



**Facultad de Medicina**  
**Universidad Zaragoza**

MASTER EN INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

**UTILIDAD DE LA TROPONINA COMO**  
**BIOMARCADOR DE RIESGO**  
**CARDIOVASCULAR Y BÚSQUEDA DE**  
**NUEVOS BIOMARCADORES DE INFARTO**  
**AGUDO DE MIOCARDIO (microRNAs)**

Por: Cecilia Asinari

Director: Sebastian Menao Guillén

Departamento Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y  
Toxicología

Servicio de Bioquímica Clínica  
Hospital Clínico Universitario Losano Bleza

Zaragoza, España  
2012



Facultad de Medicina  
**Universidad** Zaragoza

**Master Iniciación a la Investigación en Medicina**  
**Cecilia Asinari**



## **1. ÍNDICE**



<b>1. ÍNDICE</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
2.1. Epidemiología del Síndrome coronario agudo	6
2.2. Definición y fisiopatología del Síndrome coronario agudo	7
2.3. Clasificación del Síndrome coronario agudo	9
2.4. Definición y diagnóstico del Infarto de miocardio	10
2.5. Biomarcadores del Infarto agudo de miocardio	11
2.6. Papel de la Troponina en la estratificación de riesgo cardiovascular	12
2.7. Necesidad de nuevos biomarcadores	14
2.8. microRNAs: Definición, descubrimiento y biogénesis	16
2.9. Aplicaciones de los microRNAs	18
2.10. microRNAs y Síndrome coronario agudo	20
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
3.1. Hipótesis	23
3.2. Objetivos	24
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
4.1. Estudio retrospectivo de la Troponina I como marcador de riesgo cardíaco	26
4.1.1. Pacientes	26
4.1.2. Criterios de clasificación	26
4.1.3. Análisis de datos	28
4.2. Determinación de microRNAs y Troponina I	28
4.2.1. Pacientes	28
4.2.2. Extracción de muestras y almacenamiento	29
4.2.3. Preparación del RNA y qRT-PCR	29
4.2.4. Análisis de troponinas	31
4.2.5. Análisis estadístico	31
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
5.1. Estudio retrospectivo de Troponina I como marcador de riesgo cardíaco	33
5.1.1. Análisis del riesgo de la población general	33
5.1.2. Seguimiento de los pacientes con riesgo de presentar un evento adverso futuro	36
5.2. Determinación microRNAs mediante RT-qPCR y su comparación con TnIc	39
<b>7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>40</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>44</b>

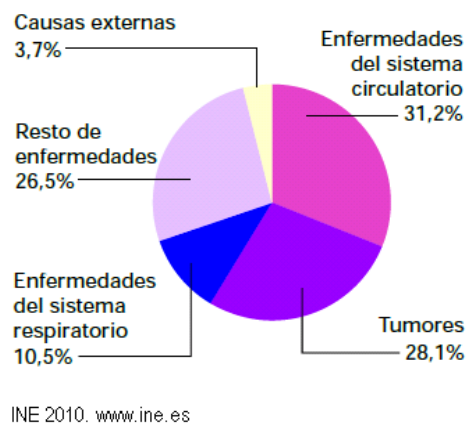


## **2. INTRODUCCIÓN**

## 2.1. Epidemiología del Síndrome coronario agudo

Las enfermedades del sistema circulatorio constituyen la principal causa de muerte para el conjunto de la población española. En 2010, último año para el que hay datos publicados, produjeron 119063 muertes lo que supone un 31,2% de todas las defunciones <sup>(1)</sup> (**Figura 1**).

**Figura 1. Causas de defunción según CIE**  
**(Clasificación internacional de enfermedades)**



A nivel mas detallado de enfermedades, las isquémicas del corazón en 2010 causaron 35259 muertes, lo que supone un 9,22% de todas las defunciones, de las cuales 15039 defunciones ocurrieron en las mujeres (42,7%) y 20220 en los varones (57,34%) <sup>(2)</sup>. Dentro de la enfermedad isquémica del corazón, el infarto agudo de miocardio es la más frecuente. Desafortunadamente, esta patología es muy letal y las tasas de reingreso se han estimado en 50% en los pacientes de menos de 45 años y en 38% en los de más de 75 años <sup>(3)</sup>.

Le siguen en frecuencia las Enfermedades cerebrovasculares, el Cáncer de bronquios y pulmón, la Insuficiencia cardíaca y por último las enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores (**Figura 2**). Las isquémicas fueron la primera causa en los hombres y las cerebrovasculares en las mujeres con un 58,1% <sup>(2)</sup>.

**Figura 2. Defunciones según las principales causas de muerte**

	Total
Todas las causas	382.047
Enfermedades isquémicas del corazón	35.259
Enfermedades cerebrovasculares	30.137
Cáncer de bronquios y pulmón	20.723
Insuficiencia cardíaca	16.025
Enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores	15.662

INE 2010. [www.ine.es](http://www.ine.es)

Muchas de las muertes por isquemia miocárdica se producen en la fase de descompensación de la enfermedad arteriosclerótica coronaria que se conoce como Síndrome coronario agudo (SCA). La gravedad del SCA y, en consecuencia, la morbi-mortalidad asociada al mismo depende de manera muy importante de que durante el mismo se produzca o no necrosis miocárdica.

## ***2.2. Definición y fisiopatología del Síndrome coronario agudo***

El término síndrome coronario agudo hace referencia a todos los cuadros clínicos relacionados con la isquemia miocárdica aguda. La isquemia es una situación producida por la privación de oxígeno causada por una disminución del

flujo sanguíneo a través de las arterias coronarias <sup>(4)</sup>. La causa mas frecuente de la isquemia es la reducción del flujo producida por una disminución u obstrucción de la luz arterial debidas principalmente a lesiones aterosclerosas de las grandes arterias epicárdicas coronarias. Otras causas menos frecuentes de la isquemia son los espasmos coronarios, trombosis coronaria, embolias, disección espontánea de las arterias coronarias, enfermedad de los pequeños vasos y arteritis.

En los primeros segundos, después del cese del flujo sanguíneo, se agota el oxígeno y el metabolismo se convierte en anaerobio, esto hace que se alteren las propiedades elásticas del miocardio, que cese la actividad contráctil, que disminuya el potencial de acción y por lo tanto aparecen cambios electrocardiográficos. Además, la isquemia provoca la liberación celular de diferentes sustancias que estimulan las terminaciones nerviosas y provocan el dolor característico de la isquemia miocárdica. Otra consecuencia de la isquemia es la alteración de las propiedades eléctricas de las células cardíacas, al reducir la energía necesaria para el funcionamiento de la bomba de sodio. Esta alteración eléctrica provoca a menudo arritmias cardíacas que pueden ser letales. Por último, la disminución del flujo coronario puede ser tan profunda que determine la muerte celular o produzca necrosis miocárdica <sup>(4)</sup>. Por lo tanto, las consecuencias de la isquemia son: el dolor coronario o angina de pecho, la disfunción diastólica o sistólica y su consecuencia la insuficiencia cardíaca, las arritmias que pueden determinar la muerte súbita y, por ultimo, la necrosis, es decir el infarto de miocardio. Estas patologías constituyen las formas de presentación más habituales de la cardiopatía coronaria y en un paciente determinado la enfermedad puede comenzar con cualquiera de ellas, es más, en su



evolución es habitual que estén presentes más de una. La angina de pecho es la forma inicial de presentación mas frecuente seguida por el infarto de miocardio y la muerte súbita.

### ***2.3. Clasificación del Síndrome coronario agudo***

El electrocardiograma (ECG) permite subdividir rápidamente a los pacientes con SCA en dos grandes grupos según si presentan o no elevación del segmento ST<sup>(5)</sup>. Es importante su diferenciación dado que el riesgo inmediato, tratamiento y gestión difieren según el grupo.

#### **✓ Pacientes con elevación del segmento ST:**

En presencia de síntomas sugestivos de isquemia miocárdica, la elevación del segmento ST en el ECG, o la existencia de un bloqueo de rama agudo, identifica al subgrupo de pacientes con mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares graves a corto plazo. El diagnóstico de infarto agudo de miocardio (IAM) se confirmará posteriormente a la obtención del ECG mediante la determinación de marcadores biológicos como veremos mas adelante.

