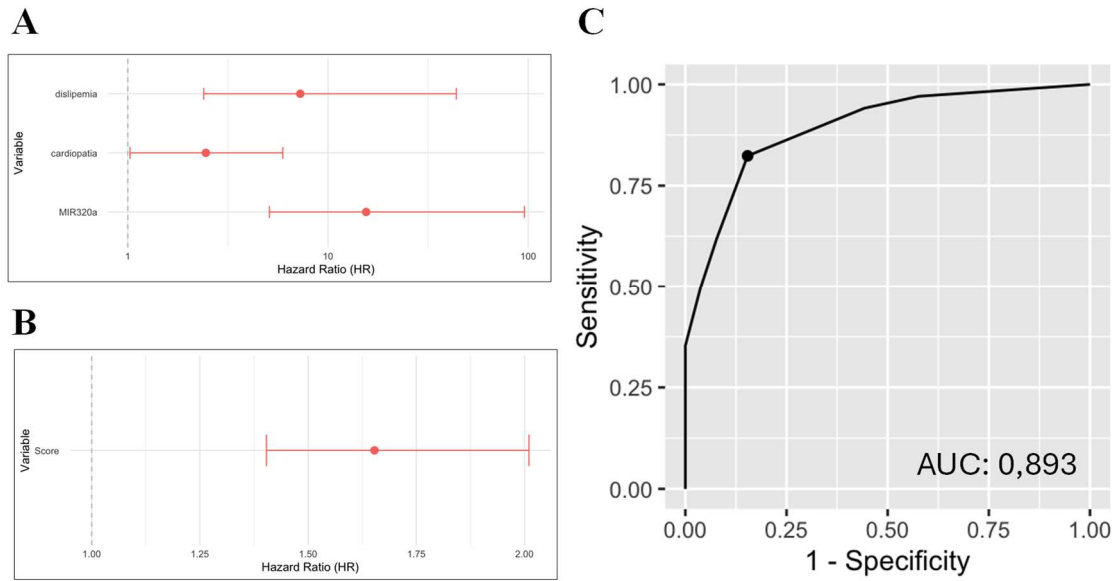
**Figura 15. Análisis de curva ROC relativo al MACE temprano.** (A) modelo clínico con las variables dislipemia, diabetes, cardiopatía crónica y CURB-65  $\geq 3$ , (B) modelo clínico adicionando los niveles plasmáticos de miR-320a, (C) modelo clínico adicionando los niveles plasmáticos de miR-423. AUC, área bajo la curva.

El análisis de correlación de los niveles plasmáticos de miR-423 y miR-320a mostró una correlación positiva estadísticamente significativa ( $r=0,78$ ,  $p < 0,0001$ ) (**Figura 16**), por lo que para el desarrollo del *score* se decidió incluir únicamente los niveles de miR-320a, con el fin de evitar la multicolinealidad en los coeficientes del modelo de regresión.



**Figura 16. Correlación de los niveles plasmáticos de miR-423 y miR-320a.** Se representan los valores de ambos miRNA en los 86 pacientes de la cohorte del modelado del *score* predictor de MACE. El nivel de asociación entre ambos miRNA se ha calculado con el coeficiente de correlación de *Spearman* dada la distribución no paramétrica de las muestras.

Mediante un modelo de regresión de Cox se definieron 3 variables con mayor peso en el desarrollo de MACE  $\leq 30$  días, en base a herramientas estadísticas como AIC (Criterio de Información de Akaike), *R-square* ajustada y coeficiente Cp que nos definen el número óptimo de variables a incluir en el modelo evitando el sobreajuste. Las 3 variables incluidas en el modelo predictor de MACE (modelo lineal generalizado, GLM) fueron, antecedentes de cardiopatía (HR 2,45; IC 95% 1,02-5,95), dislipemia (HR 7,26; IC 95% 2,39-43,7) y niveles plasmáticos de miR-320a ( $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 7,3$ ) (HR 15,5; IC 95% 5,10-95,7) (**Figura 17A**). Se definió un *score* predictivo utilizando el IC95% inferior de los HR de cada variable relacionada con MACE: cardiopatía crónica (1 punto), dislipemia (2 puntos) y niveles plasmáticos de miR-320a  $\geq 7,3$  (5 puntos). Los pacientes con un *score*  $\geq 3$  puntos presentaron un riesgo del 65% (HR 1.65) de desarrollar un MACE dentro de los primeros 30 días del ingreso por NAC (**Figura 17B**), con un fuerte rendimiento predictivo del modelo (AUC 0,893; precisión del 82,4%) (**Figura 17C**).



**Figura 17. Modelo GLM predictor de MACE temprano.** (A) Análisis de riesgos proporcionales de las 3 variables incluidas en el modelo: dislipemia (HR 7,26), cardiopatía crónica (HR 2,45) y niveles plasmáticos de miR-320  $\geq 7,3$  (HR 15,5). (B) Análisis de riesgos proporcionales del *score* predictivo (1,65 HR). (C) Análisis de curva ROC del *score* predictor (AUC 0,893). **GLM**, modelo lineal generalizado; **AUC**, área bajo la curva.

## **Discusión**

---

#### **4. DISCUSIÓN**

El presente capítulo aporta evidencia relevante sobre el potencial papel de los miRNA plasmáticos como biomarcadores predictores de MACE en pacientes con NAC. En un contexto clínico caracterizado por una elevada heterogeneidad en la evolución de los pacientes y por la limitada, y a veces escasa, capacidad de los marcadores tradicionales para predecir complicaciones cardiovasculares, los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de que los miRNA circulantes reflejan de manera temprana procesos fisiopatológicos clave, como la inflamación sistémica, el estrés endotelial y la disfunción cardiovascular. En este escenario, la identificación de perfiles específicos de miRNA asociados a ECV no solo contribuye a una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes que vinculan la NAC con un mayor riesgo cardiovascular, sino que también abre nuevas perspectivas para la estratificación pronóstica y el desarrollo de herramientas diagnósticas más precisas en el ámbito clínico.

Mediante técnicas altamente sensibles y específicas como la secuenciación y la validación posterior de resultados mediante RT-qPCR, hemos definido un perfil de miRNA plasmáticos en pacientes con NAC y MACE temprano asociado. Mediante una aproximación de miRNA-seq hemos identificado un listado de 18 miRNA diferencialmente expresados en nuestra cohorte de descubrimiento. La validación posterior, de 7 miRNA seleccionados reveló niveles aumentados de miR-206, miR-320a y miR-423 en plasma de pacientes con MACE-30d, postulándolos como prometedores miRNA circulantes asociados a disfunción cardiovascular en pacientes con infección.

Una de las principales limitaciones del estudio es el limitado tamaño muestral de la cohorte final de validación, debido a la eliminación de muestras tras aplicar el filtro de hemólisis. Está documentado que la hemólisis constituye una de las principales limitaciones preanalíticas en la búsqueda y cuantificación de miRNA plasmáticos, ya que la rotura de eritrocitos libera grandes cantidades de miRNA intracelulares, como miR-16 y miR-451a, sobreestimando su concentración en plasma y enmascarando cambios biológicamente relevantes asociados a la enfermedad.<sup>236,237</sup> Entre las causas más frecuentes de la hemólisis predominan las preanalíticas como una venopunción traumática, el uso de agujas de calibre inadecuado, agitación excesiva de la muestra de sangre, tiempos prolongados antes de la centrifugación para la obtención del plasma o almacenamiento inadecuado de la muestra.<sup>238</sup> Por su parte, la reducción del tamaño

muestral y el volumen plasmático de partida para el estudio, han podido limitar la validación de otros potenciales miRNA como miR-744 o miR-873, ya que en nuestros pacientes con NAC, los niveles de expresión en plasma de miR-744 son bajos, encontrándose aún más reducidos en los casos con MACE-30d. Los niveles de miR-744 se han encontrado reducidos en pacientes con IC, correlacionándose con marcadores de fibrosis y deterioro de la función ventricular.<sup>239</sup> Además, en un contexto infeccioso como en la lesión pulmonar aguda inducida por sepsis se ha reportado que los niveles de miR-744-5p disminuyen tanto *in vivo* como *in vitro*.<sup>240</sup>

Existe evidencia reportada de la implicación de los 3 miRNA validados en nuestra cohorte en un escenario cardiovascular. miR-206, destaca por ser un miRNA altamente conservado evolutivamente, con expresión predominante en músculo esquelético.<sup>241</sup> Uno de los primeros estudios que relacionaron el miR-206 con el tejido miocárdico reveló niveles aumentados de expresión de miR-1 y miR-206 en un modelo de IM en ratas.<sup>242</sup> En cuanto a su papel como biomarcador, existe evidencia que sugiere que en condiciones de estrés cardiaco o inflamatorio, como en la miocardiopatía inflamatoria, los niveles de este miRNA se encuentran elevados; mostrando un rendimiento diagnóstico en el análisis de curva ROC superior a biomarcadores clásicos como TnT y NT-proBNP.<sup>243</sup> Por su parte, un estudio reciente reportó que niveles plasmáticos de miR-206 se asociaron con un mayor riesgo de recurrencia temprana de FA tras ablación con catéter.<sup>244</sup> En un escenario de inflamación e infección se ha informado que miR-206 protegió a los cardiomiocitos murinos tras la exposición a LPS al actuar sobre la vía de señalización Usp33/Jak2/Stat3.<sup>245</sup> En pacientes sépticos, la expresión sérica de miR-206 se correlacionó positivamente con la gravedad y pronóstico de la sepsis (SOFA y APACHE-II).<sup>246</sup>

Por su parte, miR-320a es un miRNA expresado en una gran diversidad de tejidos y reconocido por su papel regulador en procesos como el metabolismo celular, la respuesta inflamatoria, la apoptosis y la función endotelial.<sup>247</sup> En el contexto cardiovascular, un estudio con pacientes con IAM con elevación del segmento ST (STEMI), encontró que los niveles circulantes de miR-320a estaban aumentados en aquellos pacientes que presentaron remodelado ventricular adverso tras la intervención coronaria, sugiriendo el uso de los niveles de este miRNA como biomarcador pronóstico asociado con evolución cardiaca post-infarto.<sup>248</sup> A su vez, los niveles plasmáticos combinados de miR-26b-5p, miR-320a y miR-660-5p en pacientes con STEMI permitieron discriminar aquellos que

desarrollaron un MACE posterior, (AUC 0,718), aumentando la predicción del riesgo al incorporarse a la puntuación GRACE.<sup>249</sup> Niveles séricos aumentados de este miRNA también se han reportado en un escenario IC crónica y de FA paroxística.<sup>250,251</sup> Estos hallazgos posicionan al miR-320a como un mediador clave en la intersección entre inflamación, disfunción vascular y MACE, apoyando su potencial utilidad como biomarcador pronóstico en escenarios clínicos caracterizados por estrés sistémico e inflamación aguda. Hay que destacar que los estudios que analizan el papel de miR-320a en un escenario de infección sistémica son escasos y con baja evidencia clínica.<sup>252</sup>

Finalmente, en cuanto al papel como biomarcador de miR-423, se ha informado de niveles circulantes elevados de miR-423-5p en pacientes con IC.<sup>253</sup> De manera contraria, en pacientes con IC aguda, bajos niveles circulantes de miR-423 al ingreso se asociaron con un pronóstico desfavorable a largo plazo.<sup>254</sup> En pacientes con enfermedad coronaria, miR-423-5p alteró su expresión en plasma y en PBMC tras un IM, con capacidad de distinguir entre enfermedad estable y estado post-infarto, postulándolo como un potencial biomarcador de estratificación del riesgo.<sup>255</sup> Estudios clínicos en pacientes críticos sépticos han mostrado que los niveles plasmáticos de miR-423-5p se encuentran elevados durante la sepsis, correlacionados con marcadores inflamatorios como IL-6 y PCT, así como con indicadores de disfunción orgánica como lesión renal aguda, en pacientes tratados con antibióticos no nefrotóxicos.<sup>256</sup>

Estos hallazgos apoyan los resultados de nuestro estudio, mostrando que los niveles plasmáticos aumentados de miR-206, miR-320a y miR-423 podrían usarse como biomarcadores para el diagnóstico precoz de MACE en pacientes con NAC.

En nuestra cohorte de pacientes con NAC, el desarrollo de un *score* clínico-biológico nos ha permitido integrar los niveles plasmáticos de miR-320a, a variables clínicas como diabetes o antecedentes de cardiopatía, mejorando el poder predictor de MACE del modelo clínico, identificando a aquellos pacientes de alto riesgo. En un escenario de NAC, la incorporación de los niveles plasmáticos de miRNA a los modelos pronósticos clínicos clásicos ha permitido la mejora en la estratificación del riesgo y predicción de eventos adversos en estos pacientes. Estudios prospectivos han demostrado que los niveles circulantes elevados de miR-146a-5p y miR-16-5p se asocian de forma independiente con una menor mortalidad a 30 días en NAC y que su integración en modelos multivariados mejoró el AUC de las escalas pronósticas PSI y CURB-65.<sup>257</sup>

Pese a que los niveles plasmáticos de miR-423 mostraron buena capacidad predictora de MACE en nuestra cohorte, su incorporación a los niveles de miR-320a y a las variables clínicas seleccionadas, no aportó una mejora significativa del modelo. Dada la correlación positiva observada entre los niveles de ambos miRNA en nuestros pacientes, podríamos justificar que la adición de los niveles de miR-423 no proporcione una mejora del *score*, pese a no existir una evidencia reportada que demuestre una correlación positiva directa en los niveles circulantes de ambos miRNA; aunque se ha informado de una puntuación basada en los niveles de miR-423-5p, miR-320a, miR-22 y miR-92b con capacidad diagnóstica en pacientes con IC sistólica, correlacionándose con parámetros pronósticos clínicos.<sup>258</sup>

Es importante destacar que el número de pacientes con el que se ha desarrollado el *score* es escaso, siendo primordial la validación de este en una cohorte mayor de pacientes con NAC. Esto nos permitirá a su vez, buscar asociaciones robustas respecto a los niveles de expresión de los miRNA con variables clínicas, así como intentar validar el resto de miRNA de interés encontrados en el análisis de secuenciación.

En base a estas evidencias, un enfoque clínico-molecular que combine biomarcadores circulantes, como miRNA, con *scores* pronósticos validados o variables clínicas de fácil acceso podría ofrecer una herramienta robusta con capacidad de perfilar aquellos pacientes que podrían beneficiarse de estrategias preventivas específicas frente a complicaciones cardiovasculares o mortalidad temprana en pacientes con NAC.

## **CAPÍTULO III.**

Estudio de las alteraciones del proteoma circulante como indicador del riesgo cardiovascular en NAC.

# **Introducción**

## 1. INTRODUCCIÓN

Tal como se ha indicado anteriormente, la NAC se asocia con una respuesta inflamatoria sistémica que puede desencadenar complicaciones cardiovasculares agudas a corto y largo plazo. Esta interrelación fisiopatológica entre la infección y la disfunción cardiovascular subraya la necesidad de herramientas diagnósticas más precisas que permitan estratificar el riesgo clínico y monitorizar la evolución de estos procesos.

En este contexto, la proteómica ha emergido como una herramienta clave para la identificación de biomarcadores plasmáticos con potencial diagnóstico, pronóstico y terapéutico. Dada la heterogeneidad biológica inherente tanto de la ECV como de las infecciones como la NAC es difícil la identificación de marcadores únicos y precisos. Esto ha orientado este tipo de aproximaciones en investigación hacia paneles de biomarcadores y enfoques integrativos que consideren redes proteicas y rutas metabólicas alteradas.<sup>259,260</sup>

Existen evidencias robustas del empleo de técnicas de proteómica para la identificación de biomarcadores en un contexto cardiovascular. Mediante un enfoque de MS dirigido se identificó un panel de 4 proteínas plasmáticas sobreexpresadas en pacientes con IC en relación con la gravedad de la enfermedad y la disfunción pulmonar.<sup>259</sup> El empleo de cromatografía líquida bidimensional acoplada a MS en tándem de alta definición permitió identificar y cuantificar más de 3000 proteínas, identificando un perfil desregulado de proteína definiendo un subgrupo de pacientes con IC de mal pronóstico. Además, el análisis de enriquecimiento de ontología génica y las redes de interacción proteína-proteína, reveló que este grupo de proteínas se relacionaron con el metabolismo del glutatión, la arginina, la prolina y el piruvato, mostrando que la desregulación metabólica influyó en un pronóstico desfavorable en estos pacientes.<sup>261,262</sup>

Mediante el uso de una plataforma proteómica basada en aptámeros de DNA de alto rendimiento se definió un panel de 6 proteínas asociadas con IC incidente, 3 con mayor riesgo (NT-proBNP, TSP2 y MBL) y 3 con menor riesgo (ERB1, GDF-11/8 y RGMC), como predictores del remodelado cardiaco.<sup>262</sup> Por su parte, la integración de los resultados de proteómica de un estudio de cohorte prospectivo multicéntrico en 389 pacientes con miocardiopatía hipertrófica a un modelo de *machine learning* (*random forest*) permitió predecir el empeoramiento de la IC con un AUC de 0,87. A su vez, el análisis de vías del panel de 11 proteínas, reveló que la vía RAS-MAPK se encontraba desregulada en este

subgrupo de pacientes de mal pronóstico.<sup>263</sup> Se ha estudiado el papel que juega el interferón  $\alpha$ -5 en la remodelación concéntrica previa a la IC con fracción de eyección preservada (IC-FEp), observándose que niveles circulantes elevados de esta proteína se asociaron con un mayor grosor parietal relativo solo en mujeres, revelando una mayor activación de las vías inflamatorias según el sexo, e identificando una potencial diana terapéutica en la prevención y tratamiento de la patología.<sup>264</sup>

El análisis de 742 proteínas mediante un enfoque proteómico basado en anticuerpos (ensayo de extensión por proximidad, PEA) en 826 participantes varones libres de ECV a los 70 años, identificó a 3 proteínas plasmáticas (GDF15, WFDC2 y KIM1) como nuevos marcadores de riesgo de ECV (IM, IC y accidente cerebrovascular).<sup>265</sup> El estudio de biomarcadores plasmáticos de IC de nueva aparición en 3 cohortes independientes (HOMAGE, ARIC y FHS) definió un perfil multiproteico que unido a los factores de riesgo clínicos mejoraba la predicción de IC incidente. El análisis de redes complejas reveló una sobrerrepresentación de vías relacionadas con la inflamación y la remodelación.<sup>266</sup> El análisis proteómico de alto rendimiento PEA en la disfunción microvascular coronaria asociada a la IC-FEp reveló correlatos proteómicos específicos del sexo, con mayor papel de la inflamación en hombres y un mayor remodelado ventricular y fibrosis en mujeres.<sup>267</sup> El desarrollo de una escala de riesgo proteómico plasmático para analizar la supervivencia en pacientes con IC-FE reducida mejoró las métricas de estratificación de riesgo, asociándose con la mortalidad cardiovascular y los fenotipos de IC.<sup>268</sup> Finalmente, el análisis de clústeres no supervisado con 363 biomarcadores en 429 pacientes con IC-FEp definió cuatro subgrupos mutuamente excluyentes de pacientes con perfiles de biomarcadores, características y resultados clínicos diferentes, siendo los grupos 1 y 4 aquellos con mayor incidencia de fallecimiento u hospitalización por IC.<sup>269</sup>

En un escenario de NAC, estudios basados en plataformas multiplexadas como la tecnología Olink<sup>®</sup>, han proporcionado un mapa exhaustivo del proteoma plasmático, analizando 2676 proteínas y demostrando que firmas proteómicas específicas se asocian con mecanismos fisiopatológicos clave, la evolución clínica y el riesgo a largo plazo (10 años) tras la NAC.<sup>270</sup> De forma complementaria, enfoques de MS no dirigida, han identificado conjuntos de proteínas diferencialmente expresadas entre pacientes con NAC y controles, incluyendo proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria, la inmunidad innata y el daño tisular, con potencial valor diagnóstico y pronóstico.<sup>271</sup> Otros estudios

han adoptado estrategias multiómicas, integrando proteómica con metabolómica y lipidómica, permitiendo discriminar entre etiologías virales y bacterianas de la NAC y asociar perfiles moleculares específicos con la gravedad de la enfermedad (puntuación SOFA).<sup>272,273</sup> Asimismo, el análisis combinado de proteómica plasmática y celular (neutrófilos) ha puesto de manifiesto la implicación de diversos procesos biológicos, como el metabolismo energético, la traducción proteica y la activación inmune, en la evolución clínica de los pacientes con NAC.<sup>274</sup>

A pesar de estas evidencias y de los avances metodológicos, persisten importantes desafíos para la implementación clínica de biomarcadores proteómicos. Limitaciones como la variabilidad biológica entre pacientes, la estandarización de protocolos analíticos, la validación independiente en grandes cohortes, y la integración de datos proteómicos con otras ómicas y variables clínicas, siguen suponiendo un reto para el uso de biomarcadores en un escenario cardiovascular o de infección como la NAC. Así, en este capítulo, se buscó a través de una aproximación proteómica, biomarcadores de MACE en pacientes con NAC.

# Pacientes, Materiales y Métodos

## 2. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. PACIENTES Y CONTROLES

Para el estudio de biomarcadores plasmáticos se utilizó una cohorte de descubrimiento formada por 38 pacientes MACE-30d, 38 NO MACE-4a de la cohorte 1, así como 14 controles sanos de donantes del CRH de la Región de Murcia. Para la validación de estos resultados se empleó el resto de la **cohorte 1** (182 pacientes con NAC). Una segunda validación se realizó en 186 pacientes de **cohorte 2 y 3**. Los sujetos sanos (controles) fueron seleccionados aleatoriamente entre los donantes de sangre del CRH y dieron su consentimiento informado para participar en el estudio. La inclusión de estos sujetos fue aprobada por el Comité de ética del Hospital General Universitario Reina Sofía de Murcia con código 28-2023.

### 2.2. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES DE MACE EN PLASMA DE PACIENTES CON NAC

#### 2.2.1. Ensayo de extensión de proximidad: estudio de descubrimiento

Se realizó el ensayo de extensión de proximidad (PEA) en la cohorte de descubrimiento, indicada en el apartado anterior. Metodológicamente, la tecnología PEA se basa en el uso de pares de anticuerpos unidos a secuencias cortas de DNA (oligonucleótidos). Cuando ambos anticuerpos se unen simultáneamente a la misma proteína diana, los oligonucleótidos hibridan de forma dependiente de una DNA polimerasa, generando una secuencia única que sirve como firma molecular específica de esa interacción. Estas secuencias se cuantifican mediante métodos de amplificación y lectura digital, permitiendo detectar concentraciones muy bajas de proteínas y analizar múltiples biomarcadores de forma simultánea (multiplexación), con un bajo consumo de muestra (1 $\mu$ L), un alto grado de especificidad y un nivel reducido de ruido de fondo.<sup>275</sup>

Realizamos este ensayo con la plataforma Olink<sup>®</sup> en colaboración con la Universidad de Córdoba (Cobiomic Bioscience, Córdoba, España). Se seleccionó el panel comercial inflamatorio para la detección de 92 moléculas inflamatorias en muestras de plasma. El listado de proteínas incluidas en el panel se especifica en el **Anexo 1**. Los datos generados por el ensayo PEA informan de los niveles de expresión de proteínas utilizando una unidad arbitraria denominada Expresión Protéica Normalizada (NPX). NPX es una unidad de cuantificación relativa en una escala logarítmica derivada de los valores Ct

obtenidos de la qPCR. El control de calidad y la normalización se realizó con el software Olink NPX™ Signature. La expresión diferencial se analizó con el programa Metaboanalyst 6.0.

### 2.2.2. Validación de los niveles plasmáticos de FGF-23

Para la determinación de los niveles plasmáticos de cFGF-23 en las 3 cohortes, en aquellos pacientes de los que se disponía de muestra de plasma suficiente, se utilizó el kit comercial MicroVue™ Human FGF-23 C-Term EIA (#447791, QuidelOrtho, Palex, Barcelona, España) según las recomendaciones del fabricante. La medición de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro multipocillo de barrido (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO). Los niveles proteicos de cFGF-23 se expresaron en Unidades de Referencia por mililitro (RU/mL), siendo el límite inferior de detección del ensayo de 1,5 RU/mL.

### 2.2.3. Modelo predictor de MACE mediante Machine Learning

El modelo de *machine learning* (ML) se realizó integrando parámetros clínicos y biológicos, combinando los resultados obtenidos por el ensayo PEA (Olink®) y un listado de 12 variables clínicas, diseñado por médicos especialistas, potencialmente relevantes en el riesgo de desarrollar un MACE en pacientes con NAC [(edad, sexo, asistencia, cardiopatía crónica, obesidad, diabetes mellitus, dislipidemia, hipertensión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), índice de comorbilidad de Charlson e índices de gravedad de la neumonía (FINE y CURB-65)].

El *workflow* del modelo predictor de MACE precoz en pacientes con NAC consistió en dos fases. Una primera fase de aleatorización de las observaciones incluidas en el conjunto de datos (70% datos de aprendizaje para la generación del modelo propiamente dicho, 30% restante de datos para la validación interna del modelo), reduciéndose así el riesgo de “*overfitting*”. Todas las variables para la generación del modelo fueron escalares, haciendo que su media fuese “0” y su desviación estándar “1”. Con ello se consiguió que aquellas con magnitudes más grandes, como la concentración de proteína, no enmascarasen a las otras variables. La reproducibilidad de la ejecución del algoritmo se aseguró fijando una semilla, pudiendo obtener el mismo modelo con independencia de cuándo se ejecute. En R, se consigue con la línea de código “> *set.seed*(123)”. Si no se hiciera, la creación de los dos grupos antes mencionados estaría constituida por observaciones (pacientes) diferentes en cada ejecución y el modelo sería distinto.

En la segunda fase se utilizó el algoritmo *Gradient Boosting Machine* (GBM), óptimo para conjuntos de datos desbalanceados, como era nuestro caso. Los modelos *Gradient Boosting* se basan en generar un número significativo de árboles de decisión de manera secuencial. Cada árbol es una versión mejorada de su predecesor. Aquí reside la principal diferencia con respecto a los conocidos *Random Forest*, en los que los árboles de decisión se generan simultáneamente. Además, al ser métodos no paramétricos, no requieren que las variables sigan una distribución normal, aspecto que se comprobó que no cumplían.

El paquete R utilizado para el modelado de aprendizaje automático fue *xgboost (v1.7.7.1)*. Adicionalmente, se realizó una validación cruzada con la función *xgb.cv* del mismo paquete. Con ella se realizó un nivel más de validación, previo a la evaluación con el 30% no utilizado en la creación del modelo, ejecutando varias iteraciones, dividiendo el 70% de los datos de entrenamiento en “n” subconjuntos (*folds*). Uno de ellos se emplea para testear los resultados y el resto (*nfolds-1*) como datos de entrenamiento. La validación se llevó a cabo en cada iteración, variando el subconjunto de prueba. Finalmente se realizó un promedio del error obtenido en cada iteración para obtener un resultado final más fiable. La **Tabla 17** muestra los parámetros más relevantes usados en el algoritmo GBM y en su validación cruzada (función *xgb.cv*) para la generación del modelo predictor de MACE temprano en pacientes con NAC.

## 2.3. ESTUDIO FUNCIONAL DE FGF-23 EN NEUTRÓFILOS

### 2.3.1. Purificación

Para la purificación de neutrófilos humanos se utilizaron bolsas de sangre que contiene el *Buffy Coat* (BC) derivadas del procesado de hemocomponentes de donantes sanos del CRH, previo consentimiento informado. Es requisito que el donante no hubiese tomado ningún tipo de medicación los 5 días previos a la donación. Para el aislamiento celular, se partió de un mix de 3 bolsas de BC, con una dilución 1:1 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (1X) pH 7,2 (#20012-019, ThermoFisher). El método de purificación empleado fue el doble gradiente por Histopaque® (#10771; #11191, Sigma-Aldrich™, Madrid, España), con una centrifugación de 30 minutos a 340xg sin freno ni aceleración. Tras la recuperación del anillo celular, los neutrófilos se lavaron con abundante PBS.

Tabla 17. Parámetros empleados para el modelado *Gradient Boosting Machine* (GBM).

Específicos del modelado (GBM)	Específicos de la validación cruzada
<pre> booster = "gbtree" eta = 0.01 max_depth = 8 gamma = 4 objective = "binary:logistic" eval_metric = "logloss"                     </pre>	<pre> nrounds = 5000 nfold = 10, early_stopping_rounds = 100                     </pre>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Booster</b> : modelo empleado (árbol de decisión).</li> <li>• <b>Eta</b> : la contribución de cada árbol es reducida multiplicando su influencia por dicho valor. Reduce el <i>overfitting</i> . <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Max_depth</b> : profundidad máxima que puede alcanzar el árbol.</li> </ul> </li> <li>• <b>Gamma</b> : reducción mínima que debe de cumplir una división para que se produzca en una iteración (árbol). <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Objective</b> : Entrenamiento como un modelo de clasificación binario.</li> </ul> </li> <li>• <b>Eval_metric</b> : parámetro usado para evaluar el modelo en cada iteración, en este caso la función <i>log loss</i> , la cual mide la discrepancia entre las probabilidades predichas y los fenotipos reales de los datos de entrenamiento. <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>nrounds</b> : máximo número de iteraciones.</li> <li>• <b>nfold</b> : el conjunto de datos es dividido aleatoriamente en grupos de igual tamaño.</li> </ul> </li> <li>• <b>early_stopping_rounds</b> : El algoritmo evalúa la bondad de sus resultados en la validación cruzada para cada iteración. En el caso concreto de estudio, si tras 100 iteraciones sus resultados no mejoran se detiene, no llegando a las 5000.</li> </ul>	

Si observamos contaminación eritrocitaria en el *pellet* celular, lisamos con ACK (#A1049201, ThermoFisher) parando la reacción de lisis con PBS. Finalmente, se resuspendieron los neutrófilos en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (#11835030, ThermoFisher), suplementado con 1% de Piruvato Sódico (#11360039, ThermoFisher), 1% de GlutaMAX™ (#35050061, ThermoFisher), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA) (11140050, ThermoFisher) y 0,5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (55°C durante 30 minutos) (#A5256701, ThermoFisher).