Habitualmente estos pacientes presentan un IAM secundario a una oclusión coronaria completa que en ausencia de repermeabilización coronaria derivará la mayoría de las veces en un infarto de miocardio con onda Q (IMQ).

✓ Pacientes sin elevación del segmento ST:

Representan el grupo más frecuente y heterogéneo de pacientes, que incluye aquellos que presentan angina inestable (AI) e síndrome coronario agudo sin elevación del ST (SCASEST).

## ***2.4. Definición y diagnóstico del Infarto de miocardio***

El IAM se define como la necrosis miocárdica aguda de origen isquémico, secundaria generalmente a la oclusión trombótica de una arteria coronaria <sup>(4)</sup>. Este término debe ser usado solo cuando la evidencia de necrosis esta acompañada de un contexto clínico compatible con isquemia miocárdica.

Los criterios diagnósticos para el infarto de miocardio, según el último consenso de especialistas formado por la Sociedad Europea de Cardiología, el Colegio Americano de Cardiología, la Sociedad Americana de Cardiología y la Federación Mundial de Cardiología <sup>(6)</sup>, incluyen la detección de los Biomarcadores cardíacos, preferiblemente de Troponina, junto con evidencia de que el miocardio ha sufrido isquemia. Esta evidencia puede ser reconocida por los síntomas, por indicios de pérdida de miocardio viable en las pruebas de imagen, por cambios específicos en el electro cardiograma (ECG) o por desarrollo de ondas Q patológicas en el mismo.

## ***2.5. Biomarcadores del Infarto agudo de miocardio***

La muerte de las células cardíacas puede ser evidenciada por la presencia en sangre periférica de diversas sustancias liberadas por los miocitos dañados: Mioglobina, Troponinas cardíacas T e I, Creatinin kinasa (CK) y su isoenzima MB (CK-MB), Lactato deshidrogenasa (LDH), entre otras.

El biomarcador preferido es la troponina cardíaca T o I (TnTc o TnIc) ya que es el que presenta mayor especificidad y además, tiene una muy alta sensibilidad clínica <sup>(6)</sup>. Por lo tanto, encontrar un valor elevado de esta enzima en ausencia de isquemia debe hacernos sospechar otras causas de necrosis miocárdica, como por ejemplo miocarditis, disección aórtica, trombo embolismo pulmonar, entre otras. Para realizar el diagnóstico de IAM, las guías actuales recomiendan un punto de corte en el percentil 99 del valor de referencia de la población de individuos sanos con una imprecisión analítica (coeficiente de variación) menor o igual al 10% en este punto de corte <sup>(6)</sup>. Debe tomarse la primera muestra de sangre para su determinación pocas horas después de iniciados los síntomas y una segunda a las 6 – 9 horas. Algunos pacientes necesitaran una tercera muestra a las 12 – 24 horas si en las dos primeras determinaciones la Troponina no resultara elevada y la sospecha clínica de isquemia fuera muy alta. En un contexto clínico adecuado, solo una determinación por encima de los valores normales es suficiente para establecer el diagnóstico de infarto de miocardio. Los valores normales vienen dados por las diferentes técnicas que se utilicen para medir la concentración de troponinas en sangre.

Si la determinación de Troponina no esta disponible, la mejor alternativa es la CK-MB masa. Esta enzima se comienza a elevar a partir de las 4 a 6 horas de inicio del dolor precordial y tiene gran utilidad para valorar reinfartos ya que su vida media en plasma es de 48 a 72 horas. La determinación de CK no está recomendada para el diagnóstico de infarto de miocardio ya que es una enzima muy poco específica <sup>(6)</sup>. La mioglobina es el marcador mas precoz, a partir de las 2 horas de la instauración del proceso isquémico puede encontrarse elevada su concentración en plasma, pero su principal inconveniente es que su especificidad diagnóstica para el daño miocárdico es muy baja, aunque esto le confiere un valor predictivo negativo muy elevado sus determinaciones deben ser confirmadas posteriormente por otro marcador mas específico <sup>(7)</sup>.

**Figura 3. Tiempos de aparición y de permanencia de los marcadores bioquímicos cardíacos en sangre**

	Intervalo hasta elevación inicial (h)	Intervalo hasta nivel máximo	Duración de la elevación plasmática
Mioglobina	1-4	6-7 h	24 h
CK-MB	3-12	24 h	48-72 h
CK-MB isoformas	2-6	12-16 h	18-24 h
Troponina T	3-12	0,5-2 días	5-14 días
Troponina I	3-12	24 h	5-10 días

Bayón Fernández et al., 2002

## **2.6. Papel de la Troponina en la estratificación de riesgo cardiovascular**

Se entiende por estratificación de riesgo cardiovascular la elevación de la probabilidad de que el paciente con SCA padezca complicaciones cardiovasculares graves (muerte o IAM no fatal) ya sean a corto o largo plazo.

La estratificación del riesgo es fundamental a la hora de decidir el tratamiento y el nivel de ingreso hospitalario que requiere el paciente <sup>(5)</sup>. Los pacientes con SCA y elevación del segmento ST son de alto riesgo y deben ser detectados precozmente para iniciar el tratamiento lo antes posible e intentar limitar el tamaño del IAM. En estos pacientes las decisiones clínicas se toman sin esperar el resultado de los biomarcadores. En cambio, los pacientes con SCA y sin elevación del segmento ST son un grupo muy heterogéneo con un amplio espectro de riesgo de muerte o nuevos eventos isquémicos cardíacos a corto plazo, por ello la estratificación de riesgo es uno de los objetivos más importantes en la evaluación y tratamiento precoz de estos pacientes. Los biomarcadores tienen un papel muy importante en la estratificación de riesgo de estos pacientes.

Además de su indiscutido valor para el diagnóstico, las troponinas cardíacas han demostrado su utilidad para la identificación de individuos de alto riesgo <sup>(8-10)</sup>. La elevación de la troponina por encima de 0,04 ng/mL en pacientes que han presentado dolor torácico se correlaciona con una alta probabilidad de que la etiología de dicha patología sea la cardiopatía isquémica, aunque el ECG y el resto de enzimas no presenten alteración alguna. Esta capacidad predictiva es aún mas acentuada en el caso de dolores torácicos prolongados en los que el hallazgo de cifras elevadas de TnIc se asocia casi siempre con enfermedad coronaria <sup>(11-14)</sup>.

También se ha visto que aumento de las troponinas a niveles intermedios se asocian a tasas mas altas de eventos cardiovasculares comparadas con niveles normales en el contexto de un SCA, pero el significado de estas troponinas con

valores intermedios en pacientes sin clínica es muy variado <sup>(15, 16)</sup>. A pesar que los valores altos de Tn predicen el riesgo de un evento adverso futuro, se necesitan mas estudios para encontrar esta relación con valores intermedios donde el daño miocardio aún no es irreversible <sup>(17)</sup>.

La reciente mejora en el rendimiento de los ensayos de troponina para cumplir con las guías actuales para el diagnóstico de IAM ha resultado en el descubrimiento de una nueva generación de ensayos con mejor sensibilidad clínica, las Troponinas de alta sensibilidad (hsTn). Esta nueva forma de determinar la troponina ha demostrado ser útil para identificar pacientes en riesgo o con probabilidades de presentar eventos adversos futuros <sup>(18, 19)</sup>.

Los rangos de normalidad de las Tn cardíacas han cambiado con la llegada de test más sensibles, pero la validez de las pequeñas elevaciones sigue siendo un tema bastante polémico <sup>(15)</sup>.

## **2.7. Necesidad de nuevos biomarcadores**

A pesar que en la actualidad las troponinas cardíacas desempeñan un papel central para establecer el diagnóstico y estratificar el riesgo del infarto de miocardio, el interés en encontrar nuevos biomarcadores persiste debido a algunas limitaciones que tiene esta determinación. El comienzo de la elevación de los niveles sanguíneos de la Troponina ocurre a las seis horas de iniciados los síntomas ya que alrededor del 90% esta ligada estructuralmente al complejo tropomiosina y sólo aparece en el

plasma tras lesiones celulares irreversibles (muerte celular) <sup>(7)</sup>, limitando su utilidad para establecer el pronóstico y estratificar el riesgo y limitando también la utilidad del tratamiento. Hay que tener en cuenta también que, si bien su elevación refleja necrosis miocárdica, no indica su mecanismo y esto puede ser muy importante para encontrar nuevas dianas terapéuticas <sup>(20)</sup>. Por último, puede elevarse en otras situaciones diferentes a la isquemia miocárdica, como por ejemplo en la insuficiencia renal, patología que frecuentemente se asocia a la enfermedad cardiovascular <sup>(20, 21)</sup>.

Es muy importante tomar decisiones terapéuticas rápidamente en estos pacientes con enfermedad cardiovascular, ya que la eficacia del tratamiento trombolítico y de la angioplastia primaria está en función de la precocidad con que se realizan en el transcurso del IAM, se considera que una hora de adelanto en el tratamiento permite salvar 1,5 vidas por cada 1000 pacientes tratados <sup>(12)</sup>. El desarrollo de nuevas pautas terapéuticas en la angina inestable, incluyendo el empleo de antagonistas del receptor glucoprotéico IIb/IIIa y la angioplastia coronaria, han puesto de manifiesto la necesidad de seleccionar con la mayor rapidez posible a los pacientes que pueden beneficiarse de un tratamiento mas intensivo.

Por ello se plantea la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores que tengan la capacidad de detectar con fiabilidad la presencia de isquemia en ausencia de necrosis de los miocitos, y que comiencen a elevarse más precozmente <sup>(22)</sup>. Los últimos avances tecnológicos y científicos en el ámbito de la genómica han permitido el desarrollo de nuevos biomarcadores que permitan abordar las necesidades actuales y/o mejorar la efectividad del diagnóstico y del tratamiento en esta

patología. Así surgen los microRNA, pequeños RNA no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post transcripcional.

## **2.8. microRNAs: Definición, descubrimiento y biogénesis**

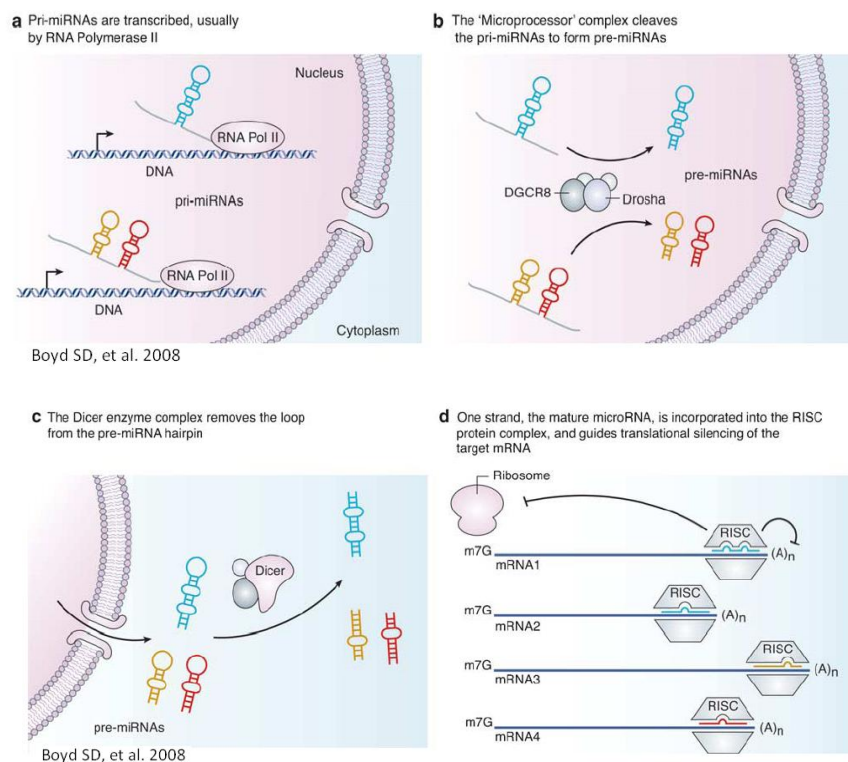
Los microRNAs (miRNA o miR) son RNAs de cadena sencilla, de 21 a 22 pares de bases de longitud, que han demostrado tener un papel clave en la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular. Los genes que los codifican están ubicados en los cromosomas y la mayoría se encuentran agrupados. Podemos agrupar los microRNAs, según su localización en el genoma, en dos categorías: a) miRNAs intergénicos, se encuentran entre los genes codificantes de proteínas y b) miRNAs intragénicos, se encuentran dentro de estos genes. Los intragénicos pueden ser intrónicos o exónicos, según se encuentren dentro de los intrones o exones del gen codificante de proteínas, y a su vez pueden estar en la región no codificante 3' o 5'. La mayoría de los RNAs que se han identificado en humanos son intergénicos (42%) e intragénicos intrónicos (44%) <sup>(23)</sup>.

Fueron descubiertos por Ambros et al. en 1993 mientras estaban estudiando el desarrollo larval del *C. elegans*. Describieron el primer RNA: el lin-4 <sup>(24)</sup>. Hoy sabemos, que solo en el genoma humano existen cientos de RNAs. Según miRBase, la base de datos en línea que contiene información sobre microRNAs, existen actualmente 6200 secuencias de microRNAs maduros publicados que incluyen los más de 700 microRNAs encontrados en humanos <sup>(25)</sup>.



Los microRNAs se generan a partir de transcripciones primarias, llamadas miRNAs primarios (pri-miRNAs), producidas por la ARN polimerasa II o por la RNA polimerasa III. Un complejo de proteínas nucleares llamado "microprocesador" (que consiste en la proteína Drosha tipo RNasa III, la doble cadena ARN-proteína de unión DGCR8, y una serie de otras proteínas), escinde los pri-miRNAs generando microRNAs precursores (pre-miRNAs) y permitiendo su exportación al citoplasma. Allí, los pre-miRNAs son procesados por un complejo de proteínas que contiene a la proteína Dicer RNasa tipo III que escinde al microRNA a su tamaño maduro. El microARN maduro se asocia con un complejo de proteínas finales llamado miRISC (complejo microRNA-silenciación inducida), que lleva a cabo el silenciamiento de los genes dirigido por el microRNA <sup>(26)</sup>.

**Figura 5. Biosíntesis de los microRNAs**



## **2.9. Aplicaciones de los microRNAs**

A partir de su descubrimiento se han ido postulando diversas aplicaciones de los microRNAs, primero determinando la expresión en tejidos y luego, a partir de su demostración en sangre periférica, la determinación en suero/plasma. La mayoría de las veces solo un microRNA regula la expresión de varios genes con funciones relacionadas y así modificar procesos biológicos complejos.

Los microRNAs regularían la apoptosis celular y estarían implicados en la fisiopatología de muchas enfermedades asociadas con proliferación celular y apoptosis. Actuarían reprimiendo la expresión de genes tanto proapoptóticos como antiapoptóticos. Además, se cree que podrían ser utilizados como nuevas dianas terapéuticas para estas enfermedades <sup>(23)</sup>.

Se esta evaluando si los microRNA podrían usarse como marcadores de progresión de las enfermedades, como factores pronósticos y para estratificar el riesgo, principalmente en el área de la oncología ya que podrían comportarse como supresores de tumores y oncogenes. Actualmente se esta evaluando su relación con diferentes clases de tumores como Cáncer de próstata, Carcinomas escamosos de cabeza y cuello, Cáncer de mama, Leucemia linfoblástica aguda, Mesoteliomas malignos, entre otros <sup>(27-29)</sup>.

En el campo de la Endocrinología y el metabolismo se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-375 inhibe la secreción de la insulina promovida por la

glucosa <sup>(30)</sup>. Y un estudio reciente demuestra que miR-122 regula el metabolismo lipídico en el hígado <sup>(31)</sup>.