### 2.3.2. Análisis de viabilidad

Se analizó la viabilidad de los neutrófilos tras la exposición a la proteína recombinante humana FGF-23 (HY-P700064AF, MCE, Labclinics, Barcelona, España) (100 ng/mL) y al agonista Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (#P8139, Merck, Madrid, España) (40 nM), a tiempo cero y tras 2 horas de incubación, mediante el uso del colorante fluorescente 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (#559925, BD Biosciences, Madrid, España) por citometría de flujo (BD Accuri C6, BD Biosciences).

### 2.3.3. Cultivo para western blot (WB)

Una vez purificados, se sembraron  $2,5 \times 10^6$  neutrófilos en 750  $\mu$ L de medio (RPMI 1640, 1% Piruvato Sódico, 1% GlutaMAX™, 1% NEAA, 0,5% SFB) en tubos Falcon™ de polipropileno (15mL) (#352096, FisherScientific). Preincubamos los neutrófilos con FGF-23 a 100ng/mL, en agitación suave (50 RPM) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, durante 1 hora. De esta forma evitamos que durante la incubación los neutrófilos precipiten y formen un *pellet* que podría activarlos. Posteriormente, incubamos los neutrófilos con distintos agonistas: PMA (#P8139, Merck), e ionóforo de calcio A23187 (#C9400, Merck). Las concentraciones y los tiempos de incubación empleados para cada agonista fueron los siguientes: PMA (1 nM; 5 minutos) e ionóforo (0,5  $\mu$ M; 30 minutos). Siempre tenemos una condición control no activada para definir los niveles basales de nuestra proteína de interés.

Las muestras se lisaron con 40  $\mu$ L de *buffer* RIPA [Tris 50mM (Tris-HCl #BP153, FisherScientific; Tris-Base #BP152, FisherScientific), NaCl 200mM (#BP358, FisherScientific), EDTA 5mM, 0,1% Triton X-100 (#1610407, Bio-Rad, Madrid, España) y 0,1% SDS; pH:7,6] suplementado con 1% de inhibidor de proteasas (#P8340, Merck) y 1% de inhibidor de fosfatasa (#78420, ThermoFisher). Tras los 30 minutos de lisis química en hielo, se almacenaron las muestras a -20°C durante toda la noche para

favorecer una lisis mecánica. Posteriormente se trataron las muestras con DNAsa I (#18068015, Invitrogen) dejando actuar 30 minutos a 25°C. Transcurrido ese tiempo, centrifugamos a máxima velocidad (17000xg), durante 10 minutos a 4°C, para recoger el sobrenadante. La cuantificación proteica de los lisados se realizó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) (#23228; #23224, ThermoFisher).

#### 2.3.4. Análisis de expresión proteica por WB

La electroforesis se realizó en geles de SDS en condiciones reductoras añadiendo ditioneitol (DTT) (#10183011, FisherScientific). Las muestras se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos en *loading buffer* (LB) (#10341475, FisherScientific). Se cargaron 15 µg totales de proteína por calle en geles de acrilamida/bisacrilamida al 8%. Las condiciones de electroforesis en *running buffer* [Glicina (#500190, Merck), Tris-Base (#BP152, FisherScientific), 10% SDS, dH<sub>2</sub>O] fueron: 150 V durante 60-90 minutos. Las condiciones de la transferencia húmeda sobre membrana de PVDF (#10600023, Cytiva Life Sciences™ Amersham™ Hybond™, FisherScientific) activada con metanol (#10010240, FisherScientific) fueron: 400 mA durante 90 minutos. Tras la transferencia, la membrana se bloqueó con una solución tamponada con Tris (TBS) 1X/1% Tween20 (#BP337, FisherScientific) suplementada con 5% de albúmina de suero bovino (BSA) libre de proteasas (#P6155, Biowest, Labclinics, Barcelona, España) (TBS-T+BSA) durante 30 minutos. A continuación, se incubó la membrana *O/N* en agitación a 4°C con el anticuerpo primario *Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)* (1:1000) (#9101, Cell Signaling Technology, Werfen, Barcelona, España) en TBS-T+BSA. Después de esta incubación, se hicieron 3 lavados de 10 minutos de la membrana con TBS-T y se incubó 1 hora a *R/T* con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP): *anti-rabbit* 1:10000 (#NA9340, Cytiva, Barcelona, España.). Se volvió a lavar la membra con TBS-T (3 lavados de 10 minutos), antes de revelar la proteína con el substrato Pierce™ ECL Plus (#32132, ThermoFisher) en el ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Madrid, España)

Previamente a reincubar la membrana con el anticuerpo utilizado como control de carga, se realizó un *stripping* de la misma durante 5-10 minutos con Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer (#46430, ThermoFisher). Lavamos con TBS-T para eliminar los restos del *buffer* de *stripping* y de nuevo, se bloqueó la membrana con TBS-T+BSA durante 30 minutos. Incubamos 1 hora con el anticuerpo primario *ERK1/ERK2 Monoclonal Antibody (ERK-7D8)* (1:500) (#13-6200, ThermoFisher) en agitación a 4°C.

Volvemos a lavar la membrana (TBS-T) e incubamos 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con HRP *anti-mouse* 1:10000 (NXA931, Cytiva, Barcelona, España). El análisis densitométrico se realizó con el software Image Lab 6.1. (Bio-Rad, Madrid, España) relativizando la señal de cada proteína a su control de carga.

### 2.3.5. Determinación de la inducción de NETosis

Se sembraron  $1 \times 10^5$  neutrófilos en 100  $\mu\text{L}$  de medio (RPMI 1640, 1% Piruvato Sódico, 1% GlutaMAX<sup>TM</sup>, 1% NEAA, 0,5% SFB) en placa de 96 pocillos (#267427, ThermoFisher), previamente tratada con 50  $\mu\text{L}$  de polilisina (#P4707, Merck) durante al menos 30 minutos a 37°C. De esta manera facilitamos la adhesión de los neutrófilos al pocillo. Incubamos los neutrófilos con FGF-23 a 100 ng/mL durante 1 hora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, tratamos durante 4 horas con A23187 0,5  $\mu\text{M}$ . Pasado este tiempo de activación, se retiró el sobrenadante con especial atención para no eliminar ni los neutrófilos ni la red de NET generada. Se añadió 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo con la enzima de digestión ALU I (dilución 1:1250) (#FD0014, ThermoFisher) y se dejó actuar durante 30 minutos a 37°C en agitación, para favorecer la rotura de la red de NET, y liberación del complejo de histonas al medio. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se centrifugó en tubos eppendorf a 500xg durante 5 minutos.

Para la cuantificación de NET por ELISA, incubamos 50  $\mu\text{L}$  del anticuerpo de captura multiclonal Anti-citH3 (#ab281584, Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluido 1:250 en *coating buffer* (15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>; pH 9,6), en placas MaxiSorp<sup>TM</sup> de 96 pocillos (#439454, ThermoFisher). Se incubó a 4°C *O/N*. A continuación, se lavó la placa 3 veces con 200  $\mu\text{L}$ /pocillo (todos los lavados fueron iguales durante todo el protocolo) de *washing buffer* (PBS-BSA 1% + Tween-20 0,05%). Se bloqueó con 200  $\mu\text{L}$ /pocillo de *blocking buffer* (PBS-BSA 5%) durante 1 hora a *R/T*. Tras esta incubación, se volvió a la lavar la placa, y se pusieron 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante celular y 50  $\mu\text{L}$  de las diluciones de la recta patrón. Para la recta patrón, se utilizaron nucleosomas comerciales citrulinados (#16-1362, EpiCypher, Durham, NC, EE. UU.), los cuales llevan citH3 en el octámero de histonas rodeado por 147 pares de bases de DNA. Se incubaron las muestras durante 2 horas a *R/T*, tras lo cual se lavó la placa de nuevo. Para la detección se utilizó el anticuerpo anti-DNA-POD a una dilución 1:100 en su *buffer* de incubación del kit Cell Death Detectin ELISA<sup>PLUS</sup> (#11774425001, Roche), incubando la placa 2 horas a *R/T*. Se hizo el último lavado tras la incubación y se añadió 100  $\mu\text{L}$ /pocillo del sustrato revelador 1-Step<sup>TM</sup> ABTS (#37615, ThermoFisher), dejando incubar 2 horas y midiendo la

absorbancia a 405nm en un espectrofotómetro multipocillo de barrido (SpectraMax® iD3, Molecular Devices, San Jose CA, EE. UU.).

#### 2.3.6. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se sembraron  $3 \times 10^6$  neutrófilos en 1 mL de medio (RPMI 1640, 1% GlutaMAX™, 1% NEAA) en eppendorf. Preincubamos los neutrófilos con FGF-23 a 100ng/mL, en agitación suave (50 RPM) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Para la medición de ROS, añadimos la sonda H<sub>2</sub>DCFDA (#D399, ThermoFisher) a una dilución 1:1000. Incubamos durante 30 minutos a 37°C en baño termostático. Tras la incubación hacemos dos lavados con el medio de cultivo (400xg durante 5 minutos). Los neutrófilos se resuspendieron en 400 µL de RPMI, y añadimos el agonista PMA (20 y 40 nM), en las condiciones activadas. La generación de ROS se determinó mediante una cinética de 2 horas en un lector fluorimétrico multipocillo a 37°C (SpectraMax® iD3, Molecular Devices).

#### 2.3.7. Estudio de la capacidad fagocítica

Se sembraron  $1 \times 10^6$  neutrófilos en 1 mL de medio (RPMI 1640, 1% GlutaMAX™, 1% NEAA) en eppendorf. Preincubamos los neutrófilos con FGF-23 a 100ng/mL, en agitación suave (50 RPM) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Para la determinación de la capacidad fagocítica de los neutrófilos, los incubamos con una cepa de *E. coli* (K-12 strain) BioParticles™-FITC (#E2861, Invitrogen) en una relación 10:1 durante 30 minutos a 37°C. Centrifugamos a 400xg durante 5 minutos e hicimos dos lavados con medio de cultivo. Tras el último lavado, resuspendimos en 400 µL de medio y añadimos 25 µL de azul tripán 0,4% (T10282, Invitrogen) antes de la adquisición de la muestra en el citómetro (BD Accuri C6, BD Biosciences)

#### 2.3.8. Ensayo de trans migración celular (*Transwell*)

Se sembraron  $2 \times 10^5$  neutrófilos en 250 µL de medio [RPMI 1640, 1% GlutaMAX™, 1% NEAA, BSA (#A9418, Merck)] en eppendorf y dejamos reposar las células 20 minutos. Preincubamos los neutrófilos 1 hora con FGF-23 a 100 ng/mL, en agitación suave (50 RPM) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Durante esta incubación, quitamos la membrana porosa (8 µm) de la placa *transwell* (#3422, Life Sciences, Madrid, España) y añadimos 600 µL de medio sin BSA para cada condición. Como control positivo, usamos el agente quimioatrayente fMLP (N-formilmetionil-leucil-fenilalanina) (#F3506, Merck) a una concentración final de 100 nM. Centrifugamos los neutrófilos a 400xg durante 5 minutos y los resuspendimos en 100 µL de medio con BSA. Añadimos esos 100 µL (por

condición) sobre la membrana porosa de cada pocillo de la placa e incubamos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Analizamos la tasa de migración al microscopio óptico (Leica, Barcelona, España) a los 60 minutos, con el software Fiji (Image J2, Madison, WI, EE. UU.).

## 2.4. ESTUDIO FUNCIONAL DE FGF-23 EN MONOCITOS

### 2.4.1. Purificación

La purificación de las PBMC se hizo a partir de bolsas BC de donantes sanos. Tras el aislamiento descrito para los neutrófilos, las PBMC (mayoritariamente monocitos, y así las denominaremos en el resto del capítulo) se lavaron con abundante PBS. Si observábamos contaminación eritrocitaria en el pellet celular, este se lisaba con buffer ACK (#A1049201, ThermoFisher) parando la reacción de lisis con PBS. Finalmente, se resuspendieron los monocitos en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (#11835030, ThermoFisher), suplementado con 1% de Piruvato Sódico (#11360039, ThermoFisher), 1% de GlutaMAX™ (#35050061, ThermoFisher), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA) (#11140050, ThermoFisher).

### 2.4.2. Determinación de la expresión de FT por RT-qPCR

Se sembraron  $5 \times 10^5$  monocitos en 1 mL de medio (RPMI 1640, 1% de Piruvato Sódico, 1% GlutaMAX™, 1% NEAA) en eppendorf. Preincubamos los monocitos durante 2 horas con 10 ng/mL de LPS de *E. coli* O128:B12 (#L2755, Merck), y distintas concentraciones de FGF-23 (1, 10, 20, 50 y 100 nM) en agitación suave (50 RPM) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. En los experimentos de inhibición, se preincubaron los neutrófilos durante 1 hora con 100nM de erdafitinib, un pan-inhibidor de receptores de FGF (FGFR) (HY-18708, MCE, Labclinics, Barcelona). Tras la incubación, centrifugamos los monocitos a 500xg durante 5 minutos y lisamos el pellet celular con 500 µL de TRI Reagent® (#TR 118, Molecular Research Center, Inc., Vitro S.A., Madrid, España), y se purificó el RNA según las recomendaciones del fabricante. Se determinó la concentración de RNA, así como la ratio 260/280 (proteína) y la ratio 260/230 (etanol), con el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher). La retrotranscripción se realizó con una concentración de 200 ng totales de RNA con el kit SuperScript IV Reverse Transcriptase® (#18090200, ThermoFisher). Las condiciones de la reacción de retrotranscripción se indican en la **Tabla 18**.

La reacción de PCR se realizó en el equipo QuantStudio™ 5 (ThermoFisher) mediante un ensayo TaqMan® y se utilizó la sonda comercial *F3* (Hs00175225\_m1, ThermoFisher) y la sonda *ACTB* (Hs01060665, ThermoFisher) como gen control. Las condiciones de la reacción de PCR se indican en la **Tabla 19**. Para el análisis se utilizó la plataforma virtual de ThermoFisher.

**Tabla 18. Programa del termociclador para la reacción de retrotranscripción (RT).**

Pasos termociclador		Reacción de RT	
		Reactivo	Volumen/reacción (µL)
Primer Paso	5 min a 65°C 1 min a 4°C	RNA (200 ng totales) en agua DEPC; (#AM9915G, Invitrogen)	11
		Random Hexamers (50 µM); (#N8080127, ThermoFisher)	1
		dNTPs (10 mM); (N8080261, Fisher Scientific)	1
			<b>Vf= 13 µL</b>
Segundo paso	10 min a 23°C 10 min a 50°C 10 min a 80°C Infinito a 10°C	Buffer 5x SSIV; (#18090200, ThermoFisher)	4
		DTT (100 mM); (#18090200, ThermoFisher)	1
		RNase OUT Inhibitor; (#100000840, ThermoFisher)	1
		SuperScriptIV; (#18090200, ThermoFisher)	1
			<b>Vf=20 µL</b>

**Tabla 19. Programa para la reacción de PCR.**

Pasos QuantStudio™ 5			Reacción de PCR	
		Nº ciclos	Reactivo	Volumen/reacción (µL)
Pre Read	30 s a 95°C		Premix Ex Taq; (#RR003A, Takara)	5
PCR	3 s a 93°C	40x	Sonda	0,5
	30 s a 60°C		cDNA (Dilución 1:10)	4
Hold	30 s a 20°C		Agua DEPC; (#AM9915G, Invitrogen)	Hasta 10µL
				<b>Vf= 10 µL</b>

#### 2.4.3. Análisis de la expresión proteica de FT por WB

Se sembraron  $2 \times 10^6$  monocitos en 1 mL de medio (RPMI 1640, 1% de Piruvato Sódico, 1% GlutaMAX™, 1% NEAA) en tubos eppendorf. Preincubamos los monocitos durante 3 horas con 10 ng/mL de LPS (#L2755, Merck), y 100 ng/mL de FGF-23 en agitación suave (50 RPM) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Tras esta incubación, centrifugamos los monocitos a 500xg durante 5 minutos y lisamos el pellet celular con 25 µL de buffer RIPA suplementado con 1% de inhibidor de proteasas y 1% de inhibidor de fosfatasa. Tras los 30 minutos de lisis química en hielo, se almacenaron las muestras a -20°C durante toda la noche para favorecer una lisis mecánica. Transcurrido ese tiempo, centrifugamos a

máxima velocidad (17000xg), durante 10 minutos a 4°C, para recoger el sobrenadante. La cuantificación proteica de los lisados se realizó mediante BCA.

La electroforesis se realizó en geles de SDS en condiciones reductoras. Las muestras se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos en LB. Se cargaron 20 µg totales de proteína por carril en geles de acrilamida al 10%. Las condiciones de electroforesis y de transferencia fueron las mismas que las indicadas en apartados anteriores. Tras la transferencia, la membrana se bloqueó con TBS-T+leche/BSA según el anticuerpo a utilizar, durante 30 minutos. A continuación, se incubó la membrana O/N en agitación a 4°C con el anticuerpo primario según las recomendaciones del fabricante, reflejadas en la **Tabla 20**. Después de esta incubación, se hicieron 3 lavados de 10 minutos de la membrana con TBS-T, y se incubó 1 hora a R/T con el anticuerpo secundario conjugado con HRP correspondiente. Se volvió a lavar la membrana con TBS-T (3 lavados de 10 minutos), antes de revelar la proteína con el substrato Pierce™ ECL Plus (#32132, ThermoFisher) en el ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Madrid, España).

Previamente a reincubar la membrana, se realizó un *stripping* de la misma durante 5-10 minutos con Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer (#46430, ThermoFisher). Lavamos con TBS-T para eliminar los restos del buffer de *stripping* y de nuevo, se bloqueó la membrana con TBS-T+Leche/BSA durante 30 minutos. Incubamos 1 hora con el anticuerpo de control de carga en agitación a 4°C. El análisis densitométrico se realizó con el software Image Lab 6.1. (Bio-Rad, Madrid, España).

### CAPÍTULO III. Pacientes, Materiales y Métodos

**Tabla 20. Relación de anticuerpos empleados en western blot (WB) en monocitos humanos.**

Anticuerpo primario	Descripción	Casa comercial (Referencia)	Anticuerpo secundario	Descripción	Casa comercial (Referencia)
Anti-Tissue Factor (CD142)	Dilución 1:250 en TBS-T+leche (5%)	Invitrogen (#PA1-43058)	Anti-goat/sheep-HRP	Dilución 1:5000 en TBS-T+leche (5%)	Sigma-Aldrich (#A9452)
Anti-β-actina-HRP	Dilución 1:10000 en TBS-T+BSA (5%)	Sigma-Aldrich (#A3854)			
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Dilución 1:1000 en TBS-T+BSA (5%)	Cell Signaling Technology (#9101)	anti-rabbit -HRP	Dilución 1:10000 en TBS-T+BSA (5%)	Cytiva (#NA9340)
Anti-ERK1/ERK2 (ERK-7D8)	Dilución 1:500 en TBS-T+BSA (5%)	ThermoFisher (#13-6200)	anti-mouse-HRP	Dilución 1:10000 en TBS-T+BSA (5%)	Cytiva (#NXA931)
Phospho-Akt (Ser473) (587F11)	Dilución 1:1000 en TBS-T+BSA (5%)	Cell Signaling Technology (#4051)	anti-mouse-HRP	Dilución 1:10000 en TBS-T+BSA (5%)	Cytiva (#NXA931)
Akt (pan) (C67E7)	Dilución 1:1000 en TBS-T+BSA (5%)	Cell Signaling Technology (#4691)	anti-rabbit -HRP	Dilución 1:10000 en TBS-T+BSA (5%)	Cytiva (#NA9340)
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Dilución 1:1000 en TBS-T+BSA (5%)	Cell Signaling Technology (#9211S)	anti-rabbit -HRP	Dilución 1:10000 en TBS-T+BSA (5%)	Cytiva (#NA9340)
p38 MAPK	Dilución 1:1000 en TBS-T+BSA (5%)	Cell Signaling Technology (#9212S)	anti-rabbit -HRP	Dilución 1:10000 en TBS-T+BSA (5%)	Cytiva (#NA9340)

## 2.5. ESTUDIO FUNCIONAL DE FGF-23 EN CÉLULAS ENDOTELIALES

### 2.5.1. Determinación de la expresión de FT y TFPI por RT-qPCR

Se sembraron células HUVEC en medio completo EGM<sup>®</sup>-2 BulletKit<sup>®</sup> (#CC-3162, Lonza, Pontevedra, España) suplementado (2% SBF, 0,04% hidrocortisona, 0,4% hFGF-B, 0,1% VEGF, 0,1% ácido ascórbico, 0,1% hEGF, 0,1% GA-1000, 0,1% heparina) (#CC-4176, Lonza, Pontevedra, España) en frascos de cultivo tratados T75 (#156499, Thermo Scientific, Madrid, España). Cuando las HUVEC estuvieron confluentes, se realizó un pase a una placa de 24 pocillos (#142475, Thermo Scientific) a razón de 30000 células/pocillo. Preincubamos las células durante 2 horas con 10 ng/mL de LPS, y 100 ng/mL de FGF-23 en agitación suave (50 RPM) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Tras la incubación, centrifugamos las HUVEC a 500xg durante 5 minutos y lisamos el pellet celular con 500 µL de TRI Reagent<sup>®</sup> (#TR 118, Molecular Research Center, Inc., Vitro S.A., Madrid, España), y se purificó el RNA según las recomendaciones del fabricante. Se determinó la concentración de RNA, así como la ratio 260/280 (proteína) y la ratio 260/230 (etanol), con el espectrofotómetro NanoDrop<sup>™</sup> 2000 (ThermoFisher). Las condiciones de la reacción de retrotranscripción y de PCR fueron las mismas que las indicadas en el apartado anterior. La reacción de PCR se realizó en el sistema QuantStudio<sup>™</sup> 5 (ThermoFisher) mediante un ensayo TaqMan<sup>®</sup> y se utilizaron la sonda comercial *F3* (Hs00175225\_m1, ThermoFisher), la sonda comercial *TFPIβ* (Hs01047128, ThermoFisher) y la sonda *ACTB* (Hs01060665, ThermoFisher) como gen control.

### 2.5.2. Análisis de la expresión proteica por WB

Preincubamos las HUVEC durante 3 horas con 100 ng/mL de FGF-23 en agitación suave (50 RPM) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Tras esta incubación, centrifugamos las células a 500xg durante 5 minutos y lisamos el pellet celular con 25 µL de buffer RIPA suplementado con 1% de inhibidor de proteasas y 1% de inhibidor de fosfatasas. Tras los 30 minutos de lisis química en hielo, se almacenaron las muestras a -20°C durante toda la noche para favorecer una lisis mecánica. Transcurrido ese tiempo, centrifugamos a máxima velocidad (17000xg), durante 10 minutos a 4°C, para recoger el sobrenadante. La cuantificación proteica de los lisados se realizó mediante BCA.

Las condiciones de electroforesis y de transferencia fueron las mismas que las indicadas en apartados anteriores. Tras la transferencia, la membrana se bloqueó con TBS-T+leche,

durante 30 minutos. A continuación, se incubó la membrana O/N en agitación a 4°C con el anticuerpo primario anti-TFPI $\beta$  (#ab180619, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Después de esta incubación, se hicieron 3 lavados de 10 minutos de la membrana con TBS-T y se incubó 1 hora a *R/T* con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP): *anti-rabbit* 1:10000 (#NA9340, Cytiva, Barcelona, España). Se volvió a lavar la membra con TBS-T (3 lavados de 10 minutos), antes de revelar la proteína con el substrato Pierce™ ECL Plus (#32132, ThermoFisher) en el ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Madrid, España). Como control de carga se usó el anticuerpo anti- $\beta$ -actina-HRP (#A3854, Sigma-Aldrich, Madrid, España).

## 2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables continuas se representaron como el valor de la media  $\pm$  su desviación estándar, o mediana y rango intercuartil (RIQ) según corresponda; y las variables categóricas como porcentajes. Las comparaciones de las variables categóricas entre grupos se realizaron mediante la prueba exacta de *Fisher* y el test *Chi-cuadrado de Pearson* ( $\chi^2$ ) dependiendo del tamaño muestral y la distribución normal de los datos (test *Shapiro-Wilk* y *Kolmogorov-Smirnov*). Por su parte, el análisis estadístico de las variables numéricas se llevó a cabo mediante las pruebas *t-test Student/ANOVA*, para grupos de datos con distribución normal, y *Mann-Whitney/ Kruskal-Wallis test*, para conjuntos de datos con distribución anormal. Se consideró la significación estadística en los valores de  $p < 0,05$ . Para evaluar la capacidad discriminadora de los niveles de proteína FGF-23 se empleó el modelo de curva ROC. Para el análisis de producción de ROS se utilizaron los valores de AUC de curva ROC. Los programas usados para el análisis estadístico han sido *IBM SPSS Statistics 21* (Armonk, NY, EE. UU.) y *GraphPad Prism 9.0 Software, LLC* (San Diego, CA, EE. UU.).

# Resultados

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. INCIDENCIA DE MACE EN PACIENTES CON NAC

La cohorte global incluyó 258 pacientes diagnosticados de NAC, y en función del tiempo de desarrollo del MACE quedó subdividida de la siguiente forma: pacientes con MACE precoz en los 30 días siguientes al ingreso por NAC (n=38; MACE-30d), aquellos que desarrollaron un MACE entre 30 días y 1 año (n=33; MACE-1a), pacientes con MACE entre 1 y 4 años (n=21; MACE-4a) y los que no tuvieron MACE asociado en el seguimiento a 4 años (n=166; NO MACE-4a). La **Tabla 21** muestra las características demográficas y clínicas principales de la serie de pacientes. La incidencia de MACE temprano a los 30 días en nuestra cohorte de 258 pacientes con NAC fue del 14,7%. La edad media de la cohorte fue de 75,6 años, con un claro predominio de hombres. De los pacientes, el 61,8% desarrolló sepsis tras el diagnóstico de NAC.

Al analizar los pacientes que desarrollaron MACE en un plazo de 30 días (MACE-30d, n=38) frente al resto de la serie (NO MACE-30d, n=220), observamos una mayor edad (78,9 vs. 75 años;  $p=0,045$ ), mayor frecuencia de cardiopatía crónica (58,9% vs. 30,9%;  $p=0,003$ ), diabetes (60,5% vs. 32,3%;  $p=0,002$ ), hipertensión arterial (84,2% vs. 59,1%;  $p=0,007$ ) y mayores puntuaciones en las escalas de riesgo FINE ( $\geq 4$ ) (78,9% vs. 52,7%;  $p=0,003$ ) y CURB-65 ( $\geq 3$ ) (47,4% vs. 22,7%;  $p=0,003$ ). Cuando estudiamos variables analíticas de laboratorio entre estos dos grupos, no observamos diferencias significativas en ningún parámetro analizado, salvo en los niveles séricos de potasio, siendo estos superiores en los MACE-30d (4,63 vs. 4,23 mEq/L;  $p<0,001$ ), aunque encontrándose dentro del rango de normalidad. De manera general todos los pacientes presentaron leucocitosis (neutrofilia y linfocitosis), junto con niveles elevados de fibrinógeno y PCR, debido al escenario de inflamación e infección por la NAC (**Tabla 22**).

CAPÍTULO III. Resultados

**Tabla 21. Características clínicas y demográficas de la cohorte global con NAC (N=258).**

	COHORTE GLOBAL (N=258)	MACE-30d (n=38)	MACE-1a (n=33)	MACE-4a (n=21)	NO MACE-4a (n=166)	p value
Edad (años), (mediana; RIQ)	75,6 (74,4-76,8)	79,1 (73-85,3)	79,9 (76,5-84,5)	77,3 (71,5-84,5)	73,8 (67,8-81)	<b>0,001</b>
Sexo, (hombre/mujer) (N)	172/86	26/12	21/12	12/9	113/53	0,755
Sepsis, N (%)	159 (61,6)	26 (68,4)	19 (57,6)	15 (71,4)	99 (59,6)	0,552
Creatinina (mg/dL), (media; IC 95%)	1,38 (1,27-1,49)	1,58 (1,29-1,87)	1,22 (1,01-1,44)	1,28 (1,07-1,45)	1,36 (1,21-1,51)	<b>0,046</b>
Fallo renal agudo, N (%)	29/240 (12,1)	10/36 (27,8)	5/32 (15,6)	1/18 (5,6)	13/154 (8,4)	<b>0,010</b>
Asistencia, N (%)	6 (2,3)	1 (2,6)	0 (0)	1 (4,8)	4 (2,4)	0,716
Obesidad, N (%)	117 (45,3)	17 (44,7)	10 (30,3)	9 (42,9)	81 (48,8)	0,276
Cardiopatía crónica, N (%)	90 (34,7)	22 (57,9)	19 (57,6)	9 (42,9)	40 (24,1)	<b>&lt;0,001</b>
Dislipemia, N (%)	131 (50,6)	21 (55,3)	18 (54,5)	6 (28,6)	86 (51,8)	0,195
Diabetes mellitus, N (%)	94 (36,3)	23 (60,5)	11 (33,3)	5 (23,8)	55 (33,1)	<b>0,008</b>
Hipertensión arterial, N (%)	162 (62,5)	32 (84,2)	22 (66,7)	13 (61,9)	95 (57,2)	<b>0,020</b>
EPOC, N (%)	57 (22,2)	8 (21,1)	9 (27,3)	5 (23,8)	35 (21,1)	0,880
CCI ≥3, N (%)	48 (18,6)	7 (18,4)	14 (42,4)	3 (14,3)	24 (14,5)	<b>0,002</b>
PSI_FINE ≥ 4, N (%)	146 (56,6)	30 (78,9)	21 (63,6)	13 (61,9)	82 (49,4)	<b>0,007</b>
CURB-65 ≥3, N (%)	68 (26,4)	18 (47,4)	3 (9,1)	7 (33,3)	40 (24,1)	<b>0,002</b>
Mortalidad a 4 años, N (%)	85 (32,9)	20 (52,6)	17 (51,5)	9 (42,9)	39 (23,5)	<b>&lt;0,001</b>

Se muestran los diferentes subgrupos de pacientes en función del tiempo de aparición del MACE desde el ingreso: dentro de los primeros 30 días (**MACE-30d**), entre 30 días y un año (**MACE-1a**), entre 1 y 4 años (**MACE-4a**) y sin MACE a 4 años de seguimiento (**NO MACE-4a**). Para las comparaciones entre subgrupos se han utilizado los test estadísticos *Kruskal-Wallis* y *Chi-square* dependiendo de la tipología de la variable. **RIQ**, Rango intercuartílico; **IC 95%**, Intervalo de confianza del 95%; **EPOC**, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; **CCI**, Charlson Comorbidity Index; **PSI**, Pneumonia Severity Index; **CURB-65**, Acrónimo de Confusión, Urea (BUN > 7 mmol/L), Frecuencia respiratoria (≥30/min), Presión arterial (sistólica <90 o diastólica ≤60) y Edad (≥65).