La mayoría de los estudios se basan en la detección de los miRNA en los tejidos pero también pueden ser detectados en sangre periférica y podrían ser usados como biomarcadores potenciales <sup>(32)</sup>. Por eso, nos ofrecen una oportunidad única para el diagnóstico de diversas enfermedades, ya que algunos son producidos específicamente dentro de las células de diferentes tejidos existiendo la posibilidad de poder ser empleados como marcadores de la patología específica de cada uno <sup>(33)</sup>. El mecanismo de liberación a la sangre periférica todavía no es claro, pero se cree que serían secretados en micro vesículas llamadas exosomas <sup>(34)</sup>. También se ha postulado que los microRNA circulantes o incluidos en estas micro vesículas tendrían una función de comunicación celular y de autorregulación entre células distantes <sup>(35)</sup>.

Los microRNA se han convertido rápidamente en un objetivo farmacológico para el tratamiento de las enfermedades vasculares. El descubrimiento de los anti-miR (oligonucleótidos antisentido con la secuencia reversa complementaria de los miRNA objetivo) y de los miRNA-imitación (RNA sintético en el que una hebra es idéntica al microRNA maduro y esta destinada a imitarlo) ha permitido inhibir, de una manera relativamente fácil y rápida, la actividad de miRs individuales in vitro e in vivo <sup>(36, 37)</sup>.

## **2.10. *microRNAs y Síndrome coronario agudo***

Un buen biomarcador de cualquier patología debe ser accesible utilizando técnicas no invasivas, económico, específico de la patología en cuestión y un indicador seguro de la enfermedad antes que aparezcan los síntomas clínicos. Dado que los microRNAs son abundantes, fáciles de medir y relativamente estables en suero/plasma, la sangre periférica es una fuente particularmente atractiva para la determinación rutinaria de estas moléculas. A partir de esta premisa, diversos estudios han intentado demostrar que en muestras de plasma de pacientes con infarto agudo de miocardio se encuentran elevados diversos microRNAs.

Un estudio realizó un análisis de expresión en tejido miocárdico de los diversos tipos de miRNA usando RT-PCR y encontraron que 43 miRNAs diferentes se expresan en diversas patologías cardíacas <sup>(38)</sup>. Varios estudios los han implicado en la regulación de la hipertrofia cardíaca en modelos con ratas en respuesta al estrés tanto patológico como fisiológico <sup>(39, 40)</sup>, en la regulación de la apoptosis de los cardiomiocitos <sup>(41)</sup>, en la regulación de las arritmias por isquemia <sup>(42)</sup> y de la angiogénesis post isquemia <sup>(43)</sup>. Otros demostraron que diversos subtipos de microRNAs se elevan en el plasma en diversas patologías cardíacas, y por tanto podrían ser usados como biomarcadores del infarto de miocardio <sup>(44-48)</sup>.

Se ha demostrado que el miR-208 solo se expresa en los miocitos cardíacos <sup>(39)</sup> y estudios en animales demuestran que podría ser usado como un biomarcador potencial de daño miocárdico comparado con la Troponina I <sup>(49)</sup>. En un estudio que analizó pacientes con angor demostró que los niveles plasmáticos de miR-208



podían detectar pacientes con IAM con una sensibilidad del 90.9% y una especificidad del 100% en las primeras 4 horas de iniciados los síntomas de enfermedad isquémica cardíaca. Este miR, que resulto ser el mas sensible y específico de los cuatro miRs investigados en este estudio, pudo detectarse en todos los pacientes mientras que la Troponina medida paralelamente solo pudo detectarse en el 85% <sup>(45)</sup>.

Otro trabajo postula a los subtipos -1 y -133 como biomarcadores de la cardiopatía isquémica, ya que en humanos se elevaron antes que las troponinas <sup>(44)</sup>.

Se estudio también el papel del miR-499 en el infarto de miocardio y se concluyó que se produce casi exclusivamente en el corazón y está elevado en individuos con IAM pero están por debajo del límite de detección en pacientes sanos del grupo control <sup>(46)</sup>.

Todos estos estudios apoyan la hipótesis de que los microRNAs presentes en sangre periférica pueden convertirse en biomarcadores útiles y seguros en la enfermedad coronaria y en otras enfermedades cardiovasculares.



### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **3.1. Hipótesis**

Las troponinas son los biomarcadores de elección en la actualidad, diversos estudios han demostrado su buena sensibilidad y especificidad. Además, se ha confirmado su utilidad como predictoras y estratificadoras de riesgo ya que valores altos de Troponina predicen el riesgo de sufrir eventos adversos en el futuro y la magnitud de su elevación se correlaciona con ese riesgo. Se postula que valores intermedios, comprendidos entre 0,05 y 0,5 ng/mL, que no se traducen fisiopatológicamente en necrosis miocárdica ni clínicamente en IAM, podrían predecir estos eventos isquémicos graves en el futuro.

En el SCA es muy importante realizar un diagnóstico precoz para poder instaurar el tratamiento oportuno lo antes posible. Se cree que los microRNAs se transcriben a nivel celular cuando las células miocárdicas sufren un daño mínimo que no llega a la muerte celular, en este caso por isquemia, y por ello podrían realizar un diagnóstico más precoz que los biomarcadores actuales permitiendo la instauración del tratamiento oportuno disminuyendo así la morbi-mortalidad de esta patología. Además, podrían ser utilizados como predictores y estratificadores de riesgo ya que pequeños cambios en su concentración en sangre periférica, es decir antes de que se produzca un daño celular irreversible, nos indicaría el riesgo de sufrir un evento adverso en el futuro.



### **3.2. Objetivos**

- ✓ Evaluar la utilidad pronóstica de valores intermedios de Troponina I en pacientes con clínica de dolor torácico en relación con infarto en episodios posteriores.
  
- ✓ Otro de los propósitos de este estudio es verificar la utilidad como prueba de cribado de los valores de microRNA en sangre, para establecer el diagnóstico de IAM, en especial cuando las cifras de Troponinas no otorguen suficiente evidencia diagnóstica.
  
- ✓ Además se intentará demostrar la utilidad de los microRNAs en el diagnóstico en humanos y sus posibles ventajas (sensibilidad, especificidad y pronóstico) frente a los marcadores bioquímicos utilizados en la actualidad.





## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



El presente trabajo cuenta con dos partes para intentar cumplir con los objetivos planteados. La primera, analizar las troponinas cardíacas determinadas en el Laboratorio de urgencias en los últimos cuatro años y la segunda, que aún se encuentra en la fase de recolección de muestras, consiste en determinar los niveles sanguíneos de diferentes clases de microRNAs.

#### ***4.1. Estudio retrospectivo de la Troponina I como marcador de riesgo cardíaco***

##### **4.1.1. Pacientes**

Se recopilaron, mediante el programa informático del Laboratorio del urgencias *Modulab Gold* (Izasa), todas las determinaciones de Troponinas de los últimos cuatro años (de agosto de 2008 a julio 2012) de pacientes del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza, ya sea que visitaron el Servicio de Urgencias o que permanecieron ingresados en alguno de sus servicios.

##### **2.4.2. Criterios de clasificación**

Se creo una base de datos que incluye, además de los datos personales de los pacientes como número de historia clínica, sexo y fecha de nacimiento, las determinaciones de Tn en las diferentes consultas, a las cuales llamaremos eventos, y el diagnóstico clínico realizado en cada una de ellas.

Los eventos se clasificaron en tres grupos, según los valores de troponinas: grupo bajo, medio y alto. En el primero los valores de Tn son  $<0,05$  ng/ml, en el segundo se encuentran entre  $0,05 - 0,50$  ng/mL y en el tercero son  $>0,50$  ng/mL.

Por otro lado, se clasificaron los pacientes con dos eventos según los valores de Tn con el objetivo de realizar un análisis posterior mas detallado:

- ✓ Grupo I – FALSO PRONÓSTICO: valores de Tn medios en un primer evento que son seguidas por valores bajos en eventos posteriores.
- ✓ Grupo II – FUTURO RIESGO: valores de Tn medios en un primer evento que son seguidas por los mismos valores en eventos futuros.
- ✓ Grupo III – PRONÓSTICO CORRECTO: valores de Tn medios en un primer evento que son seguidas por valores altos en eventos futuros.
- ✓ Grupo IV – POSIBLE RIESGO: valores de Tn bajos y que en eventos futuros tienen valores medios.
- ✓ Grupo V – NO PRONOSTICADO: valores de Tn que en un primer evento son bajos y que en eventos futuros tienen valores altos.
- ✓ Grupo VI - CONDICIONADOS: valores de Tn que en un primer evento son altas y que el eventos posteriores son medias.

#### **4.1.3. Análisis de datos**

Se utilizó el programa *Microsoft Excel v.2007* (Microsoft) para realizar el análisis de los datos. Dado que todas las variables del estudio son categóricas se elaboraron tablas de contingencia para el análisis de las mismas y se realizó el Test Chi-cuadrado para evaluar la independencia entre ellas. Se consideró como significación estadística un valor de  $p < 0,01$ .

### **4.2. Determinación de microRNAs y Troponina I**

Paralelamente al trabajo anterior se ha realizado el diseño de los experimentos que han de conducir al estudio de los microRNAs como biomarcadores del daño miocárdico. Este experimento va a ser desarrollado en los próximos años durante la Tesis Doctoral.

#### **4.2.1. Pacientes**

Se incluirán en forma prospectiva 50 pacientes admitidos en el Servicio de Urgencias del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza con sospecha diagnóstica de IAM, para realizar la determinación de los microRNAs. Los criterios de inclusión serán: dolor precordial anginoso en las 24 horas, con características de empeoramiento de una angina crónica estable, inicio de la angina dentro de los primeros 30 días previos a la consulta en urgencias o dolor precordial de reposo o ante esfuerzos mínimos.

#### 4.2.2. Extracción de muestras y almacenamiento

A los pacientes incluidos se les realizarán extracciones seriadas a la hora, 6 horas y 12 horas del ingreso en urgencias de sangre total en tubos de EDTA para realizar la determinación de microRNAs. Se las centrifugará a 3000 rpm durante 10 minutos para la separación de la sangre completa a suero y plasma. Posteriormente se almacenará el plasma en tubos libres de RNAsas a -80°C hasta su procesamiento.

#### 4.2.3. Preparación del RNA y qRT-PCR

Para extraer el RNA de las muestras de plasma deben utilizarse kits específicos de los cuales encontramos diversas opciones según la marca comercial:

- ✓ *miRCURY RNA Isolation kit* (Exiqon)
- ✓ *TriZOL LS* (Invitrogen)
- ✓ *mirVana PARIS kit* (Ambion)

Se procederá a la síntesis de cDNA a partir de ARN mediante la enzima transcriptasa reversa (TR). Hay varias TR utilizadas comúnmente como la del virus aviar de mioblastosis, la del virus de leucemia murina y también pueden utilizarse mezclas de RT. Las casas comerciales no dan diferentes opciones:

- ✓ *Universal cDNA síntesis kit* (Exiqon)
- ✓ *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystem)



Finalmente se determinará la concentración miR-1, miR-133a, miR-499 y miR-208 en plasma mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) en el equipo *Light Cycler 480* (Roche).

En cuanto a la amplificación mediante qPCR, varios métodos se han desarrollado para cuantificar el producto de la PCR. Hay dos clases de marcadores fluorescentes: los específicos emplean sondas de ácidos nucleicos que se unen a amplicones específicos y los genéricos utilizan colorantes que se unen a todas las secuencias de doble cadena de DNA. Según esta clasificación y las diferentes casas comerciales tenemos:

- ✓ *TaqMan small RNA assays* (Applied biosystem)
- ✓ *mercury LNA universal RT microRNA PCR system* (Exiqon)

Una vez obtenidos los resultados se debe realizar el análisis de los mismos en la curva de fusión o "*melt curve*". Comúnmente se emplean dos estrategias para llevar a cabo la cuantificación mediante las curvas de fusión, estas son cuantificación absoluta y cuantificación relativa. La primera utiliza una curva de calibración que permiten la generación d datos específicos y sensibles en tanto que, la relativa no requiere estándares con concentraciones determinadas porque utiliza genes de reerencia internos o genes "*housekeeping*".



#### **4.2.4. Análisis de troponinas**

A estos mismos grupos y en las mismas extracciones seriadas se les determinará la concentración en suero de la Troponina cardíaca I (TnIc) mediante un método inmunoenzimático quimioluminiscente de dos anticuerpos en el equipo *Access 2 Immunoassay System* (Beckman coulter).

#### **4.2.5. Análisis estadístico**

El análisis de los datos obtenidos de la RT-qPCR se realizará mediante el programa *GenEx* (Exiqon). Para el análisis estadístico de los datos se utilizará el software informático *SPSS v.15*.



## **5. RESULTADOS**



## ***5.1. Estudio retrospectivo de Troponina I como marcador de riesgo cardíaco***

Se determinaron 36359 Troponinas en el Laboratorio e Urgencias, las cuales pertenecen a 14251 pacientes. Se excluyeron los pacientes con más de dos eventos con el propósito de unificar criterios a la hora de clasificarlos y facilitar el seguimiento de los mismos.

### **5.1.1. Análisis del riesgo de la población general**

En un primer análisis el objetivo fue probar la capacidad de las Tn con valores intermedios para estimar el riesgo de presentar en un evento futuro un posible infarto. Para ello, se partió de la población inicial (n=13315) y se excluyeron los pacientes que en un primer evento tuvieron un valor de Tn alto ( $>0,50$  ng/mL) ya que estos pacientes presentaron un infarto en el primer evento y el riesgo de presentar otro esta condicionado. También se excluyeron aquellos pacientes que en un segundo evento tuvieron un valor medio (entre 0,05 y 0,5 ng/mL) ya que constituyen una zona indefinida que solo podrán evaluarse en el futuro. Finalmente se trabajó con 11108 pacientes.

La probabilidad de sufrir un posible infarto ( $Tn > 0,50$  ng/mL) dado que en el primer evento el valor de las Tn fueron bajas es del 0,79%, mientras que la probabilidad de sufrir un posible infarto aumenta a 2,31% cuando en el primer evento el valor de las Tn fue medio. En la **Tabla 1** se presentan los resultados en la tabla de

contingencia. Se realizó una prueba de Chi cuadrado y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las probabilidades de infarto ( $p < 0,01$ ). Por lo tanto, podemos decir que un posible infarto de miocardio es 3 veces mas probable si en el primer evento se determinan Tn medias ( $OR = 2,99$ ).

**Tabla 1. Probabilidad de posible infarto**

1º Evento	2º Evento		
	Normal	Posible IAM	Total
Tn bajas	9090	72	9162
Tn medias	1901	45	1946
Total	10991	117	11108

$\chi^2$  observado = 35,89

$\chi^2$  ajustado = 34,44

Prob = 2,1E-09

$\chi^2$  crítico al 99% = 6,63

Como se muestra la **Tabla 2**, la probabilidad de sufrir un evento adverso coronario (IAM, SCA sin elevación del ST, Angor, Cardiopatía isquémica en general o exitus) es del 0,36% si en el primer evento el valor de las Tn fue bajo, pero esta probabilidad asciende al 1,23% si el valor fue medio. Al realizar el Test estadístico de Chi cuadrado se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las probabilidades de un evento coronario ( $p < 0,01$ ). Por lo tanto, podemos decir que la probabilidad de que un paciente que en el primer evento tuvo valores de Tn medios presente un efecto adverso es del 78% comparado con un paciente que en el primer evento tuvo valores de Tn bajos ( $OR = 3,45$ ).

**Tabla 2. Probabilidad de evento adverso coronario**

1º Evento	2º Evento		
	Sin EAC	Con EAC	Total
Tn bajas	9129	33	9162
Tn medias	1922	24	1946
Total	11051	57	11108

$\chi^2$ observado = 23.97	$\chi^2$ ajustado = 22.29
Prob = 9.79E-07	$\chi^2$ crítico al 99% = 6,63

Se realizó el estudio estadístico por separado según el diagnóstico en el segundo evento, IAM o Exitus, y se encontró que en estos casos también existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p < 0,01$ ). Los resultados se muestran en las **Tablas 3 y 4**.