### CAPÍTULO III. Resultados

**Tabla 22. Características clínicas y demográficas de los pacientes en función del MACE a 30 días del ingreso.**

	<b>MACE-30d (n=38)</b>	<b>NO MACE-30d (n=220)</b>	<b>p value</b>
Edad (años), (mediana; RIQ)	79,1 (73-85,3)	75,0 (73,7-76,4)	<b>0,045</b>
Sexo, (hombre/mujer) (N)	26/12	146/74	0,854
Sepsis, N (%)	26 (68,4)	133 (60,5)	0,372
Asistencia, N (%)	1 (2,6)	5 (2,3)	>0,999
Obesidad, N (%)	17 (44,7)	100 (45,5)	>0,999
Cardiopatía crónica, N (%)	22 (57,9)	68 (30,9)	<b>0,003</b>
Dislipemia, N (%)	21 (55,3)	110 (50)	0,729
Diabetes mellitus, N (%)	23 (60,5)	71 (32,3)	<b>0,002</b>
Hipertensión arterial, N (%)	32 (84,2)	130 (59,1)	<b>0,007</b>
EPOC, N (%)	8 (21,1)	49 (22,5)	>0,999
CCI $\geq$ 3, N (%)	7 (18,4)	41 (18,7)	>0,999
PSI_FINE $\geq$ 4, N (%)	30 (78,9)	116 (52,7)	<b>0,003</b>
CURB-65 $\geq$ 3, N (%)	18 (47,4)	50 (22,7)	<b>0,001</b>
Mortalidad a 4 años, N (%)	20 (52,6)	65 (29,5)	<b>0,005</b>
<b>VARIABLES ANALÍTICAS</b>			
Leucocitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	15,45	14,67	0,187
Neutrófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8,43	8,22	0,317
Linfocitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8,38	9,27	0,579
Monocitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,64	0,77	0,056
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	242,63	247,14	0,861
Sodio (mEq/L)	136,9	136,6	0,585
Potasio (mEq/L)	4,63	4,23	<b>&lt;0,001</b>
Fibrinogeno (mg/dL)	643,9	681,2	0,183
PCR (mg/dL)	19,9	22,44	0,637
TTPa (segundos)	33,4	32,9	0,936

Se muestran los pacientes con MACE a 30 días (**MACE-30d**) frente al resto de la cohorte (**NO MACE-30d**). Para las comparaciones entre ambos grupos se han utilizado los test estadísticos *U Mann-Whitney* y *Fisher's exact* dependiendo de la tipología de la variable. **RIQ**, Rango intercuartílico; **EPOC**, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; **CCI**, *Charlson Comorbidity Index*; **PSI**, *Pneumonia Severity Index*; **CURB-65**, Acrónimo de Confusión, Urea (BUN > 7 mmol/L), Frecuencia respiratoria ( $\geq 30/\text{min}$ ), Presión arterial (sistólica <90 o diastólica  $\leq 60$ ) y Edad ( $\geq 65$ ); **PCR**, Proteína C reactiva; **TTPa**, Tiempo de tromboplastina parcial activada. **Rangos de normalidad**: leucocitos (4,4-11), neutrófilos (1,5-7), linfocitos (1-4,8), monocitos (0,1-0,9), plaquetas (150-400), sodio (135-145), potasio (3,5-5), fibrinógeno (200-400), PCR (<1), TTPa (25-35).

## 3.2. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE MACE

### 3.2.1. Análisis de biomarcadores plasmáticos inflamatorios

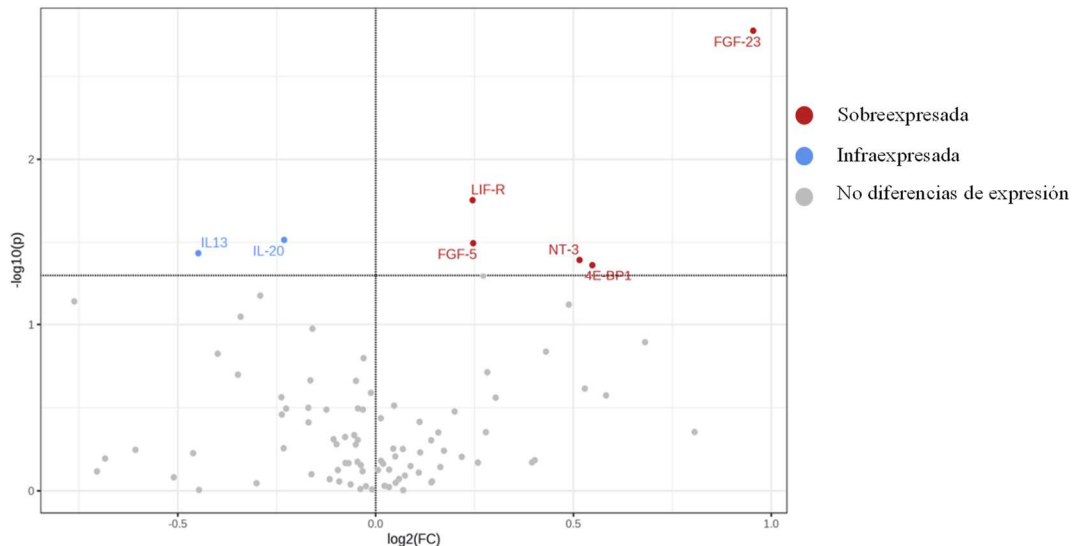
El ensayo de extensión por proximidad (PEA) se diseñó con una cohorte de descubrimiento de casos y controles (n=76) en la que se seleccionaron 38 pacientes con MACE en los 30 días siguientes al ingreso (MACE-30d) y 38 sin MACE a los 4 años de seguimiento (NO MACE-4a), con similar edad, sexo y gravedad de la NAC según la puntuación FINE (**Tabla 23**). El estudio se completó con 14 donantes sanos reclutados en nuestro centro.

**Tabla 23. Características clínicas y demográficas de la cohorte de descubrimiento para el ensayo PEA (Olink®).**

	Estudio piloto: ensayo PEA (Olink®)		p value
	MACE-30d (n=38)	NO MACE-4a (n=38)	
Edad (años), (mediana; RIQ)	78,9 (75,8-83,3)	79,1 (73-85,3)	0,937
Sexo, (hombre/mujer) (N)	26/12	26/12	>0,999
Sepsis, N (%)	23 (60,5)	26 (68,4)	0,632
Asistencia, N (%)	1 (2,6)	1 (2,6)	>0,999
Obesidad, N (%)	22 (57,9)	17 (44,7)	0,359
Cardiopatía crónica, N (%)	15 (39,5)	22 (57,9)	0,168
Dislipemia, N (%)	20 (52,6)	21 (55,3)	>0,999
Diabetes mellitus, N (%)	16 (42,1)	23 (60,5)	0,168
Hipertensión arterial, N (%)	22 (57,9)	32 (84,2)	<b>0,022</b>
EPOC, N (%)	7 (18,4)	8 (21,1)	>0,999
CCI $\geq$ 3, N (%)	6 (15,8)	7 (18,4)	>0,999
PSI FINE $\geq$ 4, N (%)	28 (73,7)	30 (78,9)	0,788
CURB-65 $\geq$ 3, N (%)	10 (26,3)	18 (47,4)	0,095

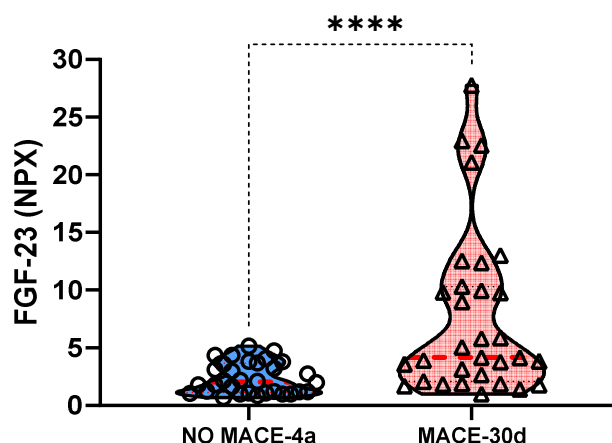
Se seleccionaron 38 pacientes con MACE a 30 días (**MACE-30d**) frente a 38 pacientes sin MACE a 4 años (**NO MACE-4a**). Para el análisis estadístico entre ambos grupos se han empleado las pruebas, *t-test* y *Fisher's exact* dependiendo de la tipología de la variable. **PEA**, Ensayo de extensión por proximidad; **RIQ**, Rango intercuartílico; **EPOC**, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; **CCI**, *Charlson Comorbidity Index*; **PSI**, *Pneumonia Severity Index*; **CURB-65**, Acrónimo de Confusión, Urea (BUN > 7 mmol/L), Frecuencia respiratoria ( $\geq$ 30/min), Presión arterial (sistólica <90 o diastólica  $\leq$ 60) y Edad ( $\geq$ 65).

El ensayo PEA reveló que 7 proteínas se expresaron diferencialmente en muestras de plasma entre los MACE-30d frente a los NO MACE-4a. Dos proteínas se mostraron significativamente reguladas a la baja (IL-13, IL-20) y 5 reguladas al alza (FGF-5, LIF-R, NT-3, 4E-BP1, FGF-23) (**Figura 18**).



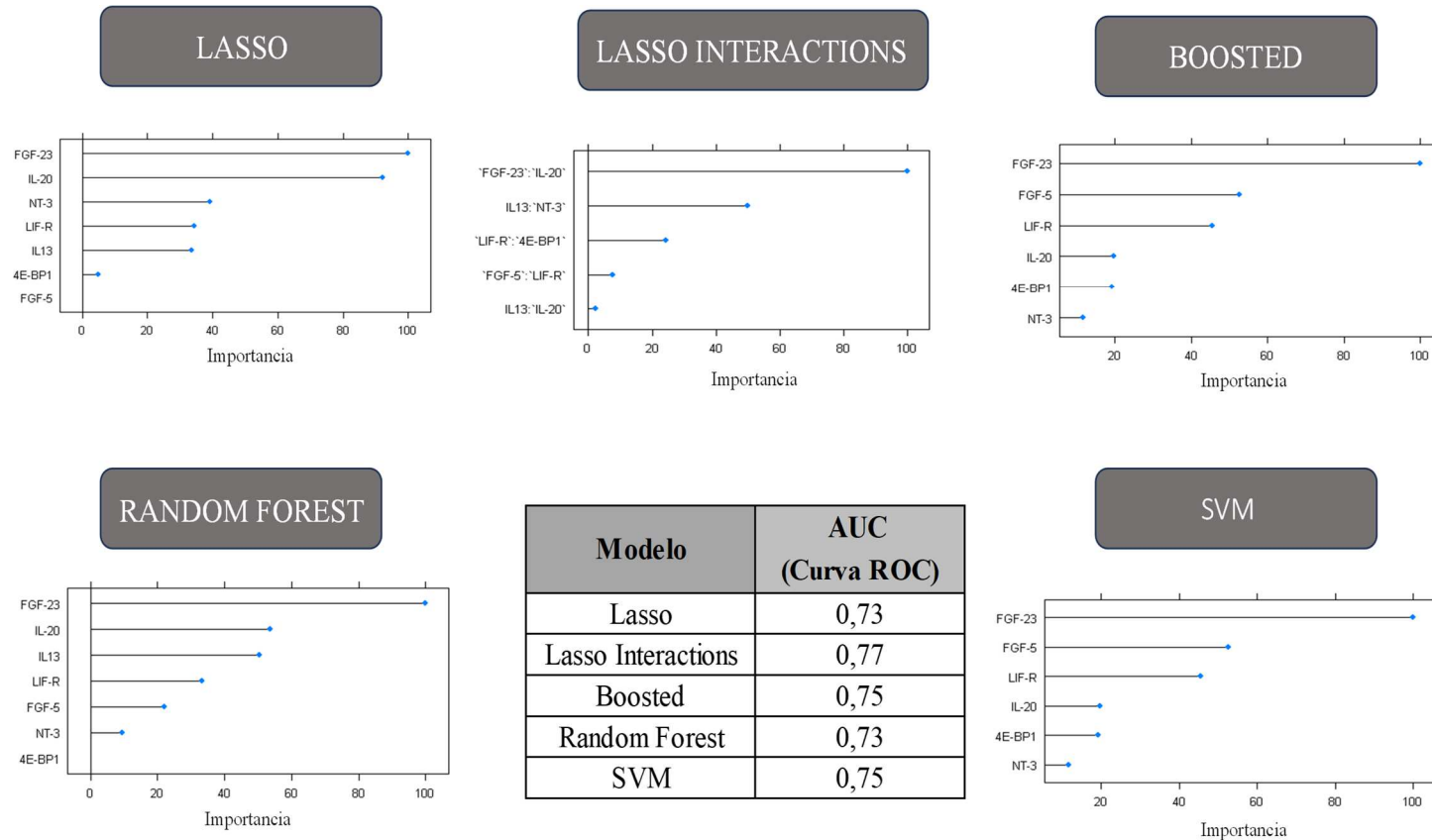
**Figura 18. Diagrama volcano plot de las diferentes proteínas en el ensayo PEA.** Un total de 7 proteínas se encontraron diferencialmente expresadas entre MACE-30d vs. NO MACE-4a. Cinco de ellas sobreexpresadas [(FGF-5, LIF-R, NT-3, 4E-BP1, FGF-23), representadas en color rojo] y 2 infraexpresadas [(IL-13, IL-20), representadas en color azul]. Aquellas proteínas sin diferencias de expresión entre ambos grupos se representan en color gris. **IL**, interleucina; **FGF**, factor de crecimiento de fibroblastos; **LIF-R**, receptor del factor inhibidor de la leucemia; **NT-3**, neurotrofina-3; **4E-BP1**, proteína 1 de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E.

Entre todas estas proteínas, la más significativa fue el FGF-23, ya que sus niveles fueron significativamente mayores en los 38 MACE-30d vs. 38 NO MACE-4a (7,76 vs. 2,37 NPX;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 19**). Además, el análisis de las 7 proteínas diferencialmente expresadas mediante modelos bioinformáticos de clasificación y regresión (*Lasso*, *Lasso Interactions*, *Boosted*, *Random Forest*, *SVM*), mostró al FGF-23 como la proteína con mayor capacidad discriminadora entre ambos grupos estudiados (**Figura 20**).



**Figura 19. Niveles plasmáticos de FGF-23 en la cohorte de descubrimiento (ensayo PEA).** Se comparan los niveles de la proteína en el grupo NO MACE-4a (n=29) vs. MACE-30d (n=31). NPX, *Normalized Protein eXpression*. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (*Mann-Whitney test*).

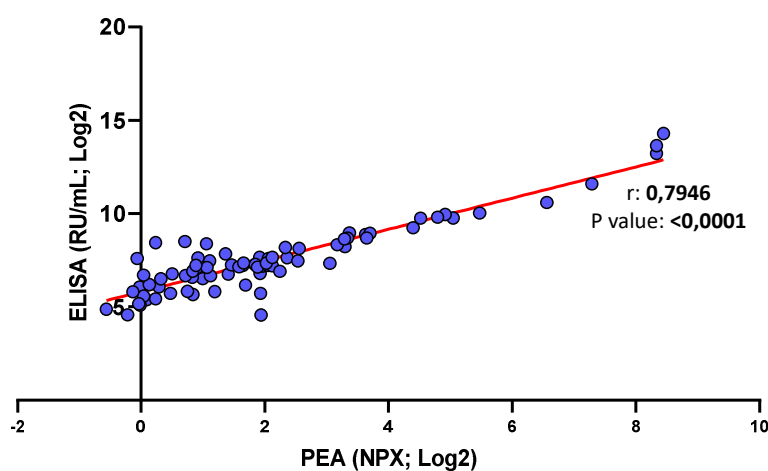
### CAPÍTULO III. Resultados



**Figura 20. Análisis bioinformático de las 7 proteínas diferencialmente expresadas.** Se han utilizado los siguientes modelos de clasificación y regresión: *Lasso* (operador de selección y contracción mínima absoluta), *Lasso Interactions*, *Boosted*, *Random Forest* (basado en árboles de decisión) y *SVM* (máquina de vectores de soporte). La proteína con mayor peso discriminatorio entre ambos grupos estudiados (MACE-30d vs. NO MACE-4a) fue el FGF-23. **IL**, interleucina; **FGF**, factor de crecimiento de fibroblastos; **LIF-R**, receptor del factor inhibidor de la leucemia; **NT-3**, neurotrofina-3; **4E-BP1**, proteína 1 de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E; **AUC**, área bajo la curva.

### 3.2.2. Validación de los niveles plasmáticos de FGF-23 por ELISA

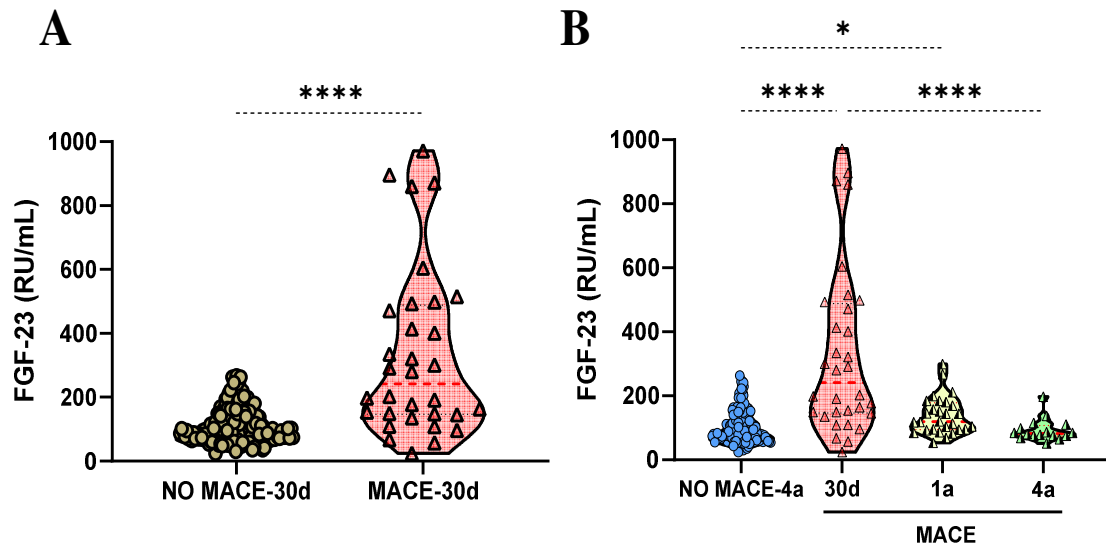
Para validar los resultados obtenidos por el ensayo PEA, y antes de medir los niveles de proteína en la cohorte global de pacientes, se midieron los niveles de FGF-23 en la cohorte de descubrimiento mediante un ensayo ELISA comercial. Observamos que los niveles de FGF-23 medidos en estos 76 pacientes mediante ambas técnicas mostraron un coeficiente de correlación de *Spearman* de 0,795 ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 21**), lo que daba robustez a los datos obtenidos mediante la tecnología Olink®, y garantizaba el empleo del ELISA comercial para ampliar y comparar resultados.



**Figura 21. Análisis de correlación entre los niveles de FGF-23 medidos por PEA vs. ELISA.** Se representan los valores de FGF-23 en 76 pacientes con NAC. Los resultados del PEA (Olink®) se expresan en NPX Log2 (*Normalized Protein eXpression*) y los de ELISA en RU/mL Log2 (*Reference Units*). El nivel de asociación entre ambas técnicas se ha calculado con el coeficiente de correlación de *Spearman*.

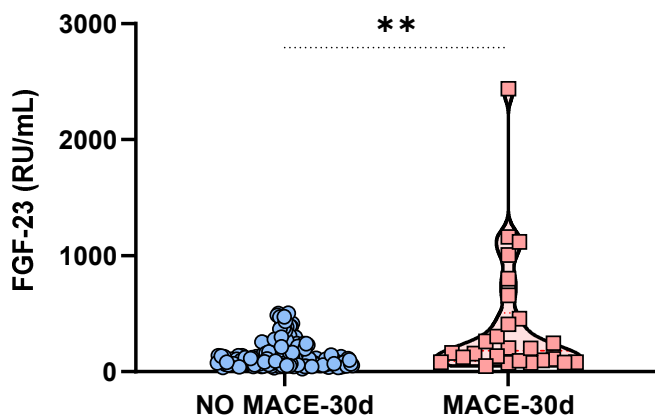
Medimos por ELISA los niveles de FGF-23 en el resto de los pacientes de la **cohorte 1**; observando niveles significativamente superiores de FGF-23 en los MACE-30d (n=32) en comparación con el resto de la cohorte (n=179) ( $332,9 \pm 46,7$  vs.  $108,4 \pm 3,9$  RU/mL;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 22A**). Basándonos en estos resultados, se analizaron los niveles de FGF-23 en aquellos pacientes con un tiempo de aparición de MACE superior a 30 días. Cuando comparamos los pacientes NO MACE-4a (n=135) frente a MACE-1a (n=28), la diferencia en los niveles de FGF-23 se redujo ( $104,4 \pm 4,5$  vs.  $138 \pm 11,0$  RU/mL;  $p = 0,018$ ), pero no fue estadísticamente significativa a largo plazo en MACE-4a (n=16) ( $104,4 \pm 4,5$  frente a  $92,4 \pm 8,7$  RU/mL;  $p > 0,999$ ) (**Figura 22B**). Estos resultados sugieren que los niveles plasmáticos de FGF-23 elevados al ingreso pueden comportarse como un

biomarcador específico predictivo del desarrollo precoz de MACE (a los 30 días) en pacientes con NAC, pero se reduce su capacidad predictora a medio/largo plazo.



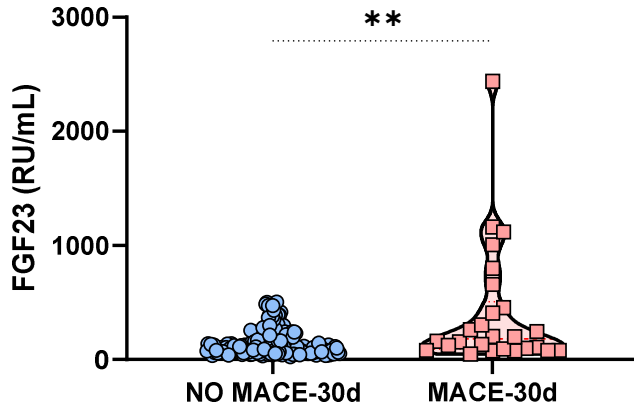
**Figura 22. Niveles plasmáticos de FGF-23 en la cohorte 1 de pacientes con NAC.** (A) Niveles de FGF-23 en los MACE-30d (n=32) frente al resto de la cohorte 1, NO MACE-30d (n=179). (B) Se representan los niveles de FGF-23 en el grupo NO MACE-4a (n=135) frente a los grupos MACE-30d (n=32), MACE-1a (n=28) y MACE-4a (n=16). **RU/mL**, Unidades de referencia por mL. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (Mann-Whitney/ Kruskal-Wallis test).

Dada la relación de FGF-23 con la función renal, decidimos estudiar sus niveles excluyendo del análisis aquellos pacientes que presentaron fallo renal. Comparamos 27 MACE-30d frente a 165 NO MACE-30d, manteniéndose las diferencias encontradas anteriormente, con mayores niveles de FGF-23 en aquellos pacientes con MACE temprano (317, 3 vs. 103, 4 RU/mL;  $p < 0,0001$ ) (Figura 23). Por tanto, los niveles de FGF-23 se confirman como marcador de MACE a 30 días, independientemente de la función renal en nuestra cohorte de pacientes con NAC.



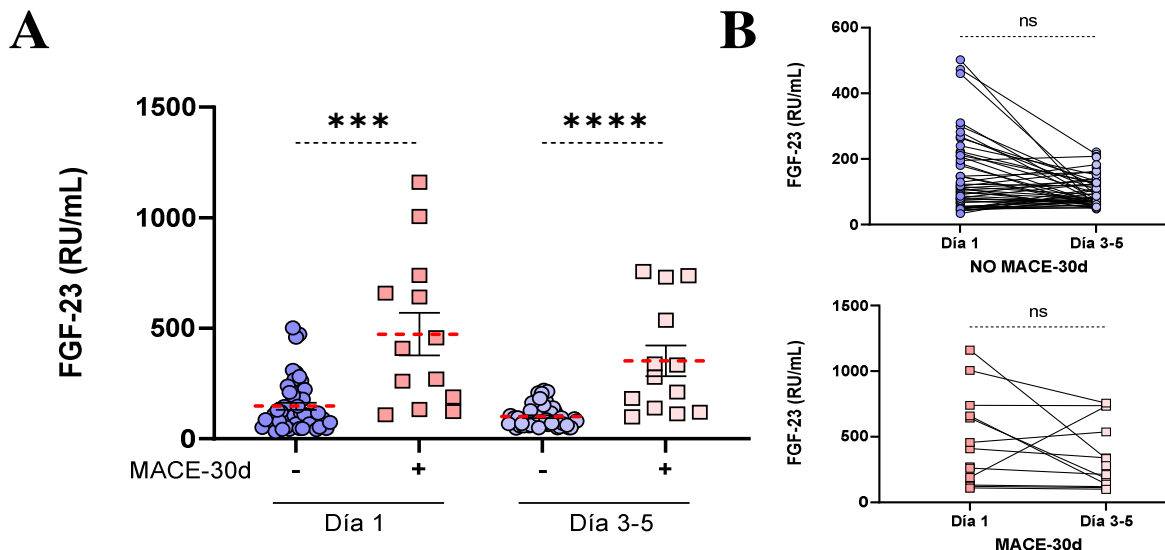
**Figura 23. Niveles plasmáticos de FGF-23 en pacientes sin fallo renal.** Se representan los niveles de FGF-23 en el grupo de pacientes NO MACE-30d (n=165) frente a los MACE-30d (n=27). **RU/mL**, Unidades de referencia por mL. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (Mann-Whitney test).

Por su parte, al estudiar los niveles de FGF-23 en 186 pacientes de la **cohorte 2 y 3**, validamos los resultados observados en la cohorte 1, encontrándose mayores niveles de FGF-23 en los MACE-30d (n=26) frente a los NO MACE-30d (n=160) (407 vs. 154,3 RU/mL;  $p=0,004$ ) (**Figura 24**).



**Figura 24. Niveles plasmáticos de FGF-23 en la cohorte 2 y 3 de pacientes con NAC.** Se representan los niveles de FGF-23 en el grupo de pacientes NO MACE-30d (n=160) frente a los MACE-30d (n=26). **RU/mL**, Unidades de referencia por mL. \*\*  $p<0,01$  (Mann-Whitney test).

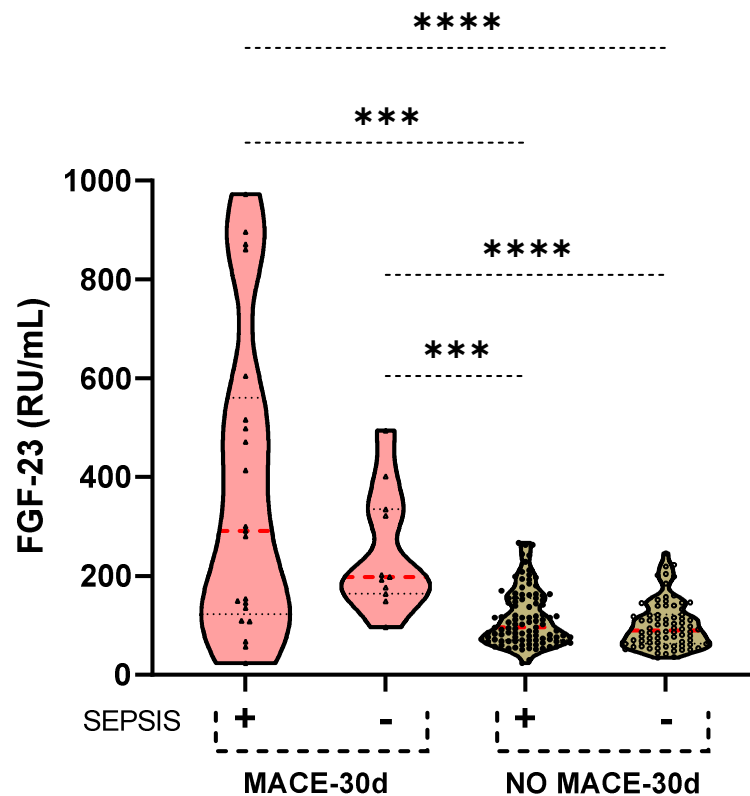
Finalmente, al analizar los niveles plasmáticos de FGF-23 entre los días 3 y 5 del ingreso hospitalario en 70 pacientes con NAC procedentes de la cohorte 2 y 3 (13 MACE-30d y 57 NO MACE-30d), observamos que las diferencias entre ambos subgrupos se mantienen (352,7 vs. 101 RU/mL;  $p <0,0001$ ) (**Figura 25A**). No hubo diferencias en los niveles de FGF-23 de los MACE-30d (473,7 vs. 352,7 RU/mL;  $p=0,448$ ) ni de los NO MACE-30d (148 vs. 101 RU/mL;  $p=0,100$ ), al compararlos con sus respectivos niveles a día 1 del ingreso, aunque de manera general parecen disminuir con el tiempo (**Figura 25B**).