**Tabla 3. Probabilidad de IAM**

1º Evento	2º Evento		
	Sin IAM	Con IAM	Total
Tn bajas	9145	17	9162
Tn medias	1935	11	1946
Total	11080	28	11108

$\chi^2$ observado = 9.20	$\chi^2$ ajustado = 7.76
Prob = 2.41E-03	$\chi^2$ crítico al 99% = 6,63

**Tabla 4. Probabilidad de Exitus**

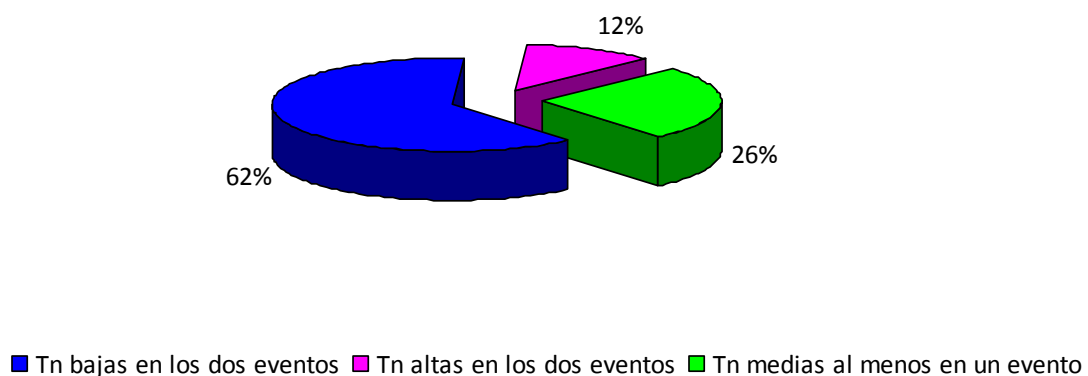
1º Evento	2º Evento		
	Sin Exitus	Con exitus	Total
Tn bajas	9147	15	9162
Tn medias	1932	14	1946
Total	11079	29	11108

$\chi^2$ observado = 19.04	$\chi^2$ ajustado = 16.96
Prob = 1.3E-05	$\chi^2$ crítico al 99% = 6,63

### 5.1.2. Seguimiento de los pacientes con riesgo de presentar un evento adverso futuro

Partiendo de los resultados del anterior análisis se realizó un seguimiento de los pacientes con riesgo de presentar un evento adverso en el futuro (IAM o Exitus). Se partió desde la misma población inicial que el anterior análisis y se seleccionó una subpoblación (n=527) en la que en algún evento los valores de Tn estuvieron entre 0,05 y 0,50 ng/mL, por lo tanto se excluyeron a los pacientes a los cuales en los dos eventos las Tn fueron bajas o altas (**Figura 1**).

**Figura 6. Determinaciones de Tn en dos eventos**



A esta subpoblación se la clasifíco en grupos según los valores de Tn para poder realizar un mejor análisis de los datos (**Figura 7**). Hay 319 hombres y 207 mujeres (61% y 39% respectivamente) y según la distribución por edad, la mayoría de los pacientes (67%) están comprendidos entre los 70 y los 90 años de edad (**Tabla 2**).

Figura 7. Clasificación según valores de Tn

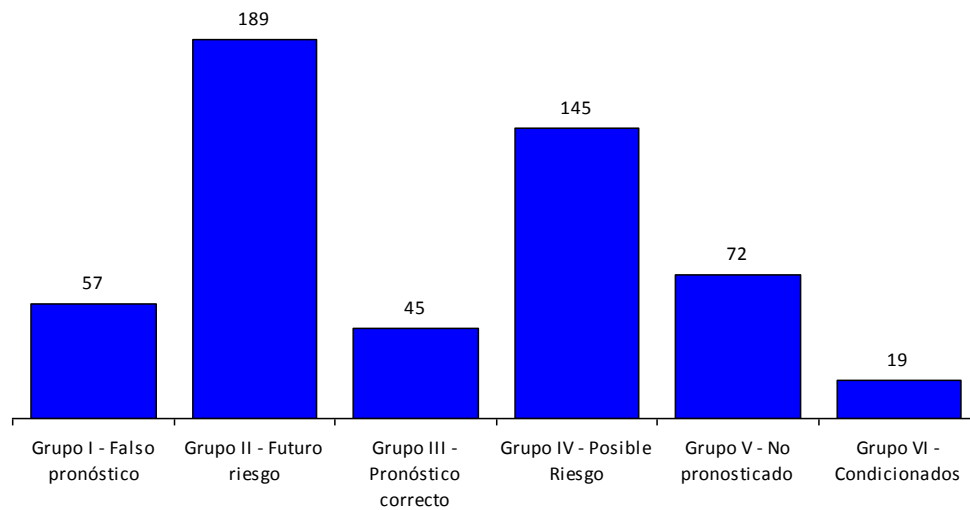


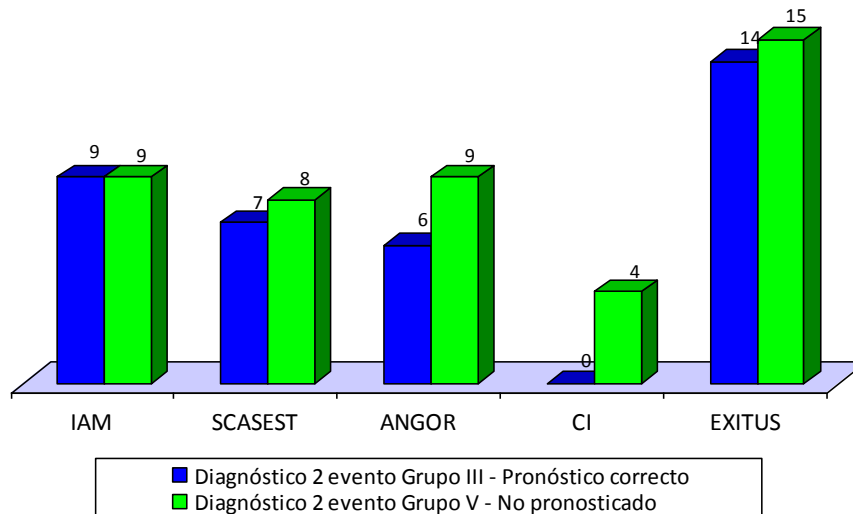
Tabla 2. Distribución de edades según clasificación

EDAD	Grupo I - Falso pronóstico	Grupo II - Futuro riesgo	Grupo III - Pronóstico correcto	Grupo IV - Posible riesgo	Grupo V - No pronosticado	Grupo VI - Condicionados	Total general
20-29	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
30-39	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%
40-49	1%	1%	0%	1%	1%	0%	3%
50-59	0%	4%	0%	4%	1%	1%	10%
60-69	3%	5%	1%	3%	2%	1%	15%
70-79	4%	13%	4%	8%	5%	1%	35%
80-89	3%	12%	3%	10%	4%	0%	32%
90->100	0%	2%	0%	1%	1%	0%	4%
Total general	11%	36%	9%	28%	13%	4%	100%

Se escogieron el grupo III, de pronóstico correcto, (Tn entre 0,05 y 0,5 ng/mL en un primer evento que son seguidas por valores mayores a 0,5 ng/mL en el segundo) y el grupo V, no pronosticados (Tn que en un primer evento son menores a 0,05 ng/mL y que en el segundo evento tienen valores mayores a 0,5 ng/mL) para comparar el riesgo de sufrir un evento adverso en el futuro. Se revisaron los diagnósticos clínicos en el primer y segundo evento y se contabilizaron los pacientes

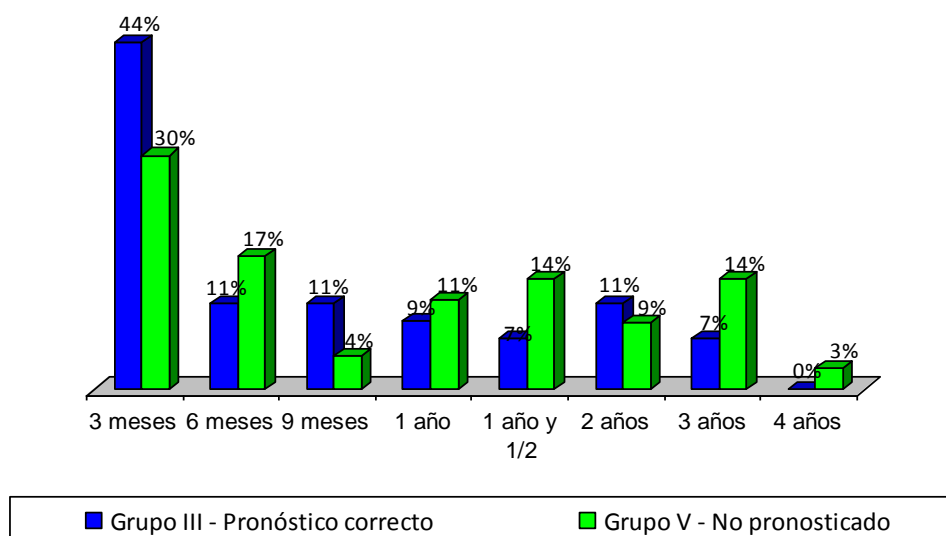
que presentaron patologías cardíacas en el segundo evento relacionadas con el SCA, especialmente IAM y Exitus (**Figura 8**).