**Figura 25. Niveles plasmáticos de FGF-23 a día 3-5 del ingreso por NAC.** (A) Se comparan los niveles de FGF-23 en una cohorte de 70 pacientes con NAC (13 MACE-30d y 57 NO MACE-30d) a día 1 y a día 3-5 del ingreso hospitalario. (B) Dinámica de los niveles de FGF-23 intra-paciente en los NO MACE-30d y en los MACE-30d. **RU/mL**, Unidades de referencia por mL. \*\*\*  $p<0,001$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ ; ns, no significativo (Kruskal-Wallis / Mann-Whitney test).

## 3.2.3. Niveles plasmáticos de FGF-23 y sepsis

Dada la relación entre la NAC y el desarrollo de sepsis, también se estudiaron los niveles de FGF-23 en este subgrupo de pacientes. El porcentaje de pacientes con sepsis en los MACE-30d fue del 68,4% (26/38) frente al 60,5% (133/220) en el resto de la **cohorte 1** ( $p=0,372$ ) (**Tabla 22**). La relación de FGF-23 y sepsis con MACE se analizó comparando los pacientes con MACE-30d (con sepsis,  $n=21$ ; sin sepsis,  $n=11$ ) frente a los NO MACE-30d (con sepsis,  $n=103$ ; sin sepsis,  $n=76$ ). Encontramos un descenso, aunque no significativo, en los niveles de FGF-23 en los pacientes con MACE-30d según desarrollaran o no sepsis (377,3 vs. 248,2 RU/mL;  $p>0,05$ ) y en el resto de la cohorte (114,5 vs. 100,9;  $p>0,05$ ) (**Figura 26**). Así pues, los niveles plasmáticos de FGF-23 parecen estar relacionados principalmente con el evento cardiovascular, independientemente de desarrollar un evento infeccioso grave posterior a la NAC.



**Figura 26.** Análisis de los niveles de FGF-23 en función de desarrollar MACE y sepsis en la cohorte global de pacientes con NAC. Se comparan los MACE-30d con ( $n=21$ ) y sin ( $n=11$ ) sepsis frente a los NO MACE-30d con ( $n=103$ ) y sin ( $n=76$ ) sepsis posterior. RU/mL, unidades de referencia por mL. \*\*\*  $p<0,001$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$  (Kruskal-Wallis test).

### 3.2.4. Modelo clínico-biológico de ML predictor de MACE en pacientes con NAC

En una primera aproximación, nuestros colaboradores clínicos seleccionaron 12 variables clínicas altamente relacionadas con el riesgo de MACE: edad, sexo, asistencia, cardiopatía crónica, obesidad, diabetes mellitus, dislipemia, hipertensión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, índice de comorbilidad de Charlson e índices de gravedad de la neumonía (FINE y CURB-65). Se identificaron seis variables estadísticamente significativas en los MACE-30d respecto a los NO MACE-30d (**Tabla 22**).

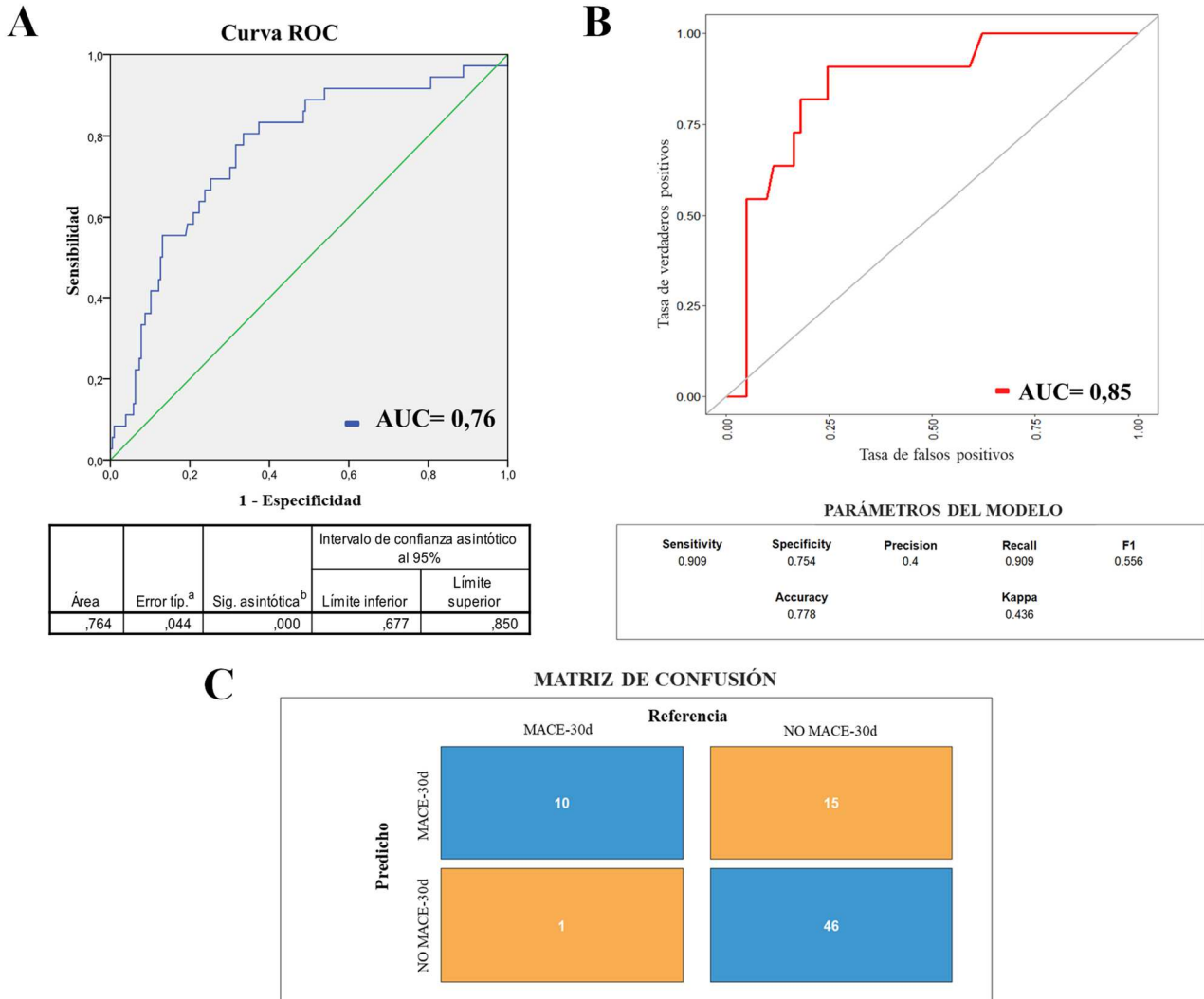
La capacidad predictiva de los niveles plasmáticos de FGF-23, evaluada mediante un análisis de curva ROC, de desarrollar un MACE a 30 días desde el ingreso, mostró un AUC de 0,76 (0,68-0,85 IC 95%) (**Figura 27A**). El modelo *XGBoost* generó un algoritmo clínico-biológico con un poder predictivo del 85% para MACE-30d (AUC 0,85; Recall 0,909; F1 0,556), definido por 3 variables: edad, hipertensión arterial y niveles plasmáticos de FGF-23 (**Figura 27B**). La evaluación del rendimiento del modelo en la subcohorte de *testing* mediante una matriz de confusión clasificó los pacientes con MACE-30d con una precisión del 90%, y a los NO MACE-30d con un 75% (**Figura 27C**). Estos resultados muestran que la integración de los niveles plasmáticos de FGF-23 con variables clínicas de rutina al ingreso, muestran un potencial valor pronóstico de MACE precoz en pacientes con NAC.

### 3.3. ESTUDIO DEL EFECTO FUNCIONAL *IN VITRO* DEL FGF-23 EN TROMBO-INFLAMACIÓN

Con el fin de investigar un posible efecto funcional del FGF-23 que relacionara niveles altos con el desarrollo de MACE temprano, investigamos su efecto en el desarrollo de eventos trombo-inflamatorios. Para ello analizamos su efecto *in vitro* en neutrófilos (formación de NET) y monocitos/células endoteliales (formación de FT).

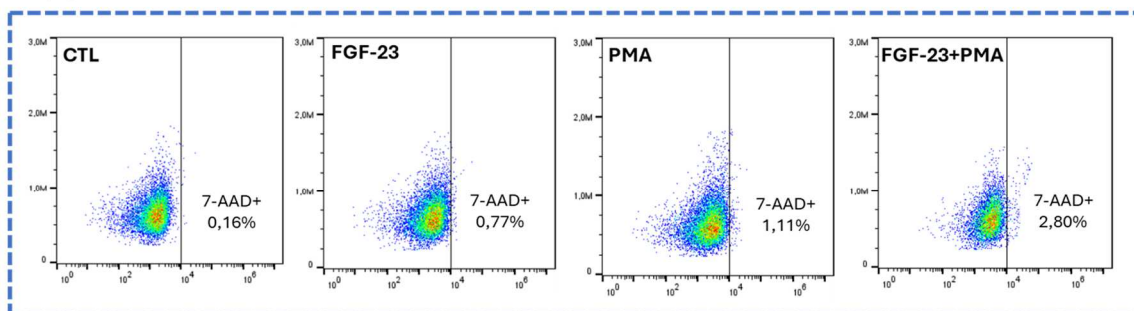
#### 3.3.1. FGF-23 no afecta a la viabilidad de los neutrófilos

Analizamos la viabilidad celular para comprobar el efecto del FGF-23 tanto a tiempo cero como tras dos horas de incubación, con y sin PMA a dosis alta (40 nM), obteniéndose tasas de viabilidad entre el 90-99%, por lo que el FGF-23 no afecta la viabilidad de los neutrófilos (**Figura 28**).

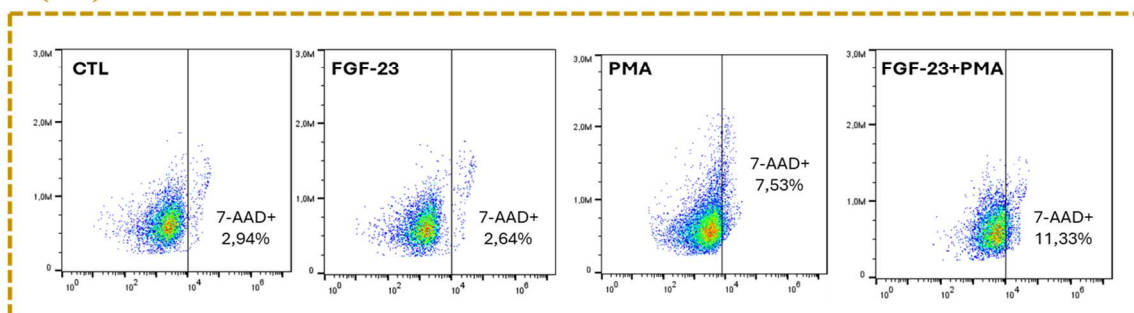


**Figura 27. Modelo predictor de MACE temprano en pacientes con NAC. (A)** Modelo predictivo de curva ROC, en el que solo se han enfrentado los niveles de FGF-23 medidos por ELISA (RU/mL) con el desarrollo de MACE temprano ( $\leq 30$  días). Este modelo mostró una capacidad predictiva del 76 % (AUC 0,76; 0,68-0,85 IC 95%). **(B)** Modelo final del algoritmo clínico-biológico desarrollado mediante herramientas de *machine learning* (*XGBoost*), definido por 3 variables (edad, hipertensión arterial y niveles plasmáticos de FGF-23) y con una capacidad predictiva de MACE temprano del 85% (AUC 0,850; Recall 0,909; F1 0,556). **(C)** Matriz de confusión del modelo aplicada a la cohorte de *testing*.

T(0)



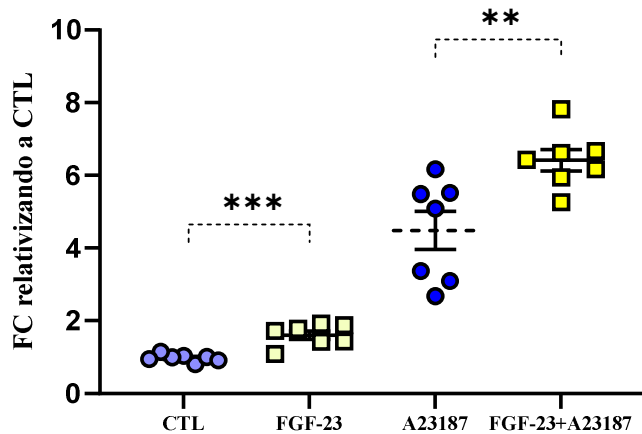
T(2h)



**Figura 28. Ensayo de viabilidad celular.** Se representa el porcentaje de mortalidad celular (7-AAD+) analizado por citometría de flujo a tiempo cero (T0) y tras dos horas de incubación (T2h), en neutrófilos control (CTL), tratados con 100 ng/mL de FGF-23, con PMA a 40 nM y el doble tratamiento con FGF-23 y PMA.

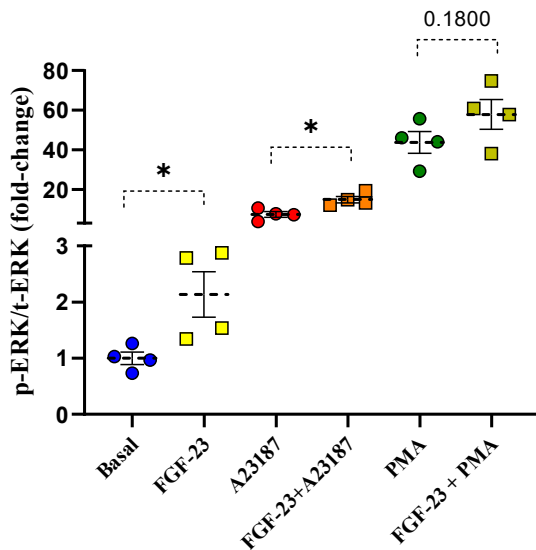
### 3.3.2. FGF-23 aumenta la NETosis

Evaluamos la capacidad NETótica de los neutrófilos humanos de controles sanos *in vitro* mediante ELISA de los complejos de citH3/DNA (N=6). Observamos un incremento significativo de los niveles de citH3/DNA en los neutrófilos tratados con 100 ng/mL FGF-23 en comparación con los controles (sin tratamiento con FGF-23) (Absorbancia: 0,146 vs. 0,241; FC: 1 vs. 1,605;  $p=0,0002$ ). Esta diferencia se mantiene cuando comparamos los neutrófilos activados con A23187, con y sin FGF-23 (Absorbancia: 0,921 vs. 0,673; FC: 6,417 vs. 4,486;  $p=0,008$ ) (**Figura 29**). Este resultado muestra por primera vez a nuestro conocimiento una implicación de la proteína FGF-23 como inductor de la NETosis *in vitro*.

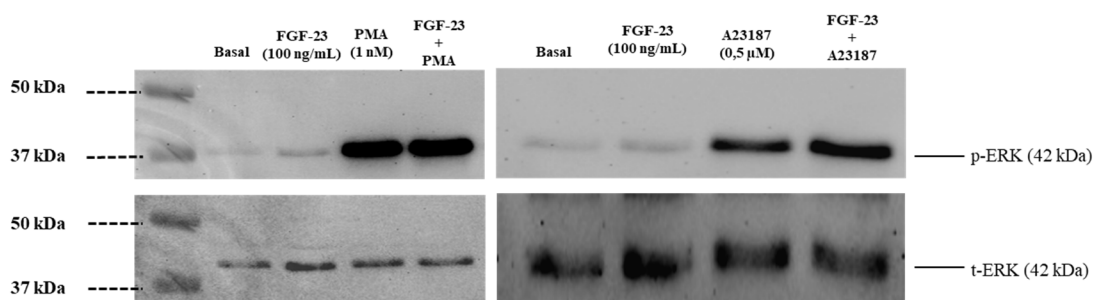


**Figura 29. Análisis de los niveles de citH3/DNA medidos por ELISA.** Se comparan neutrófilos basales sin tratar (control, CTL) respecto a neutrófilos incubados con 100 ng/mL de FGF-23; y neutrófilos activados con 0,5  $\mu$ M de ionóforo de calcio (A23187) respecto al tratamiento con FGF-23 más ionóforo (FGF-23+A23187). Los resultados se expresan en *fold change* (FC) relativizando a la expresión en la condición control. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (*Unpaired t-test*).

Por su parte, el análisis de la vía de señalización ERK mediante western blot (N=4), reveló un aumento significativo de los niveles de expresión de proteína fosforilada respecto a los niveles de proteína total tras la incubación con 100 ng/mL de FGF-23, tanto en estado basal (FC: 1 vs. 2,1;  $p=0,035$ ), como tras la estimulación con A23187 (FC: 7,4 vs. 14,9;  $p=0,012$ ). La activación con PMA aumentó los niveles de fosforilación de ERK, no de manera significativa, pero observándose una tendencia (FC: 43,8 vs. 57,9;  $p=0,180$ ) (Figura 30). Este resultado evidencia nuevamente una activación de la NETosis por el FGF-23 a través de la señalización de la vía de las MAPK.

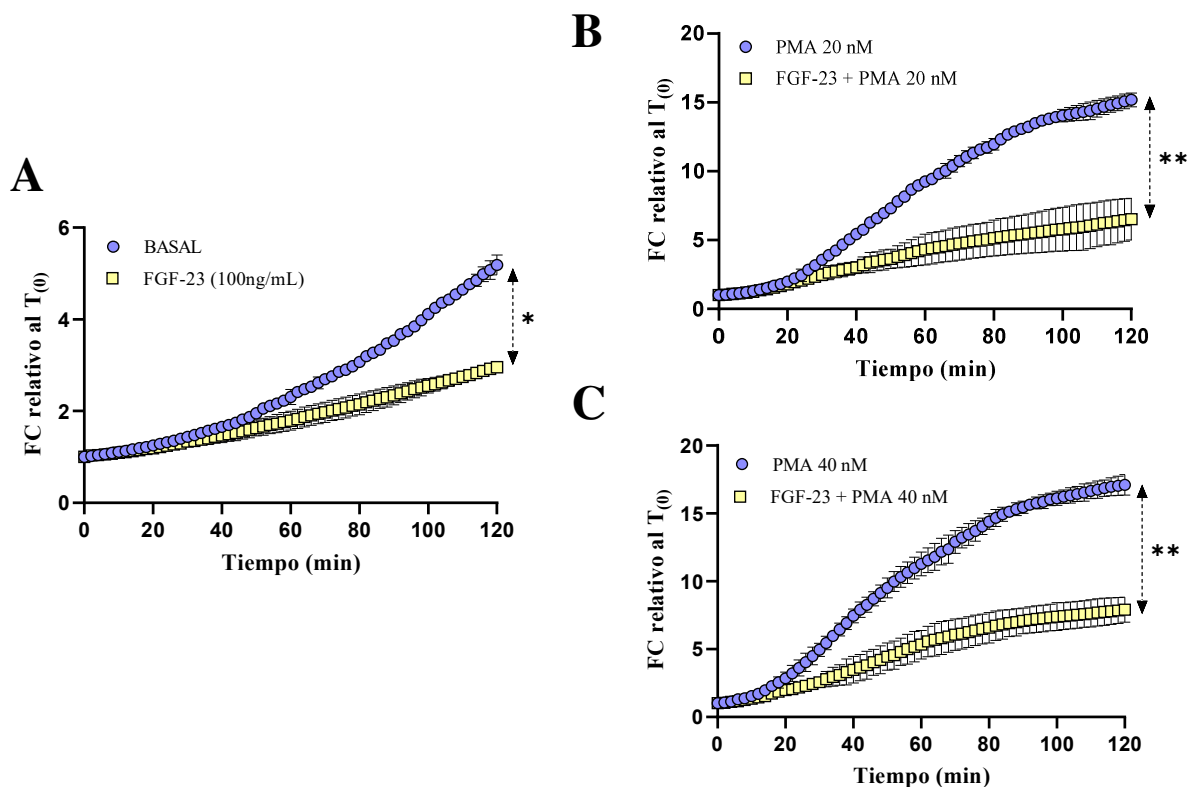


**Figura 30. Análisis densitométrico de los niveles de expresión de ERK.** Se comparan neutrófilos basales sin tratar respecto a neutrófilos incubados con 100 ng/mL de FGF-23, neutrófilos activados con 0,5  $\mu$ M de A23187 frente al tratamiento con FGF-23 más A23187, y neutrófilos activados con 1 nM de PMA versus el tratamiento con FGF-23 más PMA. Los resultados se expresan en *fold change* (FC) relativizando a la expresión proteica (ratio de niveles de proteína ERK fosforilada y proteína ERK total, p-ERK/t-ERK) de la condición basal. \*  $p < 0,05$  (*Unpaired t-test*).



## 3.3.3. FGF-23 inhibe la producción de ROS

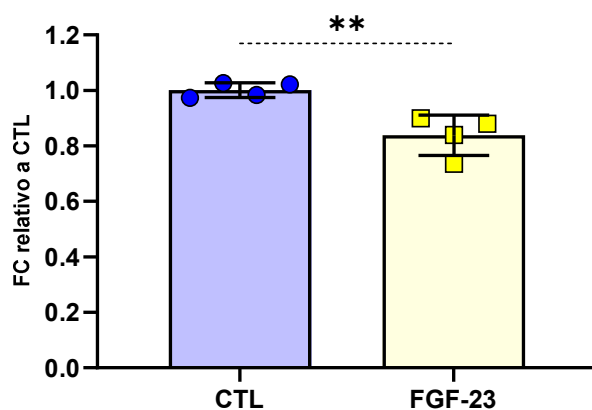
En base a los resultados que muestran una posible relación entre los niveles de FGF-23 y la NETosis *in vitro*, quisimos evaluar de qué manera afectaba esta proteína a otra parte esencial de este proceso, la generación de ROS. De manera contraria a lo que cabría esperar, observamos que el FGF-23 disminuye significativamente la producción de ROS citosólicos (N=4), evaluada mediante el AUC, tanto de manera basal (AUC: 289 vs. 211;  $p=0,019$ ), como con distintas concentraciones de PMA, a 20 nM (AUC: 958,4 vs. 458,6;  $p=0,010$ ) y a 40 nM (AUC: 1155 vs. 555,5;  $p=0,008$ ) (Figura 31). Este resultado nos hace plantearnos la hipótesis de que quizá el FGF-23 estimule la NETosis vital independiente de la liberación de ROS.



**Figura 31. Análisis cinético por fluorimetría de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).** (A) Se compara la generación de ROS en neutrófilos sin tratar (BASAL) *versus* neutrófilos incubados con 100 ng/mL de FGF-23. (B) Neutrófilos activados con 20 nM de PMA *versus* neutrófilos incubados con FGF-23 y PMA. (C) Neutrófilos activados con 40 nM de PMA *versus* neutrófilos incubados con FGF-23 y PMA. Para todas las condiciones, se tomó una lectura de fluorescencia cada 2 minutos durante 2 horas. El análisis estadístico se ha realizado mediante el AUC de las curvas generadas. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ .

### 3.3.4. FGF-23 altera la capacidad fagocítica

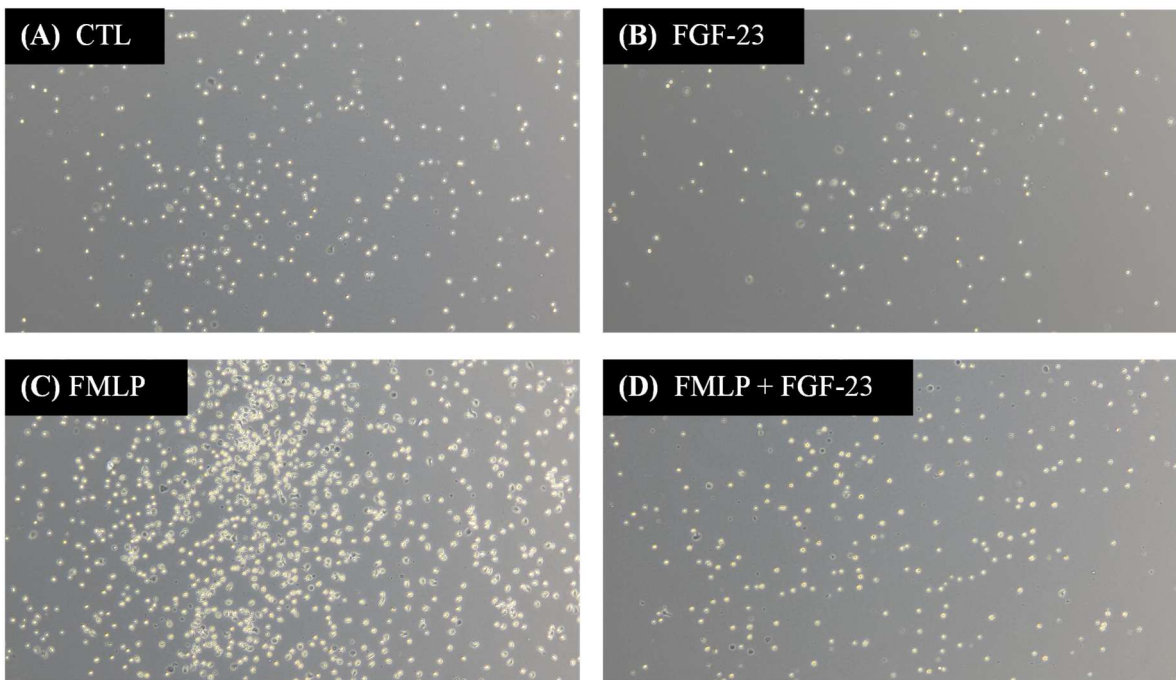
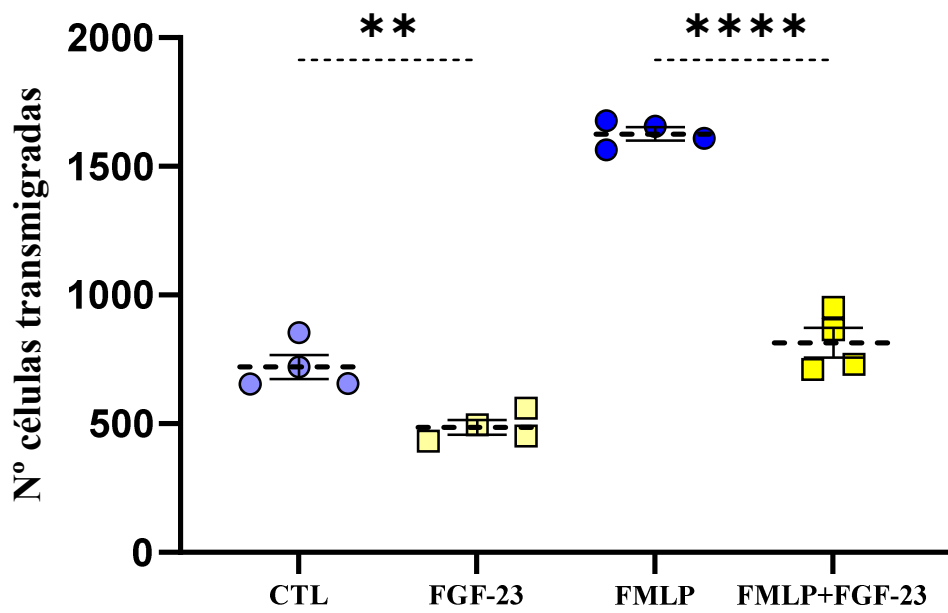
Evaluamos otras funciones de los neutrófilos más allá de la NETosis, en relación con su papel clave ante una infección. Mediante ensayo de citometría de flujo, estudiamos como el FGF-23 afectaba a la fagocitosis bacteriana (N=4), observándose una reducción significativa del 17% en la capacidad fagocítica de los neutrófilos respecto a los no tratados con FGF-23 (FC: 1 vs. 0,83, relativo a los valores de mediana de fluorescencia;  $p=0,006$ ) (**Figura 32**). Por lo que el FGF-23 no afecta la viabilidad de los neutrófilos, pero si a su funcionalidad *in vitro*.



**Figura 32. Ensayo de fagocitosis bacteriana.** Se representa la comparación entre neutrófilos incubados con la cepa K12 de *E. coli* (CTL) versus neutrófilos pretratados con FGF-23 (100 ng/mL) previo a la incubación bacteriana. Los valores se expresan como fold change (FC) relativo a los valores de mediana de fluorescencia de la condición control. \*\*  $p<0,01$  (*Unpaired t-test*).

### 3.3.5. FGF-23 reduce la migración

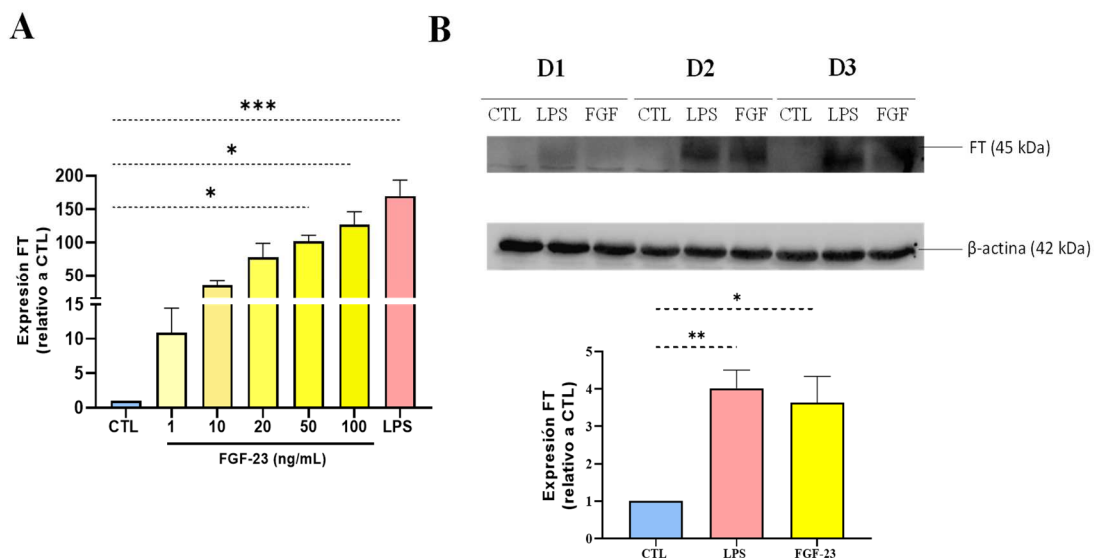
Otra de las funciones claves de los neutrófilos es la migración al foco de la infección desencadenando una respuesta inmunitaria primaria. El ensayo de transmigración (N=4) reveló que tras la adición al medio de FGF-23 en un sistema *Transwell*, la capacidad migratoria de los neutrófilos se redujo significativamente, tanto en condiciones basales (células transmigradas: 721,1 vs. 485,6;  $p=0,008$ ), como con el quimioatrayente fMLP (células transmigradas: 1627 vs. 814,9;  $p<0,0001$ ) como control positivo del ensayo (**Figura 33**). Por lo que estos resultados podrían sugerir que niveles elevados de FGF-23 alterarían la defensa del huésped ante una infección al interferir directamente en el reclutamiento celular.



**Figura 33. Ensayo de trans migración celular.** Se compara el número de células transmigradas bajo diferentes condiciones: **(A)** neutrófilos control sin tratamiento; **(B)** neutrófilos incubados con 100 ng/mL de FGF-23; **(C)** neutrófilos tratados con el quimioatrayente fMLP a una concentración de 100 nM; **(D)** neutrófilos incubados con fMLP y FGF-23. **fMLP**, N-formil-metionil-leucil-fenilalanina. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (*Unpaired t test*).

## 3.3.6. FGF-23 aumenta la expresión de FT

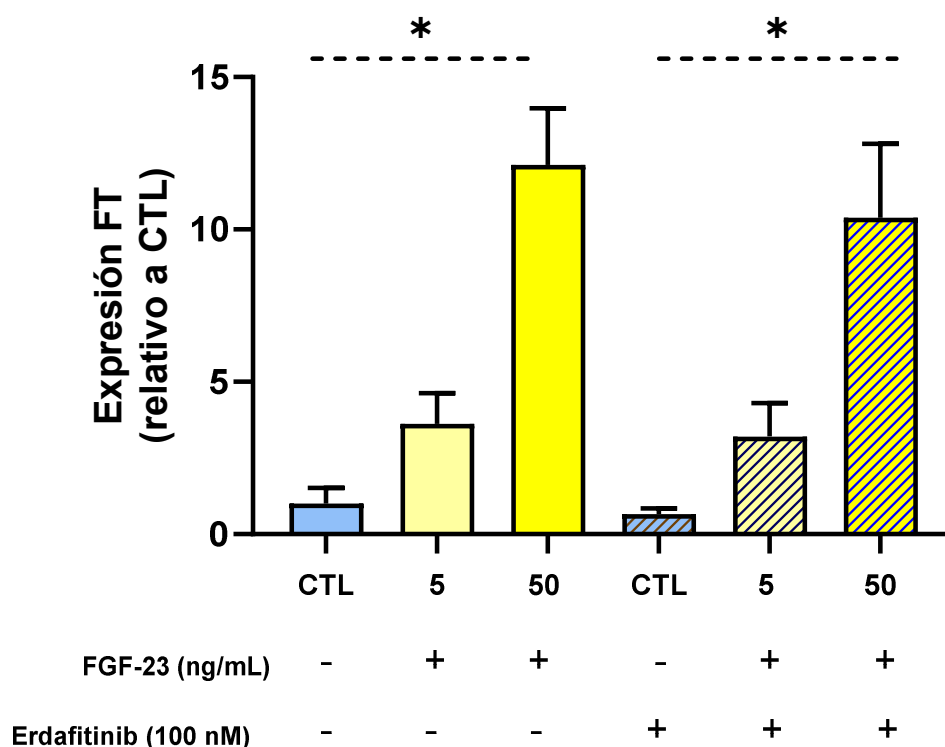
Junto a los neutrófilos, los monocitos son otro tipo celular con importante papel en un contexto de inmunotrombosis. Mediante RT-qPCR (N=3), hemos observado un aumento significativo de los niveles de expresión de FT (valores FC) de manera dosis dependiente a diferentes concentraciones de FGF-23, respecto a monocitos no tratados: 1 ng/mL (FC: 10,9;  $p=0,998$ ), 10 ng/mL (FC: 34,8;  $p=0,731$ ), 20 ng/mL (FC: 77,8;  $p=0,090$ ), 50 ng/mL (FC: 101,8;  $p=0,020$ ) y 100 ng/mL (FC: 126,7;  $p=0,032$ ). Como control positivo del ensayo, utilizamos monocitos tratados con 10 ng/mL de LPS (FC: 169,5;  $p=0,0002$ ). Se alcanzó un *plateau* de expresión de FT con 50 ng/mL de FGF-23 (**Figura 34A**). Mediante western blot confirmamos estos resultados, observándose mayores niveles de proteína tras la activación con LPS (FC: 4,02;  $p=0,009$ ) y FGF-23 a 50 ng/mL (FC: 3,64;  $p=0,016$ ) en lisados de PBMC individuales de 3 donantes sanos (D1, D2 y D3) (**Figura 34B**).



**Figura 34. Análisis de la expresión de factor tisular (FT) en monocitos humanos. (A)** Expresión de FT analizada mediante RT-qPCR en monocitos sin tratar (CTL), bajo diferentes dosis de FGF-23 (1, 10, 20, 50, 100 ng/mL) y tras la activación con 10 ng/mL de LPS. **(B)** Expresión de FT analizada mediante WB en monocitos sin tratar (CTL), estimuladas con 50 ng/mL de FGF-23, y tras la activación con 10 ng/mL de LPS. **D**, donante. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$  (Kruskal-Wallis / Mann-Whitney).

### 3.3.7. El inhibidor erdafitinib no reduce la expresión de FT inducida por FGF-23

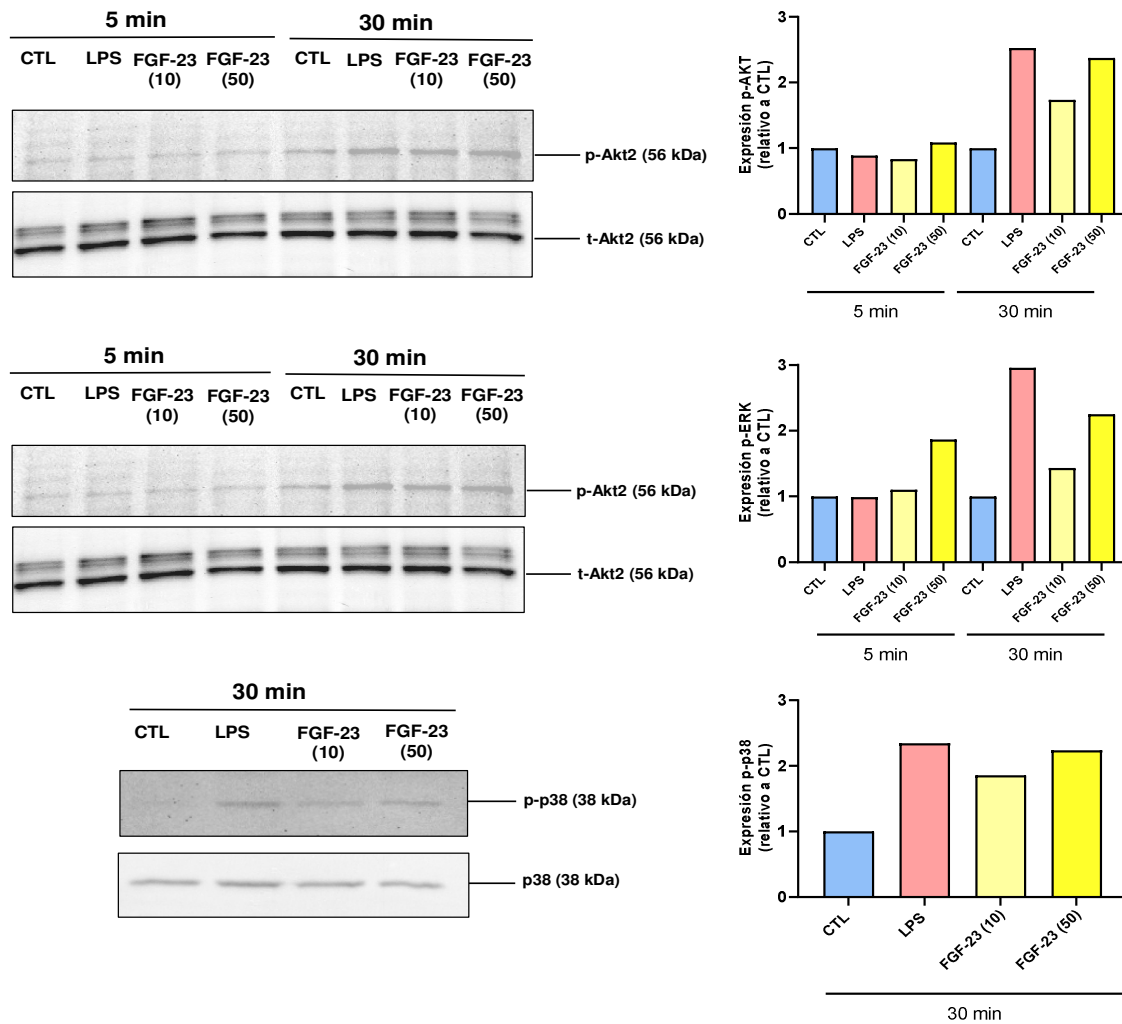
Quisimos evaluar si el aumento de la expresión de FT observado tras la incubación con FGF-23 en monocitos humanos era debido a la señalización mediada por su receptor. Mediante RT-qPCR (N=3) observamos que tras la incubación de los monocitos durante 1 hora con un pan-inhibidor de FGFR, erdafitinib a dosis de 100 nM, la expresión de FT tras la exposición con FGF-23 se vio ligeramente reducida respecto a los monocitos incubados con FGF-23 sin erdafitinib, aunque no de manera significativa. Además, no observamos efecto inhibitorio del erdafitinib incluso a la dosis más baja de FGF-23 utilizada: 5 ng/mL (FC: 3,6 vs. 3,2;  $p=0,686$ ) y 50 ng/mL (FC: 12,1 vs. 10,5;  $p=0,686$ ) (Figura 35).



**Figura 35. Análisis de expresión de factor tisular (FT) tras el tratamiento con el inhibidor erdafitinib en monocitos humanos.** Expresión de FT analizada mediante RT-qPCR en monocitos individuales de 4 donantes sin tratar (CTL), bajo diferentes dosis de FGF-23 (5, 50 ng/mL) y preincubados con 100nM del pan-inhibidor de FGFR erdafitinib durante 1 hora. La expresión de FT para cada condición se representa mediante los valores de FC relativos a la condición CTL sin tratar. Las barras con fondo sólido representan monocitos sin el inhibidor y las barras con fondo rayado los monocitos tratados con el inhibidor. \*  $p<0,05$  (Mann-Whitney test).

## 3.3.8. FGF-23 activa diferentes vías de señalización

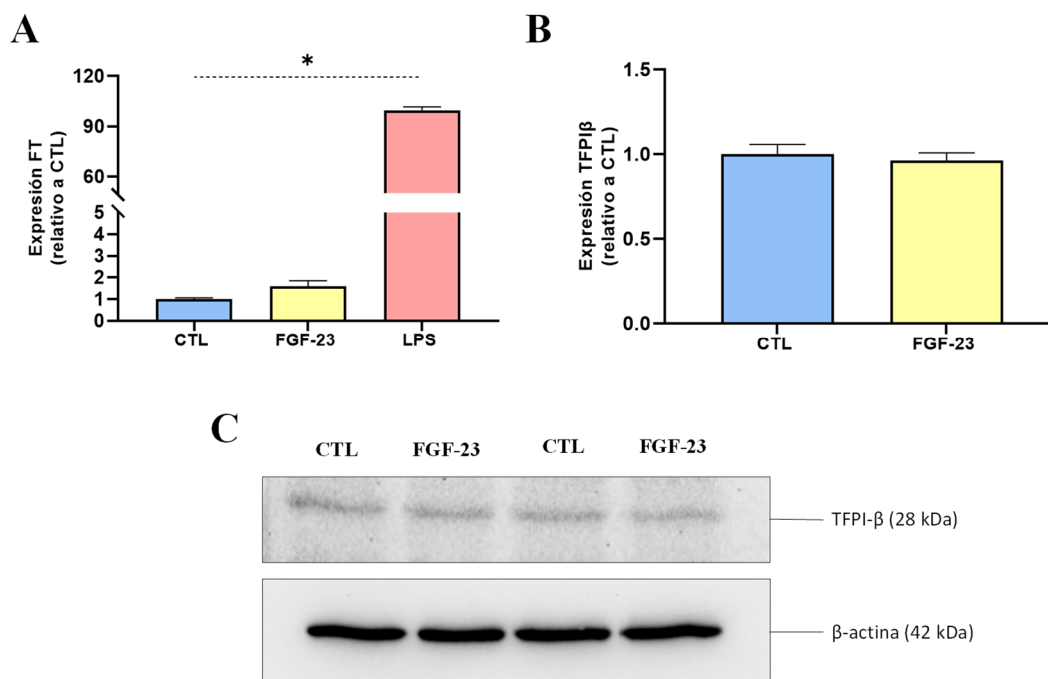
Mediante WB analizamos la activación de diferentes vías de señalización implicadas en la activación de los monocitos. Observamos que tanto el tratamiento con LPS a 10 ng/mL como la incubación con FGF-23 a 10 y 50 ng/mL, durante 30 minutos, produce un aumento de los niveles de fosforilación en Akt, Erk y p38, respecto a los monocitos control sin tratar (**Figura 36**).



**Figura 36. Análisis de la expresión de los niveles de fosforilación de Akt, Erk y p38 mediante WB en monocitos humanos.** Se comparan monocitos control sin tratar (CTL), monocitos activados con LPS a 10 ng/mL y monocitos incubados con FGF-23 a dosis de 10 y 50 ng/mL, a 5 y 30 minutos de exposición, respectivamente. Los niveles de fosforilación se han obtenido relativizando a los niveles de expresión de proteína total para cada proteína analizada. Las gráficas representan los valores del análisis densitométrico relativizando a la condición control para cada tiempo.

### 3.3.9. FGF-23 no induce respuesta trombo-inflamatoria en células endoteliales

El análisis mediante RT-qPCR (N=3) en células endoteliales HUVEC no mostró diferencias en los niveles de expresión de FT tras la incubación con FGF-23 (100 ng/mL), respecto a las células no tratadas (FC: 1,6;  $p=0,593$ ). El tratamiento con 10 ng/mL de LPS como control positivo del ensayo, si aumentó los niveles de FT de manera significativa (FC: 99,6;  $p=0,023$ ) (**Figura 37A**). A continuación, evaluamos los niveles de expresión del inhibidor de la vía del FT, el TFPI, anticoagulante relevante en el control de actividad de FT. La incubación de las células HUVEC con FGF-23 (100 ng/mL) no alteró la expresión de TFPI $\beta$  (isoforma expresada en la membra de células endoteliales) ni a nivel de mRNA (FC: 0,96;  $p=0,700$ ) ni a nivel proteico mediante WB, respecto a células control sin tratamiento (**Figura 37B-C**).



**Figura 37. Análisis de la expresión de factor tisular (FT) y del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI) en células endoteliales.** (A) Expresión de FT analizada mediante RT-qPCR en células HUVEC sin tratar (CTL), incubadas con 100 ng/mL de FGF-23 y tras la activación con LPS a 10 ng/mL. (B) Expresión de TFPI $\beta$  analizada mediante RT-qPCR en células HUVEC sin tratar (CTL) y tras la incubación con FGF-23 a 100 ng/mL. (C) Expresión proteica de TFPI $\beta$  analizada mediante WB en células HUVEC sin tratar (CTL) y tras la incubación con FGF-23 a 100 ng/mL \*  $p<0,05$  (Kruskal-Wallis / Mann-Whitney).

## **Discusión**

#### 4. DISCUSIÓN

Grandes estudios epidemiológicos, con largos seguimientos, describen una alta incidencia de MACE en pacientes con infección, relacionado con la inflamación sistémica, disfunción endotelial y estado protrombóticos, que requiere de la búsqueda de potenciales biomarcadores con buena capacidad predictora de complicaciones cardiacas asociadas a la NAC. El presente capítulo de Tesis aborda la búsqueda de biomarcadores plasmáticos de MACE en pacientes con NAC, con especial interés en el papel que juega la tromboinflamación en un contexto de infección.

Hemos identificado al FGF-23 como un prometedor biomarcador de MACE temprano en pacientes ingresados por NAC, demostrando que sus niveles plasmáticos elevados se correlacionan positivamente con estos eventos en los primeros 30 días tras la infección. El FGF-23 pertenece a la familia de factores de crecimiento de fibroblastos, en concreto a la subfamilia FGF19 de señalización endocrina, junto al FGF-19 y FGF-21.<sup>276</sup> Se trata de una glicoproteína de 251 aminoácidos (32 kDa), sintetizada principalmente por osteocitos y osteoblastos, y cuya función principal es el mantenimiento de la homeostasis del fosfato, al aumentar la fosfaturia, junto con la reducción de la producción renal de calcitriol. A su vez, también disminuye la producción de la hormona paratiroidea. Estos efectos se engloban dentro de la vía clásica de actuación del FGF-23 mediada por la interacción con el receptor FGFR1, actuando la proteína  $\alpha$ -Klotho como cofactor.<sup>277</sup> El FGF-23 circulante consta de un extremo amino, conservado filogenéticamente, como sitio de unión a los FGFR, y un extremo carboxilo que interactúa con Klotho, lo que inicia la vía de señalización celular a través de FRS2 $\alpha$ , activando a la vía MAPK (ERK1/2).<sup>278</sup>

En el año 2000 se describió que mutaciones activadoras en FGF-23 se asocian con el raquitismo hipofosfático autosómico dominante (XLH).<sup>279</sup> También se ha informado de una producción ectópica desregulada de FGF-23 en tumores mesenquimales, como factor causal de la osteomalacia inducida por tumores (TIO), un síndrome paraneoplásico poco frecuente.<sup>280</sup> Por su parte, está documentado que durante la ERC se produce un aumento de los niveles circulantes de FGF-23, siendo más elevados a medida que disminuye la función renal.<sup>281</sup> En los últimos años se han demostrado efectos perjudiciales del FGF-23, más allá de su papel en la homeostasis mineral a nivel renal, en otros órganos como el corazón, hígado, la estructura ósea o el sistema inmunológico, a través de una

vía de señalización no clásica (independiente de Klotho), y en la que intervienen diferentes FGFRs.<sup>282</sup>

El FGF-23 es considerado un biomarcador de inflamación crónica, y existen varias líneas de evidencia sobre el papel fisiopatológico de esta proteína en el contexto de ERC y patología cardiovascular. En 2008, se mostró por primera vez que los niveles elevados de FGF-23 en suero se asociaban con un aumento de la mortalidad como factor de riesgo independiente en pacientes en hemodiálisis con ERC.<sup>283</sup> A su vez, los niveles elevados de esta proteína se han asociado con un mayor riesgo de ingreso por infecciones graves, ECV y mortalidad por cualquier causa en grandes cohortes o en pacientes con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis.<sup>284-286</sup> En patologías como la hipertrofia ventricular izquierda, la FA y el IAM los niveles de FGF-23 también han mostrado una relación con el pronóstico adverso en la enfermedad.<sup>287-289</sup> Por su parte, los tratamientos que reducen los niveles de FGF-23 como la diálisis intensiva o fármacos calcimiméticos como el cinacalcet (NCT00345839), han reportado tasas reducidas de mortalidad por todas las causas, entre ellas la cardiovascular, en pacientes en etapa terminal de la ERC.<sup>290,291</sup>

En nuestra cohorte de pacientes con NAC y una tasa de MACE del 14,7%, acorde a la reportada en la literatura,<sup>25,30</sup> los niveles plasmáticos de FGF-23 mostraron un buen valor predictivo de MACE temprano (AUC 0,764) postulándolo como un biomarcador prometedora del riesgo cardiovascular en esta enfermedad, de manera independiente a la función renal. En un contexto infeccioso, como la NAC, la implicación del FGF-23 no está bien dilucidada. Se ha descrito en pacientes hospitalizados por NAC que los niveles séricos de fósforo aumentados se asociaron con tasas de mortalidad a 30 días significativamente más altas (24%; OR 1,9).<sup>292</sup> Por tanto, los niveles de FGF-23, un regulador de la homeostasis del fósforo, podrían estar relacionados con la mortalidad en estos pacientes. A su vez, es interesante la observación de que los niveles plasmáticos de FGF-23 se mantienen elevados a los días 3-5 del ingreso en los MACE-30d respecto a los NO MACE-30d; y, sin embargo, se normalizan a medio/largo plazo. Estos datos indican que los niveles elevados de FGF-23 se comportarían como un marcador temprano, perdiendo su capacidad pronóstica de MACE a largo plazo. La falta de muestra más allá de 3-5 días es una limitación en este sentido, y habría sido determinante para evaluar la evolución de los niveles de FGF-23 intra-paciente.

El auge del uso de herramientas de aprendizaje automático está transformando el escenario de la biomedicina actual. Con el desarrollo de nuestro modelo clínico-biológico utilizando el algoritmo *Gradient Boosting Machine* (GBM), que incluyó 3 variables (edad, hipertensión arterial y niveles plasmáticos de FGF-23), logramos una predicción de MACE a los 30 días del 85%, lo que lo postula como una herramienta prometedora para uso clínico, con el objetivo de perfilar la actuación hospitalaria al ingreso en esta población de riesgo. En el ámbito de la NAC, se están generando nuevos modelos de predicción de riesgo/mortalidad con el objetivo de complementar o incluso mejorar las puntuaciones actuales aplicables en la práctica clínica habitual.<sup>293-295</sup> En cuanto a las limitaciones cabe destacar que se requiere de una validación externa del modelo en una cohorte independiente de pacientes con infección, para confirmar su capacidad predictora de MACE.

Hemos demostrado que el FGF-23 también juega un papel funcional en la respuesta inmunitaria e inflamación. Mostramos una primera evidencia, a nuestro conocimiento, de que el FGF-23 induce la NETosis, tanto en condiciones basales como con el uso de distintos agonistas. Este hecho fue comprobado con la medición de los niveles de los complejos de citH3/DNA, y con el análisis proteico de los niveles de fosforilación de ERK, como indicador de activación de la vía de señalización de las MAPK con relevancia en el proceso de NETosis. La NETosis es un mecanismo ampliamente estudiado en neutrófilos, la cual está descrita que se induce ante un proceso infeccioso y cuya activación descontrolada o prolongada puede generar daño tisular e inflamación crónica en un contexto de ECV.<sup>296-298</sup> Dentro del proceso de NETosis destacan dos tipos: la suicida o lítica (proceso lento, con liberación de NET, dependiente de la NADPH oxidasa y provoca muerte celular) y la vital (proceso rápido, con liberación de NET, independiente de NADPH, no provoca muerte celular, manteniéndose otras funciones celulares).<sup>299</sup> Nuestros resultados en neutrófilos humanos mostraron que la incubación con FGF-23 alteró la funcionalidad *in vitro*, observada por una reducción en la producción de ROS citosólicos, lo cual sugiere que FGF-23 podría estar activando la NETosis vital, ya que la activación no parece depender de la producción de ROS. De la misma manera, mostramos evidencias de que la capacidad fagocítica y migratoria de los neutrófilos se vio reducida por el FGF-23, sin alterar su viabilidad. De hecho, en neutrófilos aislados de un modelo murino de ERC y neumonía inducida, la exposición *in vitro* de *FGF-23* inhibió la funcionalidad de estas células, inhibiendo la producción de ROS, la adhesión y la

migración transendotelial. Estos efectos funcionales se justificaron a través de la señalización del receptor FGFR2, receptor caracterizado en la membrana de los neutrófilos,<sup>300</sup> inhibiendo la activación de la integrina  $\beta 2$ , mediante la activación de PKA y la inhibición de la GTPasa Rap1, hechos reversibles mediante el bloqueo de FGFR2.<sup>301</sup> Nuestros hallazgos funcionales en neutrófilos podrían justificar una respuesta inmunitaria deficiente en aquellos pacientes con NAC y niveles elevados de FGF-23, con un mayor riesgo de desarrollar MACE temprano.

Otras células con un papel relevante en inmunotrombosis son los monocitos/macrófagos, los cuales, a través de diferentes receptores en superficie, inducen respuestas inmunitarias, inflamatorias y procoagulantes.<sup>32</sup> Informamos de un efecto del FGF-23 en monocitos humanos, con un aumento de la expresión (mRNA y proteína) de FT, de manera dosis-dependiente a la concentración de FGF-23 utilizada. En contra, no observamos un efecto en las células endoteliales HUVEC tras la exposición a FGF-23, ni a nivel de expresión de FT ni del inhibidor de su vía de señalización TFPI $\beta$ . Está reportado, que la activación de los monocitos por diferentes estímulos como la exposición a LPS bacteriano (usado en nuestro estudio como control positivo), induce la expresión de FT o fosfatidilserina, como iniciadores de la cascada de la coagulación.<sup>302</sup> Sin embargo, la conexión entre los FGF y la expresión de FT no está dilucidada. En el año 2000 se informó que la administración sistémica del FGF básico (bFGF/FGF-2) indujo un aumento considerable de la expresión de FT en monocitos circulantes y en la pared vascular en un modelo de conejo.<sup>303</sup> En células endoteliales humanas (HUVEC) y en la línea celular ECV304 se observó que el bFGF aumentó la producción de FT tanto de mRNA como de proteína mediante la activación de la transcripción en el sitio de unión de NF- $\kappa$ B, efecto modulado por el ácido fenólfbrico.<sup>304</sup>

El uso del pan-inhibidor de FGFR erdafitinib, no produjo un descenso en los niveles de FT en monocitos tratados con FGF-23. Pese a la evidencia de que el FGFR1 es necesario para la respuesta inflamatoria en macrófagos murinos a través de la señalización PLC $\gamma$ /NF- $\kappa$ B, y cuya inhibición con AZD4547 (fexagratinib) redujo las lesiones ateroscleróticas y la acumulación de lípidos en ratones ApoE<sup>-/-</sup>,<sup>305</sup> la vía de señalización por la cual el FGF-23 podría aumentar los niveles de FT no está esclarecida, pudiendo ser independiente de la señalización por FGFR. De hecho, existen estudios que han demostrado que el FGF-2 interactúa con la integrina  $\alpha v \beta 3$  de manera independiente a FGFR mediando en la

adhesión, angiogénesis y proliferación en células endoteliales.<sup>306</sup> En base a estos hallazgos, hipotetizamos que el FGF-23 podría activar una vía de señalización alternativa a FGFR aún por dilucidar, y serán necesarios experimentos adicionales para confirmarlo.

Finalmente, mostramos una activación tanto de la vía de MAPK como de AKT, mediante un aumento de la fosforilación de las proteínas Erk1/2, p38 y Akt, en monocitos humanos estimulados con LPS y tratados con FGF-23. Está reportado, que la exposición a LPS en células monocíticas humanas aumenta la expresión de FT y TNF- $\alpha$  a través de la activación de vía MAPK (MEK-ERK1/2).<sup>307</sup> A su vez, se ha informado que el tratamiento con FGF-23 en PBMC de donantes sanos y efluentes monocíticos de dializado peritoneal en pacientes con ERC, activó la vía MAPK a través de FGFR1, junto con una inhibición de la síntesis de calcitriol a nivel extrarrenal.<sup>308</sup> El tratamiento con un inhibidor de MEK (PD0325901) en un modelo murino de hipofosfatemia ligada al cromosoma X (Hyp) consiguió aumentar 4 veces las concentraciones séricas de calcitriol, respaldando la hipótesis de que la supresión medida por el FGF-23 a nivel renal depende de la activación de la señalización de MAPK a través de MEK/ERK1/2.<sup>309</sup> El inhibidor específico de FGFR1 (PD173074) en la línea celular murina inmortalizada de macrófagos RAW264.7 bloqueó la estimulación de rFGF-23 sobre la activación de ERK, junto con la inhibición de la expresión del gen TNF- $\alpha$ .<sup>310</sup> En base a estas evidencias, en estudio posteriores sería necesario estudiar el efecto del pan-inhibidor erdafitinib en la fosforilación de estas proteínas para confirmar que la activación de estas vías de señalización es dependiente de FGFR.