**Figura 8. Diagnóstico en el segundo evento según grupos**



Se analizo también, el tiempo que pasa entre el primer y el segundo evento, encontrando que la mayoría (63%) vuelve antes del primer año y que en los primeros tres meses vuelve un 30% de los pacientes (**Figura 9**).

**Figura 9. Tiempo entre el primer y segundo evento**



## **5.2. Determinación microRNAs mediante RT-qPCR y su comparación con Tnlc**

Se presenta la elección de la metodología y los materiales que van a ser utilizados, así como los resultados esperados del experimento que va a ser desarrollado en los próximos años durante la Tesis Doctoral.

Se utilizará como kit de extracción *miRCURY RNA Isolation kits* (Exiqon) debido a su compatibilidad con la marca del equipo de RT-qPCR. Se decide utilizar el kit *Universal cDNA síntesis kit* (Exiqon) para la síntesis de cDNA y el kit *mircury LNA universal RT microRNA PCR system* (Exiqon) que utiliza marcadores fluorescentes genéricos (*SYBR Green master mix*, Exiqon) y diferentes “*primers*” para cada tipo de microRNA que queramos determinar. El análisis de los datos de las curvas de fusión se realizarán de manera relativa utilizando genes de referencia internos (*control primer sets*, Exiqon).

Esta etapa del trabajo se encuentra en fase de recolección de muestras pero se espera encontrar niveles elevados de miR-1, miR-133a, miR-499 y miR-208 en suero de pacientes con IAM así como demostrar su utilidad como biomarcadores en la urgencia médica ya que permitirán realizar el diagnóstico más precozmente que la Troponina I, con niveles de sensibilidad y especificidad similares.



## **7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**



Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud muy importante en España. Las Troponinas cardíacas son el pilar diagnóstico sobre el que se apoya la clínica y la terapéutica de muchos de los Síndromes coronarios que se evalúan en los Servicios de Urgencias y además, han demostrado su utilidad para la estratificación del riesgo cardiovascular <sup>(5)</sup>. Un ligero aumento de las Troponinas se asocian a tasas mas altas de eventos cardiovasculares comparadas con niveles normales en el contexto de un SCA, pero el significado de estas Troponinas con pequeñas elevaciones en pacientes sin clínica es muy variado <sup>(16)</sup>, por lo tanto el objetivo de esta investigación ha sido comprobar la utilidad de la Troponina I con valores ligeramente elevados como biomarcador de riesgo.

Diferentes estudios demostraron que pacientes con Tn iniciales medias presentaron una elevación posterior de Tn pero concluyeron que estas no indican un SCA por sí mismas <sup>(15)</sup>. Por otra parte, un estudio demostró que los valores intermedios de Tn son un marcador pronóstico independiente de mortalidad pero sólo en pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos y sin diagnóstico inicial de SCA <sup>(16)</sup>. Hay que mencionar que en todos los estudios que evalúan la utilidad de las ligeras elevaciones de Tn no hay un consenso con respecto al rango de valores. En el presente estudio se recopilaron las determinaciones de TnI de los últimos cuatro años que se realizaron en el Hospital Clínico Universitario de Zaragoza. De acuerdo con esta investigación, aquellos pacientes con un valor de TnI ligeramente elevado presentaron mayor riesgo de tener un importante aumento de TnI en el futuro compatible con SCA. Al analizar detalladamente los diagnósticos clínicos de estos pacientes se encontró que la probabilidad de sufrir un infarto agudo

de miocardio o de fallecer es mayor si los valores iniciales de TnI presentan valores medios que si son normales. Por lo tanto, al igual que las elevaciones evidentes de este biomarcador, las TnI con valores medios también deben ser consideradas, tanto predictoras como estratificadoras de riesgo cardiovascular.

La reciente mejora en los ensayos de Troponina ha resultado en el descubrimiento de una nueva generación de ensayos con mejor sensibilidad clínica, las Troponinas de alta sensibilidad (hsTn). Esta nueva forma de determinar la troponina ha demostrado ser útil para identificar pacientes en riesgo o con probabilidades de presentar eventos adversos futuros. En los estudios clínicos con las nuevas Tn ultrasensibles el diagnóstico es más temprano y más frecuente pero los aumentos de Tn debidos a problemas cardíacos no isquémicos también son mucho más comunes. Aunque esta nueva generación de ensayos ya se utilizan en algunos centros, en nuestro medio todavía no están disponibles y la única determinación que se realiza en la Comunidad de Aragón es la de Troponina I, la que se realiza en este Hospital y la utilizada en este estudio.

Debido a las limitaciones anteriores, en cuanto a la falta de consenso sobre las pequeñas elevaciones de Tn y a los nuevos problemas que plantea la determinación de hs-Tn, encontrar nuevos biomarcadores que sean capaces de diagnosticar, así como predecir el riesgo de sufrir un evento coronario futuro, más precozmente tiene una notable importancia socio sanitaria (necesidad de utilización de recursos clínicos y terapéuticos costosos y de limitada disponibilidad) y socio económica (causa de incapacidades transitorias o permanentes, entre otras). Existen estudios que indican que el nivel de ciertos microRNAs se elevan en

pacientes con IAM de manera precoz <sup>(45)</sup>. Partiendo de esta hipótesis, se plantea desarrollar una futura investigación durante la Tesis Doctoral que intente probar que los microRNAs son de utilidad como prueba de cribado para establecer el diagnóstico de IAM, en especial cuando las cifras de Troponinas no otorguen suficiente evidencia diagnóstica y las nuevas técnicas ultra sensibles planteen un reto clínico para diferenciar las elevaciones debidas a una enfermedad isquémica o a nuevas entidades patológicas diferentes de las asociadas a los síndromes isquémicos agudos.

En este nuevo estudio se realizará una PCR a tiempo real (RT-qPCR) para la determinación de diversos microRNAs en sangre periférica. Además, a las muestras recolectadas en el Servicio de Urgencias a las que se les ha determinado el nivel de microRNAs se les medirá la concentración de TnI. Los resultados de ambas pruebas se van a comparar en términos de sensibilidad, especificidad y pronóstico. Se espera encontrar niveles elevados de miR-1, miR-133a, miR-499 y miR-208 en suero de pacientes con IAM y probar su utilidad como biomarcadores en la urgencia médica.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**