En conjunto, los resultados del presente capítulo apoyan la hipótesis de que el FGF-23 no solo actúa como biomarcador pronóstico de MACE temprano, sino también como una posible diana terapéutica, al situarse en un eje mecanicista que podría favorecer la activación de neutrófilos y monocitos en un escenario de trombo-inflamación asociada a MACE. Así, la determinación al ingreso de los niveles plasmáticos de FGF-23 podría contribuir a estratificar el riesgo de MACE en pacientes con NAC, integrándose con otros marcadores clínicos para identificar a pacientes que podrían beneficiarse de intervenciones tempranas dirigidas a modular la respuesta inflamatoria y trombótica. En este contexto, los pacientes con NAC y niveles elevados de FGF-23 al ingreso podrían ser candidatos para iniciar tratamientos específicos como la anticoagulación en aquellos con elevada actividad de FT (valorando criterios clínicos establecidos y estratificación

global del riesgo trombótico), o estrategias anti-NETóticas, aunque el uso de estas deberá sopesarse cuidadosamente debido a su papel crucial en la defensa contra infecciones. Finalmente, el desarrollo de terapias dirigidas contra FGF-23, como el uso del anticuerpo burosumab (para el tratamiento de XLH y TIO),<sup>311</sup> o frente a su vía de señalización,<sup>312</sup> podrían ser una estrategias terapéuticas candidatas, con el fin de reducir los niveles circulantes de esta proteína, atenuar la activación mieloide y reducir el riesgo de eventos trombo-inflamatorios.



---

# CONCLUSIONES

La presente memoria de Tesis aporta nuevos datos sobre diferentes enfoques en la búsqueda de potenciales biomarcadores moleculares como predictores de MACE en pacientes con NAC.

**CAPÍTULO 1** – Mediante técnicas de NGS se reveló que la frecuencia de mutaciones CHIP en genes relacionados con patología cardiovascular, tales como, *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1*, fue mayor en el subgrupo de pacientes que desarrollaron el MACE temprano, siendo el gen *TET2* el más frecuentemente mutado. Los pacientes con mutaciones CHIP fueron de mayor edad (asociación con *TET2*), con prevalencia del sexo femenino (asociación con *DNMT3A*) y una menor SG (asociación *DNMT3A+TET2*) y menor SLE (asociación *TET2*), respecto al grupo sin mutaciones. Dado que el impacto de portar mutaciones CHIP en la reducción de la SG a largo plazo únicamente fue relevante en el subgrupo que no desarrolló MACE precoz, se propone que en aquellos pacientes con MACE temprano a 30 días del ingreso, el propio ECV podría ser el causante directo en la menor SG en estos pacientes de alto riesgo.

**CAPÍTULO 2** - Empleando un enfoque de secuenciación dirigida en una cohorte de descubrimiento se ha detectado un perfil diferencial de miRNA plasmáticos entre pacientes con NAC y MACE temprano y aquellos sin MACE asociado. La validación de estos resultados mediante RT-qPCR nos ha permitido identificar 3 miRNA (miR-206, miR-320a-3p y miR-423-5p) como potenciales biomarcadores de MACE temprano. La integración de variables como la presencia de dislipemia y la historia previa de cardiopatía, a los niveles plasmáticos de miR-320a-3p en un *score* clínico-molecular permite perfilar con alta precisión aquellos pacientes con NAC con mayor riesgo de desarrollar un MACE a 30 días del ingreso.

**CAPÍTULO 3** - Los niveles plasmáticos de la proteína inflamatoria FGF-23, identificados mediante técnicas de proteómica de alto rendimiento, permiten identificar un subgrupo de pacientes con NAC con alto riesgo cardiovascular. Su integración con variables clínicas como la edad y la hipertensión arterial en un modelo de *machine learning* muestra un potencial valor pronóstico de MACE temprano, a 30 días del ingreso, en estos pacientes. Finalmente, el efecto funcional del FGF-23 observado en diferentes tipos celulares con un papel relevante en inmunotrombosis, tales como los neutrófilos y

monocitos, podría justificar su papel como biomarcador de MACE temprano un escenario de trombo-inflamación.

Los datos genómicos (estudio de CHIP), transcriptómicos (análisis del perfil de miRNA circulantes) y proteómicos (niveles plasmáticos de FGF-23) aportados en esta memoria de Tesis abren la puerta hacia la integración de los diferentes enfoques ómicos en un modelo que permita mejorar la predicción de MACE en pacientes con NAC.



## **REFERENCIAS**

---

1. Bender, R. G. *et al.* Global, regional, and national incidence and mortality burden of non-COVID-19 lower respiratory infections and aetiologies, 1990–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Infect. Dis.* **24**, 974–1002 (2024).
2. Troeger, C. *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 1191–1210 (2018).
3. Anderson, R. & Feldman, C. The Global Burden of Community-Acquired Pneumonia in Adults, Encompassing Invasive Pneumococcal Disease and the Prevalence of Its Associated Cardiovascular Events, with a Focus on Pneumolysin and Macrolide Antibiotics in Pathogenesis and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).
4. Ferreira-Coimbra, J., Sarda, C. & Rello, J. Burden of Community-Acquired Pneumonia and Unmet Clinical Needs. *Adv. Ther.* **37**, 1302 (2020).
5. Ranzani, O. T. *et al.* New Sepsis Definition (Sepsis-3) and Community-acquired Pneumonia Mortality. A Validation and Clinical Decision-Making Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 1287–1297 (2017).
6. Rello, J. & Perez, A. Precision medicine for the treatment of severe pneumonia in intensive care. *Expert Rev. Respir. Med.* **10**, 297–316 (2016).
7. Shoar, S. & Musher, D. M. Etiology of community-acquired pneumonia in adults: a systematic review. *Pneumonia (Nathan)*. **12**, (2020).
8. Musher, D. M., Abers, M. S. & Bartlett, J. G. Evolving Understanding of the Causes of Pneumonia in Adults, With Special Attention to the Role of Pneumococcus. *Clin. Infect. Dis.* **65**, 1736–1744 (2017).
9. Restrepo, M. I. *et al.* Burden and risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia: a multinational point prevalence study of hospitalised patients. *Eur. Respir. J.* **52**, (2018).
10. Dickson, R. P. *et al.* Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **12**, 821–830 (2015).
11. Bos, L. D. J. & Ware, L. B. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. *The Lancet* **400**, 1145–1156 (2022).
12. Kim, T. W. *et al.* Clinical effects of bacteremia in sepsis patients with community-acquired pneumonia. *BMC Infect. Dis.* **23**, (2023).
13. Africano, H. F. *et al.* Major Adverse Cardiovascular Events During Invasive Pneumococcal Disease Are Serotype Dependent. *Clin. Infect. Dis.* **72**, E711–E719 (2021).
14. File, T. M. & Ramirez, J. A. Community-Acquired Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **389**, 632–641 (2023).
15. Vaughn, V. M., Dickson, R. P., Horowitz, J. K. & Flanders, S. A. Community-Acquired Pneumonia: A Review. *JAMA* **332**, 1282–1295 (2024).
16. Reyes, L. F. *et al.* Community-acquired pneumonia. *The Lancet* **0**, (2025).
17. Carugati, M. *et al.* Microbiological testing of adults hospitalised with community-acquired pneumonia: an international study. *ERJ Open Res.* **4**, (2018).

18. Dela Cruz, C. S. *et al.* Nucleic Acid-based Testing for Noninfluenza Viral Pathogens in Adults with Suspected Community-acquired Pneumonia. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **203**, 1070–1087 (2021).
19. Metlay, J. P. *et al.* Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **200**, e45 (2019).
20. Reyes, L. F. *et al.* Scores to Predict Long-term Mortality in Patients With Severe Pneumonia Still Lacking. *Clin. Infect. Dis.* **72**, E442–E443 (2021).
21. Zaki, H. A. *et al.* The Battle of the Pneumonia Predictors: A Comprehensive Meta-Analysis Comparing the Pneumonia Severity Index (PSI) and the CURB-65 Score in Predicting Mortality and the Need for ICU Support. *Cureus* **15**, (2023).
22. Charles, P. *et al.* SMART-COP: a tool for predicting the need for intensive respiratory or vasopressor support in community-acquired pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 375–384 (2008).
23. JR, L. G., S, L. & F, S. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* **270**, 2957–2963 (1993).
24. Carmo, T. A. *et al.* Derivation and Validation of a Novel Severity Scoring System for Pneumonia at Intensive Care Unit Admission. *Clin. Infect. Dis.* **72**, 942–949 (2021).
25. Violi, F. *et al.* Cardiovascular Complications and Short-term Mortality Risk in Community-Acquired Pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 1486–1493 (2017).
26. Corrales-Medina, V. F. *et al.* Cardiac complications in patients with community-acquired pneumonia: incidence, timing, risk factors, and association with short-term mortality. *Circulation* **125**, 773–781 (2012).
27. Feldman, C., Normark, S., Henriques-Normark, B. & Anderson, R. Pathogenesis and prevention of risk of cardiovascular events in patients with pneumococcal community-acquired pneumonia. *J. Intern. Med.* **285**, 635–652 (2019).
28. Kruckow, K. L., Zhao, K., Bowdish, D. M. E. & Orihuela, C. J. Acute organ injury and long-term sequelae of severe pneumococcal infections. *Pneumonia (Nathan)*. **15**, (2023).
29. Pieralli, F. *et al.* Correction to: Acute cardiovascular events in patients with community acquired pneumonia: results from the observational prospective FADOI-ICECAP study. *BMC Infect. Dis.* **21**, (2021).
30. Aldás, I. *et al.* Early and Late Cardiovascular Events in Patients Hospitalized for Community-Acquired Pneumonia. *Arch Bronconeumol (Engl Ed)* . **56**, 551–558 (2020).
31. Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 34–45 (2013).
32. Iba, T., Helms, J., Levi, M. & Levy, J. H. Thromboinflammation in acute injury: infections, heatstroke, and trauma. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **22**, 7–22 (2024).
33. van der Poll, T. & Herwald, H. The coagulation system and its function in early immune defense. *Thromb. Haemost.* **112**, 640–648 (2014).

34. Ma, L. & Dorling, A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin. Immunopathol.* **34**, 63–72 (2012).
35. Mollnes, T. E. & Huber-Lang, M. Complement in sepsis-when science meets clinics. *FEBS Lett.* **594**, 2621–2632 (2020).
36. Song, W. C. Crosstalk between complement and toll-like receptors. *Toxicol. Pathol.* **40**, 174–182 (2012).
37. Oncul, S. & Afshar-Kharghan, V. The Interaction between the Complement System and Hemostatic Factors. *Curr. Opin. Hematol.* **27**, 341 (2020).
38. de Bont, C. M., Boelens, W. C. & Pruijn, G. J. M. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 19–27 (2019).
39. Wojta, J. *et al.* C5a stimulates production of plasminogen activator inhibitor-1 in human mast cells and basophils. *Blood* **100**, 517–523 (2002).
40. Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 638–650 (2013).
41. Sun, L. & Ye, R. D. Role of G protein-coupled receptors in inflammation. *Acta Pharmacol. Sin.* **33**, 342–350 (2012).
42. Iba, T., Levi, M. & Levy, J. H. Intracellular communication and immunothrombosis in sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **20**, 2475–2484 (2022).
43. Salomão, R. *et al.* TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock* **30 Suppl 1**, 73–76 (2008).
44. Garraud, O. & Cognasse, F. Are Platelets Cells? And if Yes, are They Immune Cells? *Front. Immunol.* **6**, (2015).
45. Mandel, J., Casari, M., Stepanyan, M., Martyanov, A. & Deppermann, C. Beyond Hemostasis: Platelet Innate Immune Interactions and Thromboinflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
46. Palankar, R. *et al.* Platelets kill bacteria by bridging innate and adaptive immunity via platelet factor 4 and FcγRIIA. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **16**, 1187–1197 (2018).
47. Panzer, S. Differential response to LPS isotypes induced platelet activation mediated by Toll-like receptor (TLR)-4. *Clinical Immunology* **146**, 13–14 (2013).
48. Kojok, K., El Akoum, S., Mohsen, M., Mourad, W. & Merhi, Y. CD40L Priming of Platelets via NF-κB Activation is CD40- and TAK1-Dependent. *J. Am. Heart Assoc.* **7**, (2018).
49. Rayes, J., Watson, S. P. & Nieswandt, B. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J. Clin. Invest.* **129**, (2019).
50. Maneta, E. *et al.* Endothelial dysfunction and immunothrombosis in sepsis. *Front. Immunol.* **14**, (2023).
51. Uchimido, R., Schmidt, E. P. & Shapiro, N. I. The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis. *Crit. Care* **23**, (2019).

52. Iba, T. & Levy, J. H. Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **17**, 283–294 (2019).
53. Joffre, J., Hellman, J., Ince, C. & Ait-Oufella, H. Endothelial Responses in Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **202**, 361–370 (2020).
54. Ito, T., Kakuuchi, M. & Maruyama, I. Endotheliopathy in septic conditions: mechanistic insight into intravascular coagulation. *Crit. Care* **25**, (2021).
55. Kirschning, C. J. & Bauer, S. Toll-like receptors: Cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses. *International Journal of Medical Microbiology* **291**, 251–260 (2001).
56. Alberelli, M. A. & De Candia, E. Functional role of protease activated receptors in vascular biology. *Vascul. Pharmacol.* **62**, 72–81 (2014).
57. Semeraro, N., Ammollo, C. T., Semeraro, F. & Colucci, M. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb. Res.* **129**, 290–295 (2012).
58. Briglia, M., Rossi, M. A. & Faggio, C. Eryptosis: Ally or Enemy. *Curr. Med. Chem.* **24**, 937–942 (2017).
59. Lang, K. S. *et al.* Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell. Physiol. Biochem.* **15**, 195–202 (2005).
60. Lang, F., Abed, M., Lang, E. & Föller, M. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 138–153 (2014).
61. Manzoni, C. *et al.* Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Brief. Bioinform.* **19**, 286–302 (2018).
62. Watson, C. J. *et al.* The evolutionary dynamics and fitness landscape of clonal hematopoiesis. *Science* **367**, 1449–1454 (2020).
63. Xie, M. *et al.* Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat. Med.* **20**, 1472–1478 (2014).
64. Jaiswal, S. *et al.* Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2488–2498 (2014).
65. Steensma, D. P. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* **126**, 9–16 (2015).
66. Moran-Crusio, K. *et al.* Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation. *Cancer Cell* **20**, 11–24 (2011).
67. Challen, G. A. *et al.* Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat. Genet.* **44**, 23–31 (2011).
68. Jaiswal, S. *et al.* Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2488–2498 (2014).
69. Desai, P. *et al.* Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat. Med.* **24**, 1015–1023 (2018).
70. Kovtonyuk, L. V., Fritsch, K., Feng, X., Manz, M. G. & Takizawa, H. Inflamm-Aging of Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cells, and the Bone Marrow Microenvironment. *Front. Immunol.* **7**, (2016).

71. Gillis, N. K. *et al.* Clonal haemopoiesis and therapy-related myeloid malignancies in elderly patients: a proof-of-concept, case-control study. *Lancet Oncol.* **18**, 112–121 (2017).
72. Steensma, D. P. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* **126**, 9 (2015).
73. Jaiswal, S. *et al.* Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2488–2498 (2014).
74. Jaiswal, S. *et al.* Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 111–121 (2017).
75. Dorsheimer, L. *et al.* Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis With Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol.* **4**, 32 (2018).
76. Mas-Peiro, S. *et al.* Clonal haematopoiesis in patients with degenerative aortic valve stenosis undergoing transcatheter aortic valve implantation. *Eur. Heart J.* **41**, 933 (2019).
77. Díez-Díez, M. *et al.* Unidirectional association of clonal hematopoiesis with atherosclerosis development. *Nat. Med.* **30**, 2857 (2024).
78. Singh, J. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential as a prognostic factor: a systematic review and meta-analysis. *Blood Adv.* **8**, 3771–3784 (2024).
79. Bou Ghanem, E. N. CHIPing away at immunity: the role of clonal hematopoiesis of indeterminate potential in bacterial pneumonia. *J. Clin. Invest.* **134**, e181064 (2024).
80. Zeiher, A. M. *et al.* Association of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential With Inflammatory Gene Expression in Patients With Severe Degenerative Aortic Valve Stenosis or Chronic Postischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol.* **5**, 1170–1175 (2020).
81. Schenz, J. *et al.* Increased prevalence of clonal hematopoiesis of indeterminate potential in hospitalized patients with COVID-19. *Front. Immunol.* **13**, (2022).
82. Bergonzi, G. M. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential associates with higher risk of thromboembolism in severe COVID-19. *Haematologica* **110**, 2214–2218 (2025).
83. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
84. Leviten, M. W., Lai, E. C. & Posakony, J. W. The *Drosophila* gene *Bearded* encodes a novel small protein and shares 3' UTR sequence motifs with multiple Enhancer of split complex genes. *Development* **124**, 4039–4051 (1997).
85. Lee, R. C. & Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 862–864 (2001).
86. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**, 853–858 (2001).
87. Bartel, D. P. Metazoan MicroRNAs. *Cell* **173**, 20 (2018).
88. Czech, B. & Hannon, G. J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 19–31 (2011).

89. Cloonan, N. Re-thinking miRNA-mRNA interactions: intertwining issues confound target discovery. *Bioessays* **37**, 379–388 (2015).
90. Maurin, T., Cazalla, D., Yang, J. S., Bortolamiol-Becet, D. & Lai, E. C. RNase III-independent microRNA biogenesis in mammalian cells. *RNA* **18**, 2166 (2012).
91. Kozomara, A., Birgaoanu, M. & Griffiths-Jones, S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* **47**, D155–D162 (2019).
92. Zapata-Martínez, L. *et al.* Inflammatory microRNAs in cardiovascular pathology: another brick in the wall. *Front. Immunol.* **14**, 1196104 (2023).
93. Nejad, C., Stunden, H. J. & Gantier, M. P. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS J.* **285**, 3695–3716 (2018).
94. Gantier, M. P. *et al.* A miR-19 regulon that controls NF- $\kappa$ B signaling. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8048–8058 (2012).
95. Sheedy, F. J. *et al.* Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat. Immunol.* **11**, 141–147 (2010).
96. Fabbri, M. *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, (2012).
97. Sheedy, F. J. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
98. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J. & Baltimore, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12481–12486 (2006).
99. Hou, J. *et al.* MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J. Immunol.* **183**, 2150–2158 (2009).
100. Nejad, C., Stunden, H. J. & Gantier, M. P. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS J.* **285**, 3695–3716 (2018).
101. Mahesh, G. & Biswas, R. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *J. Interferon Cytokine Res.* **39**, 321–330 (2019).
102. Li, Y. & Shi, X. MicroRNAs in the regulation of TLR and RIG-I pathways. *Cell. Mol. Immunol.* **10**, 65–71 (2013).
103. Zhao, R. *et al.* MicroRNA-155 modulates bile duct inflammation by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 in biliary atresia. *Pediatr. Res.* **82**, 1007–1016 (2017).
104. Teng, G. *gen et al.* Let-7b is involved in the inflammation and immune responses associated with Helicobacter pylori infection by targeting Toll-like receptor 4. *PLoS One* **8**, (2013).
105. Chen, Q. *et al.* Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1 $\beta$  production in macrophages by targeting STAT3. *PLoS One* **7**, (2012).
106. Yang, Z., Zhong, L., Xian, R. & Yuan, B. MicroRNA-223 regulates inflammation and brain injury via feedback to NLRP3 inflammasome after intracerebral hemorrhage. *Mol. Immunol.* **65**, 267–276 (2015).

107. Sun, X. *et al.* MicroRNA-181b regulates NF- $\kappa$ B-mediated vascular inflammation. *J. Clin. Invest.* **122**, 1973–1990 (2012).
108. Liu, G. *et al.* miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15819–15824 (2009).
109. Nejad, C., Stunden, H. J. & Gantier, M. P. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS J.* **285**, 3695–3716 (2018).
110. Da Costa Martins, P. A. *et al.* Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation* **118**, 1567–1576 (2008).
111. Chen, J. F. *et al.* Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2111–2116 (2008).
112. Hartmann, P. *et al.* Endothelial Dicer promotes atherosclerosis and vascular inflammation by miRNA-103-mediated suppression of KLF4. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
113. Zahedi, F. *et al.* Dicer generates a regulatory microRNA network in smooth muscle cells that limits neointima formation during vascular repair. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 359–372 (2017).
114. Liu, L. Z. *et al.* MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 $\alpha$  expression. *PLoS One* **6**, (2011).
115. Wei, Y., Schober, A. & Weber, C. Pathogenic arterial remodeling: the good and bad of microRNAs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **304**, (2013).
116. Canfrán-Duque, A. *et al.* Macrophage deficiency of miR-21 promotes apoptosis, plaque necrosis, and vascular inflammation during atherogenesis. *EMBO Mol. Med.* **9**, 1244–1262 (2017).
117. Wang, H. *et al.* miR-21-3p controls sepsis-associated cardiac dysfunction via regulating SORBS2. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **94**, 43–53 (2016).
118. Zhang, B. *et al.* Circulating mircoRNA-21 as a predictor for vascular restenosis after interventional therapy in patients with lower extremity arterial occlusive disease. *Biosci. Rep.* **37**, (2017).
119. Hua, C. C., Liu, X. M., Liang, L. R., Wang, L. F. & Zhong, J. C. Targeting the microRNA-34a as a Novel Therapeutic Strategy for Cardiovascular Diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, (2022).
120. Li, J. *et al.* MicroRNA-34a promotes CMECs apoptosis and upregulate inflammatory cytokines, thus worsening CMECs damage and inhibiting angiogenesis by negatively targeting the Notch signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* **120**, 1598–1609 (2019).
121. Shi, K., Sun, H., Zhang, H., Xie, D. & Yu, B. miR-34a-5p aggravates hypoxia-induced apoptosis by targeting ZEB1 in cardiomyocytes. *Biol. Chem.* **400**, 227–236 (2019).
122. Toshima, T. *et al.* Therapeutic inhibition of microRNA-34a ameliorates aortic valve calcification via modulation of Notch1-Runx2 signalling. *Cardiovasc. Res.* **116**, 983–994 (2020).
123. Najafi-Shoushtari, S. H. *et al.* MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* **328**, 1566–1569 (2010).

124. Price, N. L. *et al.* Genetic Dissection of the Impact of miR-33a and miR-33b during the Progression of Atherosclerosis. *Cell Rep.* **21**, 1317–1330 (2017).
125. Nishiga, M. *et al.* MicroRNA-33 Controls Adaptive Fibrotic Response in the Remodeling Heart by Preserving Lipid Raft Cholesterol. *Circ. Res.* **120**, 835–847 (2017).
126. Petrkova, J. *et al.* Increased Expression of miR-146a in Valvular Tissue From Patients With Aortic Valve Stenosis. *Front. Cardiovasc. Med.* **6**, (2019).
127. del Monte, A. *et al.* miR-146a deficiency in hematopoietic cells is not involved in the development of atherosclerosis. *PLoS One* **13**, (2018).
128. Cheng, H. S. *et al.* Paradoxical Suppression of Atherosclerosis in the Absence of microRNA-146a. *Circ. Res.* **121**, 354–367 (2017).
129. Li, K., Ching, D., Luk, F. S. & Raffai, R. L. Apolipoprotein E enhances microRNA-146a in monocytes and macrophages to suppress nuclear factor- $\kappa$ B-driven inflammation and atherosclerosis. *Circ. Res.* **117**, e1–e11 (2015).
130. Löfgren, S. E. *et al.* Genetic association of miRNA-146a with systemic lupus erythematosus in Europeans through decreased expression of the gene. *Genes Immun.* **13**, 268–274 (2012).
131. Roldán, V. *et al.* Prognostic role of MIR146A polymorphisms for cardiovascular events in atrial fibrillation. *Thromb. Haemost.* **112**, 781–788 (2014).
132. de los Reyes-García, A. M. *et al.* MiR-146a Contributes to Thromboinflammation and Recurrence in Young Patients with Acute Myocardial Infarction. *J. Pers. Med.* **12**, (2022).
133. Arroyo, A. B. *et al.* miR-146a is a pivotal regulator of neutrophil extracellular trap formation promoting thrombosis. *Haematologica* **106**, 1636–1646 (2021).
134. Li, X. *et al.* miR-155 acts as an anti-inflammatory factor in atherosclerosis-associated foam cell formation by repressing calcium-regulated heat stable protein 1. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
135. Guo, J. *et al.* MicroRNA-155 Promotes Myocardial Infarction-Induced Apoptosis by Targeting RNA-Binding Protein QKI. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, (2019).
136. Hu, J. *et al.* MicroRNA-155 inhibition attenuates endoplasmic reticulum stress-induced cardiomyocyte apoptosis following myocardial infarction via reducing macrophage inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* **857**, (2019).
137. Nguyen, M. A. *et al.* miR-223 Exerts Translational Control of Proatherogenic Genes in Macrophages. *Circ. Res.* **131**, 42–58 (2022).
138. You, D. *et al.* miR-223-3p inhibits the progression of atherosclerosis via down-regulating the activation of MEK1/ERK1/2 in macrophages. *Aging* **14**, 1865–1878 (2022).
139. Qin, D. *et al.* MicroRNA-223-5p and -3p Cooperatively suppress necroptosis in ischemic/reperfused hearts. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 20247–20259 (2016).
140. Zhang, M. W., Shen, Y. J., Shi, J. & Yu, J. G. MiR-223-3p in Cardiovascular Diseases: A Biomarker and Potential Therapeutic Target. *Front. Cardiovasc. Med.* **7**, 610561 (2021).
141. Gao, W. & Yang, H. MicroRNA-124-3p attenuates severe community-acquired pneumonia progression in macrophages by targeting tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *Int. J. Mol. Med.* **43**, 1003–1010 (2019).

142. Martínez-Fleta, P. *et al.* A Differential Signature of Circulating miRNAs and Cytokines Between COVID-19 and Community-Acquired Pneumonia Uncovers Novel Physiopathological Mechanisms of COVID-19. *Front. Immunol.* **12**, (2022).
143. Hermann, S. *et al.* Diagnostic potential of circulating cell-free microRNAs for community-acquired pneumonia and pneumonia-related sepsis. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 12054–12064 (2020).
144. Goekeri, C. *et al.* MicroRNA-223 Dampens Pulmonary Inflammation during Pneumococcal Pneumonia. *Cells* **12**, (2023).
145. Chai, R., Zhou, C., Hu, Z. & Hu, J. Diagnostic predictability of serum miR-4793-3p and miR-1180-3p expression in community-acquired pneumonia. *Biomark. Med.* **18**, 231–241 (2024).
146. Galván-Román, J. M. *et al.* Usefulness of circulating microRNAs miR-146a and miR-16-5p as prognostic biomarkers in community-acquired pneumonia. *PLoS One* **15**, (2020).
147. Suhre, K., McCarthy, M. I. & Schwenk, J. M. Genetics meets proteomics: perspectives for large population-based studies. *Nat. Rev. Genet.* **22**, 19–37 (2021).
148. Eldjarn, G. H. *et al.* Large-scale plasma proteomics comparisons through genetics and disease associations. *Nature* **622**, 348–358 (2023).
149. Self, W. H. *et al.* Procalcitonin as a Marker of Etiology in Adults Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **65**, 183–190 (2017).
150. Siljan, W. W. *et al.* Inflammatory biomarkers are associated with aetiology and predict outcomes in community-acquired pneumonia: results of a 5-year follow-up cohort study. *ERJ Open Res.* **5**, (2019).
151. Méndez, R., Aldás, I. & Menéndez, R. Biomarkers in Community-Acquired Pneumonia (Cardiac and Non-Cardiac). *J. Clin. Med.* **9**, 549 (2020).
152. Thygesen, K. *et al.* Third universal definition of myocardial infarction. *Glob. Heart* **7**, 275–295 (2012).
153. Frencken, J. F. *et al.* Myocardial Injury in Critically Ill Patients with Community-acquired Pneumonia. A Cohort Study. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **16**, 606–612 (2019).
154. Moammar, M. Q., Ali, M. I., Mahmood, N. A., DeBari, V. A. & Khan, M. A. Cardiac Troponin I Levels and Alveolar-arterial Oxygen Gradient in Patients with Community-acquired Pneumonia. *Heart Lung Circ.* **19**, 90–92 (2010).
155. Reyes, L. F. *et al.* Severe Pneumococcal Pneumonia Causes Acute Cardiac Toxicity and Subsequent Cardiac Remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 609–620 (2017).
156. Bessière, F., Khenifer, S., Dubourg, J., Durieu, I. & Lega, J. C. Prognostic value of troponins in sepsis: a meta-analysis. *Intensive Care Med.* **39**, 1181–1189 (2013).
157. Vallabhajosyula, S. *et al.* Role of Admission Troponin-T and Serial Troponin-T Testing in Predicting Outcomes in Severe Sepsis and Septic Shock. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, (2017).
158. Menéndez, R. *et al.* Community-Acquired Pneumonia Patients at Risk for Early and Long-term Cardiovascular Events Are Identified by Cardiac Biomarkers. *Chest* **156**, 1080–1091 (2019).

159. Matsuo, A., Nagai-Okatani, C., Nishigori, M., Kangawa, K. & Minamino, N. Natriuretic peptides in human heart: Novel insight into their molecular forms, functions, and diagnostic use. *Peptides (N.Y.)*. **111**, 3–17 (2019).
160. Krüger, S. *et al.* Pro-atrial natriuretic peptide and pro-vasopressin for predicting short-term and long-term survival in community-acquired pneumonia: results from the German Competence Network CAPNETZ. *Thorax* **65**, 208–214 (2010).
161. Alan, M. *et al.* Clinical risk scores and blood biomarkers as predictors of long-term outcome in patients with community-acquired pneumonia: a 6-year prospective follow-up study. *J. Intern. Med.* **278**, 174–184 (2015).
162. Voors, A. A. *et al.* Adrenomedullin in heart failure: pathophysiology and therapeutic application. *Eur. J. Heart Fail.* **21**, 163–171 (2019).
163. Beer, B. N. *et al.* Pro-adrenomedullin associates with congestion in acute heart failure patients. *ESC Heart Fail.* **11**, 3598–3606 (2024).
164. Suzuki, Y. *et al.* Plasma adrenomedullin concentration is increased in patients with peripheral arterial occlusive disease associated with vascular inflammation. *Regul. Pept.* **118**, 99–104 (2004).
165. Hinrichs, S. *et al.* Precursor proadrenomedullin influences cardiomyocyte survival and local inflammation related to myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E8727–E8736 (2018).
166. Renaud, B. *et al.* Proadrenomedullin improves risk of early admission to ICU score for predicting early severe community-acquired pneumonia. *Chest* **142**, 1447–1454 (2012).
167. Albrich, W. C. *et al.* Enhancement of CURB65 score with proadrenomedullin (CURB65-A) for outcome prediction in lower respiratory tract infections: derivation of a clinical algorithm. *BMC Infect. Dis.* **11**, (2011).
168. Liu, D., Xie, L., Zhao, H., Liu, X. & Cao, J. Prognostic value of mid-regional pro-adrenomedullin (MR-proADM) in patients with community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* **16**, (2016).
169. Stauffer, B. L., Westby, C. M. & DeSouza, C. A. Endothelin-1, aging and hypertension. *Curr. Opin. Cardiol.* **23**, 350 (2008).
170. Pittet, J. F. *et al.* Elevated plasma endothelin-1 concentrations are associated with the severity of illness in patients with sepsis. *Ann. Surg.* **213**, 261–264 (1991).
171. Schuetz, P., Christ-Crain, M., Zimmerli, W. & Mueller, B. Repeated measurements of endothelin-1 precursor peptides predict the outcome in community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med.* **37**, 970–980 (2011).
172. Schuetz, P. *et al.* Endothelin-1 precursor peptides correlate with severity of disease and outcome in patients with community acquired pneumonia. *BMC Infect. Dis.* **8**, (2008).
173. Kolditz, M. *et al.* Copeptin predicts clinical deterioration and persistent instability in community-acquired pneumonia. *Respir. Med.* **106**, 1320–1328 (2012).
174. Gutbier, B. *et al.* Prognostic and Pathogenic Role of Angiopoietin-1 and -2 in Pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, 220–231 (2018).

175. Almirall, J. *et al.* Contribution of C-reactive protein to the diagnosis and assessment of severity of community-acquired pneumonia. *Chest* **125**, 1335–1342 (2004).
176. Chalmers, J. D., Singanayagam, A. & Hill, A. T. C-Reactive Protein Is an Independent Predictor of Severity in Community-acquired Pneumonia. *American Journal of Medicine* **121**, 219–225 (2008).
177. Hohenthal, U. *et al.* Utility of C-reactive protein in assessing the disease severity and complications of community-acquired pneumonia. *Clinical Microbiology and Infection* **15**, 1026–1032 (2009).
178. González-Jiménez, P. *et al.* Endothelial Biomarkers Are Superior to Classic Inflammatory Biomarkers in Community-Acquired Pneumonia. *Biomedicines* **12**, (2024).
179. Méndez, R. *et al.* Initial Inflammatory Profile in Community-acquired Pneumonia Depends on Time since Onset of Symptoms. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, 370–378 (2018).
180. Self, W. H. *et al.* Procalcitonin as an Early Marker of the Need for Invasive Respiratory or Vasopressor Support in Adults With Community-Acquired Pneumonia. *Chest* **150**, 819–828 (2016).
181. Tanaka, T., Narazaki, M., Masuda, K. & Kishimoto, T. Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **941**, 79–88 (2016).
182. Zobel, K. *et al.* Interleukin 6, lipopolysaccharide-binding protein and interleukin 10 in the prediction of risk and etiologic patterns in patients with community-acquired pneumonia: results from the German competence network CAPNETZ. *BMC Pulm. Med.* **12**, 6 (2012).
183. Wang, X. *et al.* Expression Levels of Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5) and Related Inflammatory Cytokines Associated with Severity, Prognosis, and Causative Pathogen in Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Med. Sci. Monit.* **24**, 3620–3630 (2018).
184. Yende, S. *et al.* Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 1242–1247 (2008).
185. Arroyo, A. B. *et al.* miR-146a is a pivotal regulator of neutrophil extracellular trap formation promoting thrombosis. *Haematologica* **106**, 1636–1646 (2021).
186. Bejar, R. *et al.* Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2496–2506 (2011).
187. Lussana, F. *et al.* Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: A systematic review. *Thromb. Res.* **124**, 409–417 (2009).
188. Papaemmanuil, E. *et al.* Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **122**, 3616–3627 (2013).
189. Jeong, M. *et al.* Loss of Dnmt3a Immortalizes Hematopoietic Stem Cells In Vivo. *Cell Rep.* **23**, 1 (2018).
190. Challen, G. A. *et al.* Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat. Genet.* **44**, 23 (2011).
191. Hormaechea-Agulla, D. *et al.* Chronic infection drives Dnmt3a-loss-of-function clonal hematopoiesis via IFN $\gamma$  signaling. *Cell Stem Cell* **28**, 1428-1442.e6 (2021).

192. Sano, S. *et al.* CRISPR-Mediated Gene Editing to Assess the Roles of Tet2 and Dnmt3a in Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **123**, 335–341 (2018).
193. Abplanalp, W. T. *et al.* Clonal Hematopoiesis-Driver DNMT3A Mutations Alter Immune Cells in Heart Failure. *Circ. Res.* **128**, 216–228 (2021).
194. Cull, A. H., Snetsinger, B., Buckstein, R., Wells, R. A. & Rauh, M. J. Tet2 restrains inflammatory gene expression in macrophages. *Exp. Hematol.* **55**, 56-70.e13 (2017).
195. Zhang, Q. *et al.* Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature* **525**, 389–393 (2015).
196. Fuster, J. J. *et al.* Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science* **355**, 842–847 (2017).
197. Sano, S. *et al.* Tet2-mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure through a Mechanism Involving the IL-1 $\beta$ /NLRP3 Inflammasome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 875 (2018).
198. Bick, A. G. *et al.* Inherited causes of clonal haematopoiesis in 97,691 whole genomes. *Nature* **586**, 763–768 (2020).
199. Bick, A. G. *et al.* Genetic IL-6 signaling deficiency attenuates cardiovascular risk in clonal hematopoiesis. *Circulation* **141**, 124 (2019).
200. Lin, A. E. *et al.* Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential With Loss of Tet2 Enhances Risk for Atrial Fibrillation Through Nlrp3 Inflammasome Activation. *Circulation* **149**, 1419–1434 (2024).
201. Svensson, E. C. *et al.* TET2-Driven Clonal Hematopoiesis and Response to Canakinumab: An Exploratory Analysis of the CANTOS Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* **7**, 521–528 (2022).
202. Asada, S. & Kitamura, T. Aberrant histone modifications induced by mutant ASXL1 in myeloid neoplasms. *Int. J. Hematol.* **110**, 179–186 (2019).
203. Fujino, T. & Kitamura, T. ASXL1 mutation in clonal hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **83**, 74–84 (2020).
204. Min, K. D., Polizio, A. H., Kour, A., Thel, M. C. & Walsh, K. Experimental ASXL1 - Mediated Clonal Hematopoiesis Promotes Inflammation and Accelerates Heart Failure. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* **11**, e026154 (2022).
205. Sato, N. *et al.* Clonal hematopoiesis-related mutant ASXL1 promotes atherosclerosis in mice via dysregulated innate immunity. *Nature cardiovascular research* **3**, 1568–1583 (2024).
206. Saadatagah, S. *et al.* Atrial Fibrillation and Clonal Hematopoiesis in TET2 and ASXL1. *JAMA Cardiol.* **9**, 497–506 (2024).
207. Jeong, J. J. *et al.* Cytokine-Regulated Phosphorylation and Activation of TET2 by JAK2 in Hematopoiesis. *Cancer Discov.* **9**, 778–795 (2019).
208. Wolach, O. *et al.* Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci. Transl. Med.* **10**, (2018).

209. Tang, Y. *et al.* Inhibition of JAK2 Suppresses Myelopoiesis and Atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **34**, 145–152 (2020).
210. Wang, W. *et al.* Macrophage Inflammation, Erythrophagocytosis, and Accelerated Atherosclerosis in Jak2 V617F Mice. *Circ. Res.* **123**, E35–E47 (2018).
211. Fidler, T. P. *et al.* The AIM2 inflammasome exacerbates atherosclerosis in clonal haematopoiesis. *Nature* **592**, 296–301 (2021).
212. Sano, S. *et al.* JAK2V617F-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Pathological Remodeling in Murine Heart Failure. *JACC Basic Transl. Sci.* **4**, 684 (2019).
213. Ogbue, O. *et al.* Impact of Sepsis and Stress Hematopoiesis on the Acquisition and Persistence of Clonal Hematopoiesis. *Blood* **144**, 5634–5634 (2024).
214. Vlasschaert, C. *et al.* Infection risk associated with clonal hematopoiesis of indeterminate potential is partly mediated by hematologic cancer transformation in the UK Biobank. *Leukemia* **37**, 2306 (2023).
215. Quin, C. *et al.* Neutrophil-mediated innate immune resistance to bacterial pneumonia is dependent on Tet2 function. *J. Clin. Invest.* **134**, (2024).
216. Stomper, J. *et al.* Sex differences in DNMT3A-mutant clonal hematopoiesis and the effects of estrogen. *Cell Rep.* **44**, (2025).
217. Dhuri, K. & Alachkar, H. Differences in the mutational landscape of clonal hematopoiesis of indeterminate potential among races and between male and female patients with cancer. *Exp. Hematol.* **138**, 104271 (2024).
218. Gumuser, E. D. *et al.* Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential Predicts Adverse Outcomes in Patients With Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **81**, 1996–2009 (2023).
219. von Scheidt, M. *et al.* Clonal haematopoiesis of indeterminate potential and mortality in coronary artery disease. *Eur. Heart J.* <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHAF602> (2025) doi:10.1093/EURHEARTJ/EHAF602.
220. Marston, N. A. *et al.* Clonal hematopoiesis, cardiovascular events and treatment benefit in 63,700 individuals from five TIMI randomized trials. *Nat. Med.* **30**, 2641–2647 (2024).
221. McQuilten, Z. K. *et al.* Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease and Bleeding Risk and the Effectiveness of Aspirin. *JAMA Cardiol.* **10**, 1257–1266 (2025).
222. Zeng, Z. *et al.* The effect of clonal hematopoiesis on long-term outcomes in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *BMC Med.* **23**, (2025).
223. Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10513–10518 (2008).
224. Weber, J. A. *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* **56**, 1733–1741 (2010).
225. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
226. Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D. & Wang, K. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **717**, 85–90 (2011).

227. Small, E. M. & Olson, E. N. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* **469**, 336–342 (2011).
228. D’Alessandra, Y. *et al.* Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **31**, 2765–2773 (2010).
229. Churov, A., Summerhill, V., Grechko, A., Orekhova, V. & Orekhov, A. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences* *2019*, Vol. 20, **20**, (2019).
230. O’Connell, R. M., Rao, D. S. & Baltimore, D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 295–312 (2012).
231. Wang, J. feng *et al.* Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 184–188 (2010).
232. Benz, F., Roy, S., Trautwein, C., Roderburg, C. & Luedde, T. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
233. Huang, S. *et al.* Identification of miRNA biomarkers of pneumonia using RNA-sequencing and bioinformatics analysis. *Exp. Ther. Med.* **13**, 1235 (2017).
234. Hermann, S. *et al.* Diagnostic potential of circulating cell-free microRNAs for community-acquired pneumonia and pneumonia-related sepsis. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 12054–12064 (2020).
235. Blondal, T. *et al.* Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* **59**, S1–S6 (2013).
236. Kirschner, M. B. *et al.* Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One* **6**, (2011).
237. Kirschner, M. B. *et al.* The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front. Genet.* **4**, (2013).
238. Takada, Y. *et al.* Pre-Analytical Modification of Serum miRNAs: Diagnostic Reliability of Serum miRNAs in Hemolytic Diseases. *Journal of Clinical Medicine* *2021*, Vol. 10, **10**, (2021).
239. Wang, L., Liu, J., Xu, B., Liu, Y. L. & Liu, Z. Reduced exosome miR-425 and miR-744 in the plasma represents the progression of fibrosis and heart failure. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **34**, 626–633 (2018).
240. Qian, J., Liu, K. J., Zhong, C. H., Xian, L. N. & Hu, Z. H. Sivelestat sodium alleviated sepsis-induced acute lung injury by inhibiting TGF- $\beta$ /Smad signaling pathways through upregulating microRNA-744-5p. *J. Thorac. Dis.* **16**, 6616–6633 (2024).
241. Rao, P. K., Kumar, R. M., Farkhondeh, M., Baskerville, S. & Lodish, H. F. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 8721 (2006).
242. Shan, Z. X. *et al.* Upregulated expression of miR-1/miR-206 in a rat model of myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 597–601 (2009).
243. Obradovic, D. *et al.* The potential role of plasma miR-155 and miR-206 as circulatory biomarkers in inflammatory cardiomyopathy. *ESC Heart Fail.* **8**, 1850–1860 (2021).

244. Šustr, F. *et al.* Identification of Plasmatic MicroRNA-206 as New Predictor of Early Recurrence of Atrial Fibrillation After Catheter Ablation Using Next-generation Sequencing. *Mol. Diagn. Ther.* **28**, 301–310 (2024).
245. Dong, W. *et al.* miR-206 alleviates LPS-induced inflammatory injury in cardiomyocytes via directly targeting USP33 to inhibit the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **479**, 929–940 (2024).
246. Liang, G. *et al.* The correlations between the serum expression of miR-206 and the severity and prognosis of sepsis. *Ann. Palliat. Med.* **9**, 3222234–3223234 (2020).
247. Chen, C. *et al.* MiR-320a contributes to atherogenesis by augmenting multiple risk factors and down-regulating SRF. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 970–985 (2015).
248. Galeano-Otero, I. *et al.* Circulating miR-320a as a Predictive Biomarker for Left Ventricular Remodelling in STEMI Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Journal of Clinical Medicine 2020, Vol. 9, 9*, (2020).
249. Jakob, P. *et al.* Profiling and validation of circulating microRNAs for cardiovascular events in patients presenting with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **38**, 511–515 (2017).
250. Han, Q., Zhang, L. & Liao, R. Diagnostic and prognostic significance of miR-320a-3p in patients with chronic heart failure. *BMC Cardiovascular Disorders 2024 24:1* **24**, 308- (2024).
251. Zhelankin, A. V. *et al.* Elevated Plasma Levels of Circulating Extracellular miR-320a-3p in Patients with Paroxysmal Atrial Fibrillation. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
252. Corrêa, P. C. M. V. *et al.* Detection of Sepsis in Platelets Using MicroRNAs and Membrane Antigens. *Genes 2021, Vol. 12, 12*, (2021).
253. Tijssen, A. J. *et al.* MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ. Res.* **106**, 1035–1039 (2010).
254. Seronde, M. F. *et al.* Circulating microRNAs and Outcome in Patients with Acute Heart Failure. *PLoS One* **10**, (2015).
255. Rizzacasa, B. *et al.* MiR-423 is differentially expressed in patients with stable and unstable coronary artery disease: A pilot study. *PLoS One* **14**, (2019).
256. Petejova, N. *et al.* Expression and 7-day time course of circulating microRNAs in septic patients treated with nephrotoxic antibiotic agents. *BMC Nephrol.* **23**, (2022).
257. Galván-Román, J. M. *et al.* Usefulness of circulating microRNAs miR-146a and miR-16-5p as prognostic biomarkers in community-acquired pneumonia. *PLoS One* **15**, (2020).
258. Goren, Y. *et al.* Serum Levels of microRNAs in Patients with Heart Failure. *Eur. J. Heart Fail.* **14**, 147–154 (2012).
259. Brioschi, M. *et al.* Multiplexed MRM-Based Proteomics Identified Multiple Biomarkers of Disease Severity in Human Heart Failure. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, 22*, 1–15 (2021).
260. Aboumsallem, J. P. *et al.* Multi-omics analyses identify molecular signatures with prognostic values in different heart failure aetiologies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **175**, 13–28 (2023).

261. Cao, T. H. *et al.* Plasma proteomic approach in patients with heart failure: insights into pathogenesis of disease progression and potential novel treatment targets. *Eur. J. Heart Fail.* **22**, 70–80 (2020).
262. Naylor, M. *et al.* Aptamer-Based Proteomic Platform Identifies Novel Protein Predictors of Incident Heart Failure and Echocardiographic Traits. *Circ. Heart Fail.* **13**, E006749 (2020).
263. Lumish, H. S. *et al.* Prediction of worsening heart failure in hypertrophic cardiomyopathy using plasma proteomics. *Heart* **109**, 1837–1843 (2023).
264. Van Ommen, A. M. *et al.* Plasma Proteomic Patterns Show Sex Differences in Early Concentric Left Ventricular Remodeling. *Circ. Heart Fail.* **16**, (2023).
265. Lind, L. *et al.* Large-Scale Plasma Protein Profiling of Incident Myocardial Infarction, Ischemic Stroke, and Heart Failure. *J. Am. Heart Assoc.* **10**, (2021).
266. Girerd, N. *et al.* Protein Biomarkers of New-Onset Heart Failure: Insights From the Heart Omics and Ageing Cohort, the Atherosclerosis Risk in Communities Study, and the Framingham Heart Study. *Circ. Heart Fail.* **16**, E009694 (2023).
267. Chandramouli, C. *et al.* Sex differences in proteomic correlates of coronary microvascular dysfunction among patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Eur. J. Heart Fail.* **24**, 681–684 (2022).
268. Gui, H. *et al.* Plasma Proteomic Profile Predicts Survival in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *Circ. Genom. Precis. Med.* **14**, E003140 (2021).
269. Woolley, R. J. *et al.* Machine learning based on biomarker profiles identifies distinct subgroups of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur. J. Heart Fail.* **23**, 983–991 (2021).
270. Michels, E. H. A. *et al.* The Plasma Proteome in Community-acquired Pneumonia: Pathophysiology, Outcome, and 10-Year Risk. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **211**, 2180–2190 (2025).
271. Zhao, L. *et al.* Plasma proteome analysis and validation of patients with community-acquired pneumonia: A cohort study. *Proteomics Clin. Appl.* **18**, (2024).
272. Rischke, S. *et al.* Proteomic, metabolomic and lipidomic profiles in community acquired pneumonia for differentiating viral and bacterial infections. *Scientific Reports* **15**, 1922- (2025).
273. Gesell Salazar, M. *et al.* Association of proteome and metabolome signatures with severity in patients with community-acquired pneumonia. *J. Proteomics* **214**, (2020).
274. Michels, E. H. A. *et al.* Proteomic profiling of neutrophils and plasma in community-acquired pneumonia reveals crucial proteins in diverse biological pathways linked to clinical outcome. *Front. Immunol.* **15**, (2024).
275. Lundberg, M., Eriksson, A., Tran, B., Assarsson, E. & Fredriksson, S. Homogeneous antibody-based proximity extension assays provide sensitive and specific detection of low-abundant proteins in human blood. *Nucleic Acids Res.* **39**, e102–e102 (2011).
276. Ornitz, D. M. & Itoh, N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **4**, 215–266 (2015).

277. Hu, M. C., Shiizaki, K., Kuro-O, M. & Moe, O. W. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 503–533 (2013).
278. Andrukhova, O. *et al.* FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. *Bone* **51**, 621–628 (2012).
279. White, K. E. *et al.* Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat. Genet.* **26**, 345–348 (2000).
280. Shimada, T. *et al.* Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6500–6505 (2001).
281. Wahl, P. & Wolf, M. FGF23 in chronic kidney disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **728**, 107–125 (2012).
282. Rodelo-Haad, C. *et al.* FGF23, Biomarker or Target? *Toxins 2019, Vol. 11, Page 175* **11**, 175 (2019).
283. Gutiérrez, O. M. *et al.* Fibroblast Growth Factor 23 and Mortality among Patients Undergoing Hemodialysis. *New England Journal of Medicine* **359**, 584–592 (2008).
284. Chonchol, M., Greene, T., Zhang, Y., Hoofnagle, A. N. & Cheung, A. K. Low Vitamin D and High Fibroblast Growth Factor 23 Serum Levels Associate with Infectious and Cardiac Deaths in the HEMO Study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 227–237 (2016).
285. Nowak, K. L. *et al.* Fibroblast Growth Factor 23 and the Risk of Infection-Related Hospitalization in Older Adults. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 1239–1246 (2017).
286. Ishigami, J. *et al.* Fibroblast Growth Factor 23 and Risk of Hospitalization with Infection in Chronic Kidney Disease: The Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **31**, 1836–1846 (2020).
287. Gutiérrez, O. M. *et al.* Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation* **119**, 2545–2552 (2009).
288. Mathew, J. S. *et al.* Fibroblast growth factor-23 and incident atrial fibrillation: The multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) and the cardiovascular health study (CHS). *Circulation* **130**, 298–307 (2014).
289. Cornelissen, A. *et al.* Fibroblast Growth Factor 23 and Outcome Prediction in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Journal of Clinical Medicine 2022, Vol. 11, Page 601* **11**, 601 (2022).
290. Kang, M. *et al.* In-center Nocturnal Hemodialysis Reduced the Circulating FGF23, Left Ventricular Hypertrophy, and All-Cause Mortality: A Retrospective Cohort Study. *Front. Med. (Lausanne)*. **9**, (2022).
291. Moe, S. M. *et al.* Cinacalcet, Fibroblast Growth Factor-23, and Cardiovascular Disease in Hemodialysis: The Evaluation of Cinacalcet HCl Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE) Trial. *Circulation* **132**, 27–39 (2015).
292. Naffaa, M. E. *et al.* Serum inorganic phosphorus levels predict 30-day mortality in patients with community acquired pneumonia. *BMC Infect. Dis.* **15**, (2015).

293. Zhang, S. *et al.* A new prediction model for assessing the clinical outcomes of ICU patients with community-acquired pneumonia: a decision tree analysis. *Ann. Med.* **51**, 41–50 (2019).
294. Li, N. & Chu, W. Development and validation of a survival prediction model in elder patients with community-acquired pneumonia: a MIMIC-population-based study. *BMC Pulm. Med.* **23**, (2023).
295. Cilloniz, C. *et al.* Machine-Learning Model for Mortality Prediction in Patients With Community-Acquired Pneumonia: Development and Validation Study. *Chest* **163**, 77–88 (2023).
296. Yipp, B. G. *et al.* Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* **18**, 1386–1393 (2012).
297. Kimball, A. S., Obi, A. T., Diaz, J. A. & Henke, P. K. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Front. Immunol.* **7**, 236 (2016).
298. Döring, Y., Soehnlein, O. & Weber, C. Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ. Res.* **120**, 736–743 (2017).
299. Huang, J., Hong, W., Wan, M. & Zheng, L. Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases. *MedComm (Beijing)*. **3**, (2022).
300. Haddad, L. E., Khzam, L. B., Hajjar, F., Merhi, Y. & Sirois, M. G. Characterization of FGF receptor expression in human neutrophils and their contribution to chemotaxis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **301**, 1036–1045 (2011).
301. Rossaint, J. *et al.* FGF23 signaling impairs neutrophil recruitment and host defense during CKD. *J. Clin. Invest.* **126**, 962–974 (2016).
302. The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10887118/>.
303. Corseaux, D. *et al.* Basic fibroblast growth factor increases tissue factor expression in circulating monocytes and in vascular wall. *Circulation* **101**, 2000–2006 (2000).
304. Kaneto, T. *et al.* Induction of Tissue Factor Expression in Endothelial Cells by Basic Fibroblast Growth Factor and its Modulation by Fenofibric acid. *Thromb. J.* **1**, 6 (2003).
305. Wang, L. *et al.* Macrophage-derived FGFR1 drives atherosclerosis through PLC $\gamma$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B inflammatory signalling pathway. *Cardiovasc. Res.* **120**, 1385–1399 (2024).
306. Rusnati, M., Tanghetti, E., Dell’Era, P., Gualandris, A. & Presta, M. alphavbeta3 integrin mediates the cell-adhesive capacity and biological activity of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in cultured endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2449–2461 (1997).
307. Guha, M. *et al.* Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* **98**, 1429–1439 (2001).
308. Bacchetta, J. *et al.* Fibroblast growth factor 23 inhibits extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in human monocytes. *J. Bone Miner. Res.* **28**, 46–55 (2013).

## REFERENCIAS

309. Ranch, D., Zhang, M. Y. H., Portale, A. A. & Perwad, F. Fibroblast growth factor 23 regulates renal 1,25-dihydroxyvitamin D and phosphate metabolism via the MAP kinase signaling pathway in Hyp mice. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 1883–1890 (2011).
310. Han, X. *et al.* Counter-regulatory paracrine actions of FGF-23 and 1,25(OH)<sub>2</sub>D in macrophages. *FEBS Lett.* **590**, 53–67 (2016).
311. Goyal, A. & Tandon, N. Burosumab: Current status and future prospects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **38**, (2024).
312. Law, J. P. *et al.* Clinical Potential of Targeting Fibroblast Growth Factor-23 and  $\alpha$ Klotho in the Treatment of Uremic Cardiomyopathy. *J. Am. Heart Assoc.* **9**, (2020).



# **ANEXOS**

## ANEXO 1. LISTADO DE PROTEÍNAS DEL PANEL INFLAMATORIO (OLINK®).

Adenosine Deaminase (ADA)
Artemin (ARTN)
Axin-1 (AXIN1)
Beta-nerve growth factor (Beta-NGF)
Caspase-8 (CASP-8)
C-C motif chemokine 3 (CCL3)
C-C motif chemokine 4 (CCL4)
C-C motif chemokine 19 (CCL19)
C-C motif chemokine 20 (CCL20)
C-C motif chemokine 23 (CCL23)
C-C motif chemokine 25 (CCL25)
C-C motif chemokine 28 (CCL28)
CD40L receptor (CD40)
CUB domain-containing protein 1 (CDCP1)
C-X-C motif chemokine 1 (CXCL1)
C-X-C motif chemokine 5 (CXCL5)
C-X-C motif chemokine 6 (CXCL6)
C-X-C motif chemokine 9 (CXCL9)
C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10)
C-X-C motif chemokine 11 (CXCL11)
Cystatin D (CST5)
Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor (DNER)
Eotaxin (CCL11)
Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1)
Fibroblast growth factor 21 (FGF-21)
Fibroblast growth factor 23 (FGF-23)
Fibroblast growth factor 5 (FGF-5)
Fibroblast growth factor 19 (FGF-19)
Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L)
Fractalkine (CX3CL1)
Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)
Hepatocyte growth factor (HGF)
Interferon gamma (IFN-gamma)
Interleukin-1 alpha (IL-1 alpha)
Interleukin-2 (IL-2)
Interleukin-2 receptor subunit beta (IL-2RB)
Interleukin-4 (IL-4)
Interleukin-5 (IL5)
Interleukin-6 (IL6)
Interleukin-7 (IL-7)
Interleukin-8 (IL-8)
Interleukin-10 (IL10)
Interleukin-10 receptor subunit alpha (IL-10RA)
Interleukin-10 receptor subunit beta (IL-10RB)
Interleukin-12 subunit beta (IL-12B)
Interleukin-13 (IL-13)

Interleukin-15 receptor subunit alpha (IL-15RA)
Interleukin-17A (IL-17A)
Interleukin-17C (IL-17C)
Interleukin-18 (IL-18)
Interleukin-18 receptor 1 (IL-18R1)
Interleukin-20 (IL-20)
Interleukin-20 receptor subunit alpha (IL-20RA)
Interleukin-22 receptor subunit alpha-1 (IL-22 RA1)
Interleukin-24 (IL-24)
Interleukin-33 (IL-33)
Latency-associated peptide transforming growth factor beta-1 (LAP TGF-beta-1)
Leukemia inhibitory factor (LIF)
Leukemia inhibitory factor receptor (LIF-R)
Macrophage colony-stimulating factor 1 (CSF-1)
Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)
Matrix metalloproteinase-10 (MMP-10)
Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)
Monocyte chemotactic protein 2 (MCP-2)
Monocyte chemotactic protein 3 (MCP-3)
Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4)
Natural killer cell receptor 2B4 (CD244)
Neurotrophin-3 (NT-3)
Neurturin (NRTN)
Oncostatin-M (OSM)
Osteoprotegerin (OPG)
Programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1)
Protein S100-A12 (EN-RAGE)
Signaling lymphocytic activation molecule (SLAMF1)
SIR2-like protein 2 (SIRT2)
STAM-binding protein (STAMBP)
Stem cell factor (SCF)
Sulfotransferase 1A1 (ST1A1)
T cell surface glycoprotein CD6 isoform (CD6)
T-cell surface glycoprotein CD5 (CD5)
T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain (CD8A)
Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)
TNF-beta (TNFB)
TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)
TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)
Transforming growth factor alpha (TGF-alpha)
Tumor necrosis factor (Ligand) superfamily, member 12 (TWEAK)
Tumor necrosis factor (TNF)
Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14 (TNFSF14)
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9 (TNFRSF9)
Urokinase-type plasminogen activator (uPA)
Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)

## ANEXO 2. RELACIÓN DE INFORMACIÓN CIENTÍFICA DE INTERÉS.

### **FINANCIACIÓN**

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el marco de los siguientes proyectos y becas de investigación.

- **IMIB-INNOVA 2026.** Plataforma clínica predictiva para la detección temprana de riesgo cardiovascular tras neumonía adquirida en la comunidad y sepsis (EARLY-CV). Programa Ciencia que Transforma (INNOVA). Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB). 2026. Investigador colaborador.
- **PI23/00027.** Regulación de la tromboinflamación por MicroRNA: aproximación biológica y terapéutica en enfermedad cardiovascular post-sepsis. Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB). 01/01/2024-31/12/2026. Investigador colaborador.
- **Beca de investigación predoctoral para proyectos científicos relacionados con la hemostasia y la trombosis.** Fundación Española de Trombosis y Hemostasia (FETH). 2023.