1. Castro Beiras A. Estrategia en Cardiopatía Isquémica del Sistema Nacional de Salud. Actualización aprobada por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud el 22 de octubre de 2009. Madrid: Ministerio de Sanidad, Política social e Igualdad. Secretaría General Técnica Centro de Publicaciones; 2011.
2. Defunciones segun la causa de muerte. Año 2010. Nota de prensa. Instituto Nacional de Estadística (INE), 2012.
3. Andres E, Cordero A, Magan P, Alegria E, Leon M, Luengo E, et al. Long-Term Mortality and Hospital Readmission After Acute Myocardial Infarction: an Eight-Year Follow-Up Study. *Revista Espanola De Cardiologia*. 2012 MAY 2012;65(5):414-20. PubMed PMID: WOS:000303872000004. Spanish.
4. Rozman Borstnar C, Cardellach F. Farreras-Rozman. *Medicina Interna*. 16 ed. Madrid: ELSEVIER ESPAÑA; 2009.
5. Ordóñez Llanos J, Santaló Bel M. Nuevos marcadores de necrosis miocárdica : redefinición del infarto agudo de miocardio. Barcelona: Roche Diagnostics; 2002. 63, XIII p. p.
6. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Nov;50(22):2173-95. PubMed PMID: 18036459. eng.
7. Ortega AG, Campuzano EG, Soria JLM, Bennaser AN, Soler GP, Lombardero MDR. Recomendaciones para el uso de marcadores bioquímicos de lesión miocárdica. *Química Clínica*. 2003;22(1):29-32.
8. Setiadi BM, Lei H, Chang J. Troponin not just a simple cardiac marker: prognostic significance of cardiac troponin. *Chin Med J (Engl)*. 2009 Feb;122(3):351-8. PubMed PMID: 19236818. eng.
9. Kurz K, Schild C, Isfort P, Katus HA, Giannitsis E. Serial and single time-point measurements of cardiac troponin T for prediction of clinical outcomes in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Clin Res Cardiol*. 2009 Feb;98(2):94-100. PubMed PMID: 18975024. eng.
10. Sanchis J, Bodí V, Llácer A, Facila L, Núñez J, Roselló A, et al. Predictors of short-term outcome in acute chest pain without ST-segment elevation. *Int J Cardiol*. 2003 Dec;92(2-3):193-9. PubMed PMID: 14659853. eng.
11. Villa BGdl, Diaz-Buschmann I, Jurado J, Garcia R, Parra F, Medina J, et al. Valor de la troponina I cardíaca como prueba diagnóstica en el estudio del dolor torácico. *REV ESP CARDIOL*. 1998;51:122-8.
12. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients. Fibrinolytic Therapy Trialists' (FTT) Collaborative Group. *Lancet*. 1994 Feb;343(8893):311-22. PubMed PMID: 7905143. eng.



13. Macin S, Perna E, Farias E, Canella JC, Civetta M, Garcia J, et al. Utilidad clínica de la prueba rápida y la determinación cuantitativa de la Troponina T para la estratificación del riesgo en la angina inestable. *REV ARGENT CARDIOL*. 2000;68:27-35.
14. Ross G, Bever FN, Uddin Z, Hockman EM. Troponin I sensitivity and specificity for the diagnosis of acute myocardial infarction. *J Am Osteopath Assoc*. 2000 Jan;100(1):29-32. PubMed PMID: 10693314. eng.
15. Lee HM, Kerr D, O'H Ici D, Kelly AM. Clinical significance of initial troponin I in the grey zone in emergency department chest pain patients: a retrospective pilot study. *Emerg Med J*. 2010 Apr;27(4):302-4. PubMed PMID: 20385686. eng.
16. Stein R, Gupta B, Agarwal S, Golub J, Bhutani D, Rosman A, et al. Prognostic implications of normal (<0.10 ng/ml) and borderline (0.10 to 1.49 ng/ml) troponin elevation levels in critically ill patients without acute coronary syndrome. *Am J Cardiol*. 2008 Sep;102(5):509-12. PubMed PMID: 18721503. eng.
17. Halim SA, Mulgund J, Chen AY, Roe MT, Peterson ED, Gibler WB, et al. Use of guidelines-recommended management and outcomes among women and men with low-level troponin elevation: insights from CRUSADE. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2009 May;2(3):199-206. PubMed PMID: 20031838. eng.
18. Aldous SJ, Richards M, Cullen L, Troughton R, Than M. Diagnostic and prognostic utility of early measurement with high-sensitivity troponin T assay in patients presenting with chest pain. *CMAJ*. 2012 Mar;184(5):E260-8. PubMed PMID: 22291171. Pubmed Central PMCID: PMC3307580. eng.
19. Ndrepepa G, Braun S, Schulz S, Byrne RA, Pache J, Mehilli J, et al. Comparison of prognostic value of high-sensitivity and conventional troponin T in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta*. 2011 Jul;412(15-16):1350-6. PubMed PMID: 21497154. eng.
20. Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, Naslund U, Apple FS, Galvani M, et al. It's time for a change to a troponin standard. *Circulation*. 2000 Sep;102(11):1216-20. PubMed PMID: 10982533. eng.
21. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med*. 2008 May;358(20):2148-59. PubMed PMID: 18480207. eng.
22. Margulies KB. MicroRNAs as novel myocardial biomarkers. *Clin Chem*. 2009 Nov;55(11):1897-9. PubMed PMID: 19696114. eng.
23. Wang Z. MicroRNA: A matter of life or death. *World J Biol Chem*. 2010 Apr;1(4):41-54. PubMed PMID: 21537368. Pubmed Central PMCID: PMC3083949. eng.
24. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec;75(5):843-54. PubMed PMID: 8252621. eng.



25. miRBase. Available from: <http://microrna.sanger.ac.uk>.
26. Boyd SD. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. Lab Invest (Revista de la Academia Americana y Canadiense de Patología USCAP) FI: 4,602 (2009 Journal Citation Report) Rank: 7/71 in Pathology - 16/92 in Medicine, research and experimental. 2008 Jun;88(6):569-78. PubMed PMID: 18427554. eng.
27. Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. Clin Cancer Res. 2008 May;14(9):2588-92. PubMed PMID: 18451220. eng.
28. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature. 2005 Jun;435(7043):834-8. PubMed PMID: 15944708. eng.
29. Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. BMC Res Notes. 2009;2:89. PubMed PMID: 19454029. Pubmed Central PMCID: PMC2694820. eng.
30. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. Nature. 2004 Nov;432(7014):226-30. PubMed PMID: 15538371. eng.
31. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. Cell Metab. 2006 Feb;3(2):87-98. PubMed PMID: 16459310. eng.
32. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul;105(30):10513-8. PubMed PMID: 18663219. Pubmed Central PMCID: PMC2492472. eng.
33. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engle PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, et al. Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. Clin Chem. 2009 Nov;55(11):1977-83. PubMed PMID: 19745058. eng.
34. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. PLoS One. 2008;3(11):e3694. PubMed PMID: 19002258. Pubmed Central PMCID: PMC2577891. eng.
35. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007 Jun;9(6):654-9. PubMed PMID: 17486113. eng.
36. Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. Circulation. 2010 Mar;121(8):1022-32. PubMed PMID: 20194875. Pubmed Central PMCID: PMC2847432. eng.





37. Morrissey EE. The magic and mystery of miR-21. *J Clin Invest.* 2010 Nov;120(11):3817-9. PubMed PMID: 20978356. Pubmed Central PMCID: PMC2964999. eng.
38. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, et al. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics.* 2007 Nov;31(3):367-73. PubMed PMID: 17712037. eng.
39. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science.* 2007 Apr;316(5824):575-9. PubMed PMID: 17379774. eng.
40. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2007 May;13(5):613-8. PubMed PMID: 17468766. eng.
41. Tang Y, Zheng J, Sun Y, Wu Z, Liu Z, Huang G. MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *Int Heart J.* 2009 May;50(3):377-87. PubMed PMID: 19506341. eng.
42. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med.* 2007 Apr;13(4):486-91. PubMed PMID: 17401374. eng.
43. Wu F, Yang Z, Li G. Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Sep;386(4):549-53. PubMed PMID: 19540203. Pubmed Central PMCID: PMC2821898. eng.
44. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2010 Nov;31(22):2765-73. PubMed PMID: 20534597. Pubmed Central PMCID: PMC2980809. eng.
45. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J.* 2010 Mar;31(6):659-66. PubMed PMID: 20159880. eng.
46. Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 2010 Jul;56(7):1183-5. PubMed PMID: 20395621. eng.
47. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan;391(1):73-7. PubMed PMID: 19896465. eng.
48. Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, Glavac D. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology.* 2010;115(3):163-9. PubMed PMID: 20029200. eng.





49. Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. Clin Chem. 2009 Nov;55(11):1944-9. PubMed PMID: 19696117. eng.