### **PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON LA TESIS**

#### **COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS NACIONALES**

- **El efecto funcional del FGF-23 en neutrófilos humanos apoya su asociación como marcador temprano de MACE en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad.** *Salvador Carrillo Tornel; Miriam Guzmán Almansa; Laura Zapata Martínez; Pedro J. Guijarro Carrillo; Purificación Balibrea Fernández; Nuria García Barberá; María L. Lozano; Raúl Méndez; Carlos Pérez Sánchez; Constantino Martínez; Rocío González-Conejero.* X Jornadas del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB). Murcia, España. 27/11/2025.
- **El efecto funcional del FGF-23 en neutrófilos humanos apoya su asociación como marcador temprano de MACE en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad.** *Salvador Carrillo Tornel; Miriam Guzmán Almansa; Laura Zapata Martínez; Pedro J. Guijarro Carrillo; Purificación Balibrea Fernández; Nuria García Barberá; Maria L. Lozano; Raúl Méndez; Carlos Pérez Sánchez; Constantino Martínez; Rocío González-Conejero.* **SESIÓN PLENARIA. LXVII**

Congreso Nacional de la SEHH - XLI Congreso Nacional de la SETH. Oviedo, España. 09/10/2025-11/10/2025.

- **Integración de biomarcadores moleculares y clínicos en un modelo de machine learning para predecir eventos cardiovasculares en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad.** *Salvador Carrillo Tornel; Tomás Cerdó; Raúl Méndez; Carlos Pérez Sánchez; Paula González Jiménez; Laura Zapata Martínez; Pedro J. Guijarro Carrillo; Nuria García Barberá; Sonia Águila; Ana Latorre; María L. Lozano; Chary López Pedrera; Constantino Martínez; Rocío González-Conejero.* LXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) - XL Congreso de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH). Palma de Mallorca, España. 24/10/2024-26/10/2024.
- **Desarrollo de un algoritmo clínico-biológico predictor de eventos cardiovasculares en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad.** *Salvador Carrillo Tornel; Tomás Cerdó; Paula González Jiménez; Laura Zapata Martínez; Pedro J. Guijarro Carrillo; Nuria García Barberá; Sonia Águila; Raúl Méndez Ocaña; Rosario Menéndez; María L. Lozano; Carlos Pérez Sánchez; Chary López Pedrera; Constantino Martínez; Rocío González-Conejero.* IX Jornadas Doctorales UMU-UPCT-CMN 2024. Murcia, España. 10/06/2024-12/06/2024.

#### **COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS INTERNACIONALES**

- **FGF-23 drives NETosis and tissue factor production, explaining its association with early MACE in community-acquired pneumonia.** *Salvador Carrillo-Tornel, Pedro J. Guijarro-Carrillo, Laura Zapata-Martínez, Nuria García-Barberá, Nathaly Freire-Sánchez, Paula González-Jiménez, José García-Flores, Enrique Bernal-Morell, María L. Lozano, Raúl Méndez, Constantino Martínez, Rocío González-Conejero.* International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). París, Francia. 11/07/2026 – 15/07/2026.
- **Plasma miRNAs refine early cardiovascular risk stratification by clinical factors in patients with community-acquired pneumonia.** *Salvador Carrillo-Tornel, Raúl Teruel-Montoya, Nuria García-Barberá, Marina Fuentes, Laura Zapata-Martínez, Pedro J. Guijarro-Carrillo, Nathaly Freire-Sánchez, Paula González-Jiménez, José García-Flores, Enrique Bernal-Morell, María L. Lozano,*

*Raúl Méndez, Rocío González-Conejero, Constantino Martínez.* International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). París, Francia. 11/07/2026 – 15/07/2026.

- **Machine learning model predicts early cardiovascular events in community-acquired pneumonia patients.** *Salvador Carrillo Tornel; Carlos Pérez Sánchez; Raúl Méndez; Tomás Cerdó; Paula González Jiménez; Laura Zapata Martínez; Pedro J. Guijarro Carrillo; Nuria García Barberá; Sonia Águila; Ana Latorre; Miriam Guzmán Almansa; María L. Lozano; Chary López Pedrera; Constantino Martínez; Rocío González-Conejero.* International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Washington, D.C., Estados Unidos de América. 21/06/2025-25/06/2025.

### **PREMIOS**

- **Premio a la mejor comunicación presentada en el LXVII Congreso Nacional SEHH-XLI Congreso Nacional SETH.** “*El efecto funcional del FGF-23 en neutrófilos humanos apoya su asociación como marcador temprano de MACE en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad.*” Fundación Español de Trombosis y Hemostasia (FETH). Oviedo, España. 11/10/2025.

### **PROTECCIÓN INTELECTUAL**

- **P202530039.** “*Método in vitro para predecir el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular, o para el diagnóstico de una enfermedad cardiovascular, en pacientes con una enfermedad infecciosa.*” Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB). Murcia, España. 21/01/2025.

### **PRODUCCIÓN CIENTÍFICA NO RELACIONADA CON LA TESIS**

#### **PUBLICACIONES**

- **Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis is driven by MicroRNA polymorphisms and NETosis.** *Laura Reguilón\*; Jesús H. Gómez\*; Salvador Carrillo-Tornel; Encarnación Saiz; María F. Pina; Miriam Guzmán-Almansa; Nuria García-Barberá; Pedro J. Guijarro-Carrillo; Ignacio Hervés; Juana M. Plasencia; María T. Herranz; María L. Lozano; Carlos Pérez-Sánchez; Chary*

*López-Pedreira; Constantino Martínez; Rocío González-Conejero. Arthritis Res Ther.* 2026.

- **Myelodysplastic neoplasms with ring sideroblasts without SF3B1 mutations in adults: enrichment of germline variants in congenital sideroblastic anemia genes.** *Sandra Novoa-Jáuregui; Sandra Huber; Maria Gabarrós-Subirà; Tzu Hua Chen-Liang; Sara Torres-Esquiús; Salvador Carrillo-Tornel; Marta Santiago; Teresa Bernal Del Castillo; Iván Martín-Castillo; Francisca Maria Hernandez; Mónica Del Rey; Alessandro Liquori; Mar Tormo; Jose Cervera; Francesc Bosch; David Valcárcel; Claudia Haferlach; María Díez-Campelo; María Julia Montoro; Torsten Haferlach; Andrés Jerez. Leukemia.* 2025.
- **Inflammatory microRNAs in cardiovascular pathology: another brick in the wall.** *Laura Zapata Martínez; Sonia Águila; Ascensión María de los Reyes-García; Salvador Carrillo-Tornel; María Luisa Lozano; Rocío González Conejero; Constantino Martínez. Front Immunol.* 2023.
- **NOTCH1 mutation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with an enhanced cell cycle G1/S transition and specific cyclin overexpression: Preclinical ground for targeted inhibition.** *Salvador Carrillo-Tornel; Tzu Hua Chen Liang; María Zurdo; Anna Puiggros; Andrea Gómez Llonín; María Dolores García Malo; Ernesto José Cuenca Zamora; Francisco José Ortuño; Ana María Hurtado López; Blanca Espinet; Andrés Jerez. Br J Haematol.* 2023.
- **Persistent Large Granular Lymphocyte Clonal Expansions: “The Root of Many Evils”—And of Some Goodness.** *Carlos Bravo Pérez; Salvador Carrillo-Tornel; Esmeralda García Torralba; Andrés Jerez. Cancers.* 2022.
- **Cancer Testis Antigens in Myelodysplastic Syndromes Revisited: a Targeted RNA-seq Approach.** *Ana María Hurtado López; Tzu Hua Chen Liang; María Zurdo; Salvador Carrillo-Tornel; Joaquín Panadero; Eduardo José Salido; Victor Beltrán; Begoña Muiña; MariLuz Amigo; Noelia Navarro Villamor; Rosa Cifuentes; Inés Calabria; Ana Isabel Antón; Raúl Teruel; Manuel Muro; Vicente Vicente; Andrés Jerez. Oncoimmunology.* 2020.

#### **COMUNICACIONES PRESENTADAS A CONGRESOS NACIONALES**

- **La inhibición selectiva de la gamma-secretasa revierte las alteraciones en el ciclo celular en la leucemia linfática crónica mutada para NOTCH1.**

*Salvador Carrillo Tornel; Ana María Hurtado López; Tzu Hua Chen Liang; Anna Puiggros; Andrea Gómez; Ernesto José Cuenca Zamora; María Dolores García Malo; Francisco José Ortuño; María Luisa Lozano; Blanca Espinet; Andrés Jerez.* LXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH). XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH). 38th World Congress of the International Society of Hematology (ISH). Barcelona, España. 06/10/2022 – 08/10/2022.

- **Variantes germinales en *ERCC6L2* en síndromes mielodisplásicos en adultos a edad temprana: lesiones somáticas concurrentes e impacto clínico.** *Salvador Carrillo Tornel; Tzu Hua Chen Liang; Ana Yeguas; Marta Santiago; Teresa Bernal; Helena Pomares; Raúl Teruel Montoya; Félix López Cadenas; Alessandro Liquori; Teresa González; Esperanza Such; Bernardo López Andrade; Francesc Solé; Blanca Xicoy; Francisca Hernández Mohedo; Montserrat Arnán; José Cervera; María Díez Campelo; Andrés Jeréz.* **SESIÓN PLENARIA.** LXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH). XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH). 38th World Congress of the International Society of Hematology (ISH). Barcelona, España. 06/10/2022 – 08/10/2022.
- **Inhibición de CDK4/6 en pacientes con leucemia linfática crónica y mutaciones en *NOTCH1*: bases preclínicas para una potencial terapia dirigida.** *Salvador Carrillo Tornel; Ana María Hurtado López; Tzu Hua Chen Liang; Anna Puiggros; Andrea Gómez Llonín; Ernesto José Cuenca Zamora; María Dolores García Malo; Francisco José Ortuño; Vicente Vicente García; Blanca Espinet; Andrés Jerez.* VI Jornadas Científicas IMIB-Arrixaca. Murcia, España. 16/11/2021.
- **Inhibición de CDK4/6 en pacientes con leucemia linfática crónica y mutaciones en *NOTCH1*: bases preclínicas para una potencial terapia dirigida.** *Salvador Carrillo Tornel; Ana María Hurtado López; Tzu Hua Chen Liang; Anna Puiggros; Andrea Gómez Llonín; Ernesto José Cuenca Zamora; María Dolores García Malo; Francisco José Ortuño; Vicente Vicente García; Blanca Espinet; Andrés Jerez.* LXIII Congreso Nacional de la SEHH y

XXXVII Congreso Nacional de la SETH. Pamplona, España. 14/10/2021 – 16/10/2021.

- **Proporción de eritroblastos CD71+ en médula ósea como factor predictivo de la respuesta a darbepoetina en síndromes mielodisplásicos.** *Salvador Carrillo Tornel; Tzu-Hua Chen Liang; Ana María Hurtado López; Alba María Casado Prieto; María Dolores García Malo; José Bartolo Nieto Campuzano; María Luisa Lozano Almela; Vicente Vicente García; Francisco José Ortuño Giner; Andrés Jerez Cayuela.* V Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca. Murcia, España. 23/11/2020.
- **Ventajas proliferativas de la leucemia linfática crónica con mutaciones en NOTCH1 a nivel clínico, inmunofenotípico y en genes moduladores del ciclo celular.** *Salvador Carrillo Tornel; Ana María Hurtado López; Tzu-Hua Chen Liang; Anna Puiggros; Andrea Gómez; María Dolores García Malo; Francisco José Ortuño Giner; Vicente Vicente García; Blanca Espinet; Andrés Jerez Cayuela.* V Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca. Murcia, España. 23/11/2020.
- **Proporción de eritroblastos CD71+ en médula ósea como factor predictivo de la respuesta a darbepoetina en síndromes mielodisplásicos.** *Salvador Carrillo Tornel; Tzu-Hua Chen Liang; Ana María Hurtado López; Alba María Casado Prieto; María Dolores García Malo; José Bartolo Nieto Campuzano; María Luisa Lozano Almela; Vicente Vicente García; Francisco José Ortuño Giner; Andrés Jerez Cayuela.* LXII CONGRESO NACIONAL DE LA SEHH XXXVI CONGRESO NACIONAL DE LA SETH. Formato Virtual. 26/10/2020 – 30/10/2020.
- **Ventajas proliferativas de la leucemia linfática crónica con mutaciones en NOTCH1 a nivel clínico, inmunofenotípico y en genes moduladores del ciclo celular.** *Salvador Carrillo Tornel; Ana María Hurtado López; Tzu-Hua Chen Liang; Anna Puiggros; Andrea Gómez; María Dolores García Malo; Francisco José Ortuño Giner; Vicente Vicente García; Blanca Espinet; Andrés Jerez Cayuela.* LXII CONGRESO NACIONAL DE LA SEHH XXXVI CONGRESO NACIONAL DE LA SETH. Formato Virtual. 26/10/2020 – 30/10/2020.

- **Efecto de los SNP de miR-146a y miR-196a en la modulación de la carga aterosclerótica en la artritis reumatoide.** *Reguilón L; Gómez JH; Carrillo-Tornel S; Saiz E; Pina MF; Aguila S; Garcia-Barberá N; Guijarro-Carrillo PJ; Guzmán-Almansa M; Hervés I; Plasencia JM; Herranz MT; López-Pedreira C; Pérez-Sánchez C; Lozano ML; Martínez C; Gonzalez-Conejero R.* LXVII Congreso Nacional de la SEHH - XLI Congreso Nacional de la SETH. Oviedo, España. 09/10/2025-11/10/2025.
- **El gilteritinib inhibe la actividad de PAD4 y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos humanos.** *Laura Zapata-Martínez; Jochem Nelen; Miriam Guzmán-Almansa; Salvador Carrillo-Tornel; Purificación Balibrea-Fernández; Nuria García-Barberá; Pedro J. Guijarro-Carrillo; Sonia Águila; Horacio Pérez; Irene Martínez-Martínez; Rocío González-Conejero; Constantino Martínez.* LXVII Congreso Nacional de la SEHH - XLI Congreso Nacional de la SETH. Oviedo, España. 09/10/2025-11/10/2025.
- **Los nanoplasticos modulan diferentes funciones en neutrófilos humanos, en particular la tromboinflamación.** *Pedro J. Guijarro-Carrillo; Purificación Balibrea-Fernández; Miriam Guzmán-Almansa; Adrián López-Carretero; Salvador Carrillo-Tornel; Nuria García-Barberá; Laura Zapata-Martínez; Sonia Águila; Pablo Pelegrín; Rocío González-Conejero; Constantino Martínez.* LXVII Congreso Nacional de la SEHH - XLI Congreso Nacional de la SETH. Oviedo, España. 09/10/2025-11/10/2025.
- **Búsqueda de nuevos inhibidores de PAD4 como herramientas terapéuticas en enfermedades tromboinflamatorias.** *Laura Zapata-Martínez; Jochem Nelen; Salvador Carrillo-Tornel; Nuria García-Barberá; Pedro J. Guijarro-Carrillo; Sonia Águila-Martínez; Horacio Pérez; Irene Martínez-Martínez; Rocío González-Conejero; Constantino Martínez.* IX Jornadas Científicas IMIB-Arrixaca. 21/11/2024.
- **Búsqueda de nuevos inhibidores de PAD4 como herramientas terapéuticas en enfermedades tromboinflamatorias.** *Laura Zapata Martínez; Jochem Nelen; Salvador Carrillo Tornel; Nuria García Barberá; Pedro J. Guijarro Carrillo; Sonia Águila; Horacio Pérez; Irene Martínez Martínez; Rocío González Conejero; Constantino Martínez.* LXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) - XL Congreso de la Sociedad

Española de Trombosis y Hemostasia (SETH). Palma de Mallorca, España. 24/10/2024-26/10/2024.

- **miR-146a Regula La Formación De NET A Través De Diferentes Mecanismos Moleculares Que Aumentan El Riesgo Cardiovascular Y Trombótico.** *Laura Zapata Martínez; Sonia Águila; Nuria García Barberá; María Piedad Fernández Pérez; Alejandra Aroca Crevillén; Pedro J. Guijarro; Ana Jiménez Espín; Salvador Carrillo Tornel; Andrés Hidalgo; Rocío González-Conejero; Constantino Martínez.* IX Jornadas Doctorales UMU-UPCT-CMN 2024. Murcia, España. 10/06/2024-12/06/2024.
- **Búsqueda de nuevas rutas moleculares implicadas en NETosis.** *L Zapata-Martínez; Isabel López-Sánchez; PJ Guijarro-Carrillo; C Molina-López; P Garrido-Rodríguez; S Águila; AM de los Reyes-García; N García-Barberá; S Carrillo-Tornel; ML Lozano; P Pelegrín; R González-Conejero; C Martínez.* LXV Congreso Nacional SEHH - XXXIX Congreso Nacional SETH - III Congreso Iberoamericano de Hematología. Sevilla, España. 26/10/2023 – 28/10/2023.
- **El genotipo rs2431697 de miR-146a condiciona un contexto tromboinflamatorio que se asocia con aterosclerosis en pacientes con artritis reumatoide.** *Reguilón L; Gómez JH; Águila S; Saiz E; Pina MF; Zapata L; Carrillo-Tornel S; García-Barberá N; Guijarro-Carrillo PJ; de los Reyes-García AM; Hervés Ignacio; Herranz Mayte; López-Pedreira Chary; Lozano Maria Luisa; Martínez Constantino; Gonzalez-Conejero Rocío.* LXV Congreso Nacional SEHH - XXXIX Congreso Nacional SETH - III Congreso Iberoamericano de Hematología. Sevilla, España. 26/10/2023 – 28/10/2023.
- **Síndrome mielodisplásico y sideroblastos en anillo sin mutación en SF3B1 en adultos jóvenes: asociación con variantes germinales en genes causantes de anemias sideroblásticas congénitas.** *Sandra Novoa Jáuregui; Tzu Hua Chen Liang; Sara Torres Esquiús; Salvador Carrillo Tornel; Marta Santiago; Teresa Bernal; Francisca Hernández Mohedo; Alessandro Liquori; Iván Martín; Bárbara Tazón Vega; Mar Tormo; Mónica del Rey; Laura Palomo; José Cervera; David Valcárcel; María Díez Campelo; Francesc Bosch; María Julia Montoro; Andrés Jerez.* LXV Congreso Nacional SEHH - XXXIX Congreso Nacional

SETH - III Congreso Iberoamericano de Hematología. Sevilla, España. 26/10/2023 – 28/10/2023.

- **Variantes germinales en *PIEZO1* en neoplasias mieloides diagnosticadas a edad temprana: prevalencia e impacto clínico.** *Marc Bosch Schips; Adoración Blanco; Tzu Hua Chen Liang; Salvador Carrillo Tornel; Bárbara Ymaine Tazón Vega; Teresa Bernal; Sandra Novoa Jauregui; Sofía Laura Muzio; Francisco Beas Hurtado; Irene Rocío Medina Rangel; Oriol Calvete; Sara Torres Esquiús; Laura Palomo; Sílvia Saumell Tutusaus; Francesc Solé; Júlia Montoro; David Benítez; David Valcárcel; María Díez Campelo; Andrés Jerez.* LXV Congreso Nacional SEHH - XXXIX Congreso Nacional SETH - III Congreso Iberoamericano de Hematología. Sevilla, España. 26/10/2023 – 28/10/2023.
- **Valor de marcadores tromboinflamatorios en el pronóstico de evento cardiovascular en supervivientes de neumonía adquirida en la comunidad.** *Laura Zapata Martínez; José García Flores; Ascensión María de los Reyes-García; Pedro Jesús Guijarro Carrillo; Sonia Águila; Nuria García Barberá; Paula González Jiménez; Raúl Méndez Ocaña; Rosario Menéndez; Salvador Carrillo Tornel; Carlos Pérez Sánchez; María Luisa Lozano; Constantino Martínez; Rocío González-Conejero.* LXV Congreso Nacional SEHH - XXXIX Congreso Nacional SETH - III Congreso Iberoamericano de Hematología. Sevilla, España. 26/10/2023 – 28/10/2023.
- **Impacto clínico de las mutaciones en *TP53* en SMD en adultos jóvenes según su estado alélico.** *Irene Gámez; Tzu Hua Chen Liang; Salvador Carrillo Tornel; Alessandro Liquori; Marta Santiago Balsera; Rosa Cifuentes; Mariam Ibáñez; Leonor Senent; Francisco José Ortuño; Esperanza Such; José Cervera; Raúl Teruel Montoya; Guillermo Sanz; Andrés Jerez.* LXIII Congreso Nacional de la SEHH y XXXVII Congreso Nacional de la SETH. Pamplona, España. 14/10/2021 – 16/10/2021.
- **Perfiles de co-ocurrencia de variantes germinales y adquiridas en síndromes mielodisplásicos en adultos jóvenes sin disfunción orgánica previa.** *Tzu Hua Chen Liang; Salvador Carrillo Tornel; Ana María Hurtado López; Bernardo López Andrade; Ángeles Medina; María Julia Montoro; Paloma García Martín; Esperanza Tuset; Rafael del Orbe; Lourdes Hermosín; Teresa Bernal; Fernando Ramos; Mar Tormo; Monserrat Arnan; Blanca Xicoy; María Díez Campelo;*

*Francesc Solé; Francisca Hernández; Guillermo Sanz; Andrés Jerez.* LXIII Congreso Nacional de la SEHH y XXXVII Congreso Nacional de la SETH. Pamplona, España. 14/10/2021 – 16/10/2021.

- **Predisposición genética para el desarrollo de síndromes mielodisplásicos.** *Andrés Jerez; Salvador Carrillo Tornel; Tzu Hua Chen Liang.* **PONENCIA INVITADA.** LXIII Congreso Nacional de la SEHH y XXXVII Congreso Nacional de la SETH. Pamplona, España. 14/10/2021 – 16/10/2021.

#### **COMUNICACIONES PRESENTADAS A CONGRESOS INTERNACIONALES**

- **ERCC6L2 in Early-Onset Adult Myelodysplastic Syndrome without Pre-Existing Disorder.** *Salvador Carrillo Tornel; Tzu Hua Chen Liang; Ana Yeguas Bermejo; Helena Pomares; Alessandro Liquori; Teresa González; Teresa Bernal del Castillo; Marta Santiago; Félix López Cadenas; Bernardo López Andrade; Raúl Teruel Montoya; Esperanza Such; Francisca María Hernández; Blanca Xicoy; Montserrat Arnan Sangerman; Francesc Solé; Jose Cervera; María Díez Campelo; Andrés Jerez.* 64TH ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION. New Orleans, Estados Unidos de América. 10/12/2022 – 13/12/2022.
- **NOTCH1 Mutation in CLL Enhances Cell Cycle G1/S Transition through Specific Cyclin Overexpression: Preclinical Ground for CDK4/6 Targeted Inhibition.** *Salvador Carrillo Tornel; Ana María Hurtado López; Tzu Hua Chen Liang; Anna Puiggros; Andrea Gómez Llonín; Ernestó José Cuenca Zamora; María Dolores García Malo; Francisco José Ortuño; Vicente Vicente García; Blanca Espinet; Andrés Jerez.* 63RD ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION. Atlanta, Estados Unidos de América. 11/12/2021 – 14/12/2021.
- **Effect of miR-146a and miR-196a SNPs modulating atherosclerotic burden in Rheumatoid Arthritis.** *Laura Reguilon; Jesús Humberto Gomez-Gomez; Salvador Carrillo Tornel; Encarnacion Saiz; Maria Francisca Pina; Sonia Aguila; Nuria García-Barberá; Pedro Jesús Guijarro-Carrillo; Miriam Guzmán-Almansa; Ignacio Hervés; Juana María Plasencia; Maria Teresa Herranz; Chary Lopez-Pedreira; Carlos Perez-Sanchez; María Luisa Lozano; Constantino Martínez; Rocío González-Conejero.* International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Washington, D.C., Estados Unidos de América. 21/06/2025-25/06/2025.

- **Gilteritinib inhibits PAD4 activity and neutrophil extracellular trap formation.** *Laura Zapata Martínez; Jochem Nelen; Miriam Guzmán Almansa; Salvador Carrillo Tornel; Purificación Balibrea Fernández; Nuria García Barberá; Pedro J. Guijarro Carrillo; Sonia Águila Martínez; María Luisa Lozano; Horacio Pérez; Irene Martínez Martínez; Rocío González Conejero; Constantino Martínez.* International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Washington, D.C., Estados Unidos de América. 21/06/2025-25/06/2025.
- **Nanoplastics promote NET formation in human neutrophils.** *Pedro Jesús Guijarro-Carrillo; Purificación Balibrea-Fernández; Miriam Guzmán-Almansa; Adrian Núñez-Sancho; Salvador Carrillo-Tornel; Nuria García-Barberá; Laura Zapata-Martínez; Sonia Aguila; María Luisa Lozano; Pablo Pelegrin; Rocío González-Conejero; Constantino Martínez.* International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Washington, D.C., Estados Unidos de América. 21/06/2025-25/06/2025.
- **miR-146a regulates NET formation through different molecular mechanisms, increasing cardiovascular and thrombotic risk.** *Laura Zapata Martínez; Sonia Águila; Nuria García Barberá; María Piedad Fernández Pérez; Alejandra Aroca Crevillén; Pedro J. Guijarro; Ana Jiménez Espín; Salvador Carrillo Tornel; Andrés Hidalgo; Rocío González-Conejero; Constantino Martínez.* International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Bangkok, Tailandia. 22/06/2024-26/06/2024.
- **Early-Onset Myelodysplastic Syndromes (MDS) with Ring Sideroblasts (RS) without SF3B1 Mutations in Adults: Enrichment with Germline Variants in Genes Responsible for Congenital Sideroblastic Anemias.** *Sandra Novoa Jáuregui; Tzu Chen; Sara Torres-Esquius; Salvador Carrillo-Tornel; Marta Santiago; Teresa Bernal Del Castillo; Francisca Maria Hernandez; Alessandro Liquori; Ivan Martin Castillo; Mar Tormo; Barbara Tazon; Adoracion Blanco; Laura Palomo; Jose Cervera; Francesc Bosch; David Valcarcel; Maria Diez-Campelo; Julia Montoro; Andres Jerez.* 65TH ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION. San Diego, Estados Unidos de América. 09/12/2023-12/12/2023.
- **Germline Predisposition in Myeloid Neoplasms Aged  $\geq 50$ : A Novel Approach for Allogeneic Stem Cell -Transplantation Decision-Making.** *Sara Torres-Esquius; Francisco Beas; Tzu Hua Chen; Laura Palomo; Salvador Carrillo-*

*Tornel; Sandra Novoa Jáuregui; Helena Pomares; Marta Santiago; Teresa Bernal Del Castillo; Nicolas Díaz Varela; Francisca Maria Hernandez; Blanca Xicoy; Bernardo López-Andrade; Lourdes Hermosín; Montserrat Arnan Sangerman; Esperanza Tuset; Barbara Tazon; Adoracion Blanco; Jose Cervera; Maria Diez-Campelo; Francesc Bosch; David Valcarcel; Maria Julia Montoro; Andres Jerez.* 65TH ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION. San Diego, Estados Unidos de América. 09/12/2023-12/12/2023.

- **Secondary findings in exome sequencing in 240 early-onset adult myelodysplastic syndromes without previous disorder.** *M.J. Montoro; S. Torres-Esquius; M. Verdejo-Sánchez; S. Carrillo-Tornel; T.H. Chen-Liang; F. Hernández-Mohedo; A. Martínez-Francés; M. Campelo; D. Valcárcel; A. Jerez.* 17th International Congress on Myelodysplastic Syndromes. Marsella, Francia. 03/05/2023 – 06/05/2023.
- **Germline and Somatic Variants Co-Occurrence Profile in Early Onset Adult Myelodysplastic Syndromes without a Preexisting Disorder.** *Tzu Hua Chen Liang; Salvador Carrillo Tornel; Marta Santiago; Bernardo López Andrade; Francisca María Hernández; Paloma García Martín; Félix López Cadenas; Mar Tormo; María Lourdes Hermosín; Teresa Bernal del Castillo; Esperanza Tuset; Ángeles Medina Pérez; Helena Pomares; Teresa Arquero; María Julia Montoro; Blanca Xicoy; Francesc Solé; Guillermo Sanz; David Valcárcel; María Díez Campelo; Andrés Jerez.* 63RD ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION. Atlanta, Estados Unidos de América. 11/12/2021 – 14/12/2021.
- **Myelodysplastic syndrome in young adults without previous organic dysfunction: predominance of germline variants in genes of DNA repair pathway and their clinical impact.** *Tzu-Hua Chen Liang; Salvador Carrillo Tornel; Ana María Hurtado; Marta Santiago; Esperanza Such; Laura Palomo; Miguel Ángel Rodríguez Gil; María José Jiménez; Rafael del Orbe; Félix López Cadenas; Mar Tormo; Lourdes Hermosín; Teresa Bernal; Eduardo Salido; Carmen Benet; Begoña Muiña; Raquel Oña; Nuria de Haro; Fernando Ramos; Francisco José Ortuño; Leonor Senent; Esperanza Tuset; Helena Pomares; Antonio Martínez Francés; Teresa Arquero; Julia Montoro; Raúl Teruel Montoya; José Cervera; David Varcárcel; Montserrat Arnán; Beatriz Arrizabalaga; María Díez Campelo; Blanca Xicoy; Francisca Hernández; Francesc Solé; Guillermo*

*Sanz; Andrés Jerez.* EHA Congress 2021. Formato Virtual. 09/06/2021 – 17/06/2021.

### **COLABORACIONES**

Durante la realización de esta Tesis hemos contado con la colaboración de los siguientes investigadores:

- **Dr. Raúl Méndez.** Servicio de Neumología, Hospital Universitario La Fe. Valencia, España.
- **Dra. Miriam Díez y Dr. José J. Fuster.** Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Laboratorio de fisiopatología hematovascular. Madrid, España.
- **Dr. Carlos Pérez-Sánchez.** Servicio de Reumatología, Hospital Universitario Reina Sofía. IMIBIC. Córdoba, España.
- **Dr. Djillali Annane.** Unidad General de Cuidados Intensivos. Laboratorio de Infecciones e inflamación. Versailles Central Hospital – André Mignot Hospital, Francia.