

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



Tesis Doctoral

**Biomarcadores génicos en infarto agudo de
miocardio**

Luis Miguel Rincón Díaz

Madrid, 2021

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE MEDICINA



Tesis Doctoral

**Biomarcadores génicos en infarto agudo de
miocardio**

Luis Miguel Rincón Díaz

Madrid, 2021

Directores

Prof. Dr. José Luis Zamorano Gómez

Dra. María Laura García Bermejo

A mi familia

Agradecimientos

Sirvan estas líneas para transmitir mi más sincero agradecimiento a todos los que han hecho posible el desarrollo de este trabajo, me han ofrecido la oportunidad de ampliar mis horizontes y me han acompañado a lo largo del viaje.

En primer lugar, deseo agradecer al Prof. José Luis Zamorano por brindarme la oportunidad de desarrollar un proyecto investigador fascinante. Su capacidad de afrontar nuevos retos, superar barreras y necesidad de renovación constante me han llevado a adoptar como propio un inconformismo militante destinado a mejorar permanentemente: “lo que no se evalúa se devalúa”. Deseo expresar mi admiración por su incontestable trayectoria investigadora y profesional. Sin su confianza y generosidad este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. María Laura García Bermejo quiero agradecerle el haberme descubierto la existencia de un mundo nuevo al abrirme las puertas de su laboratorio. Su vocación investigadora, así como su capacidad de trabajo y motivación sirven como ejemplo a los que deseamos mantener la inquietud de la investigación en nuestra actividad clínica. Por su paciencia y ánimo al dar mis primeros pasos en investigación básica rodeado de biólogas, hacer fácil lo difícil y permitir hacer realidad una investigación verdaderamente traslacional durante todos estos años. De corazón, gracias.

Agradecer a todo el personal de la Unidad Coronaria su implicación en este proyecto. De forma muy especial al Dr. Marcelo Sanmartín, por demostrarme cada día que la excelencia profesional no está reñida con la actividad investigadora. Al Dr. Manuel Jiménez Mena, cuyo liderazgo y temple ha moldeado a generaciones de cardiólogos dedicados a los cuidados cardiovasculares agudos. A la Dra. Asunción Camino, que con su inmensa dedicación a los pacientes nos sirve de recuerdo de por quiénes queremos mejorar.

Me gustaría agradecer a todo el personal del Laboratorio de Biomarcadores y Dianas Terapéuticas del IRYCIS, fuente inagotable de investigadoras donde uno siempre siente que está en su casa. De forma muy destacada agradecer a Dña. Macarena Rodríguez Serrano, por su dedicación constante y apoyo en los procedimientos experimentales. Su ayuda e implicación han sido cruciales en todo momento.

Un agradecimiento muy especial a Dña. Paz González Portilla, compañera de fatigas, por su amistad incondicional y su apoyo en tantos y tantos momentos. Mi admiración por mantenerse fiel a unos principios vitales que comparto. Su ayuda ha sido constante a lo largo de los años.

A todo el Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, mi segunda casa, donde he podido crecer como médico rodeado de grandes compañeros, adjuntos y residentes. Resulta formidable desarrollarse en un entorno como este, en el que se aúnan conocimientos y experiencia allá donde uno mire, y donde siempre contaré con grandes amigos.

Quiero también agradecer al personal investigador, de Biobanco y del Servicio de Bioquímica del IRYCIS, así como al Servicio de Cirugía Experimental del IdiPAZ, por su apoyo técnico y su ilusión constante por hacer las cosas bien.

Agradecer especialmente a nuestros pacientes su disposición a colaborar en esta investigación de forma altruista y durante momentos particularmente difíciles, cuando el único beneficio esperable es para la sociedad.

No puedo finalizar estas líneas sin reconocer y agradecer a mi familia, eje fundamental de mi vida, cuyo espíritu y valores transpiran en esta obra. A mis padres, ejemplo de constancia, sacrificio y humildad. A mi hermana María, por demostrar que con una sonrisa y tesón se llega muy lejos. A mis padrinos, M^a Cruz y Justo, por su cariño inmenso y su ejemplo vital. A Candelas y Luis, por vuestra paciencia y apoyo. A ti Luis, que nos acompañarás siempre, recordándonos cada día la alegría de vivir. A nuestros hijos Luismi, cuya viveza en la mirada veo crecer sin freno, y el pequeño Manuel, cuya cuna mezo mientras redacto estas líneas; nos empujáis cada día a ser mejores, iluminando nuestras vidas. A Candelas, por hacerme sonreír, crecer, soñar y conseguir que me sienta afortunado de pasar por esta vida juntos.

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares, encabezadas por el infarto agudo de miocardio (IAM), son la causa más frecuente de muerte e incapacidad a nivel global y en nuestro entorno. Las bases etiológicas del IAM son complejas e intervienen tanto factores ambientales como hereditarios. La constante evolución de las redes asistenciales y los nuevos tratamientos han mejorado la supervivencia inicial del IAM, pero el riesgo de recurrencias y de complicaciones a largo plazo como la insuficiencia cardiaca continúa siendo elevado.

Como determinantes genéticos de riesgo de IAM se han identificado decenas de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), cada uno de los cuales asocia un pequeño incremento del riesgo. Así, para la realización de una estimación global, se han desarrollado escalas de riesgo poligénico (GRS) integradas por múltiples SNPs. Hasta ahora, los GRS habían sido evaluados en la población general, pero su utilidad entre pacientes que ya han sufrido un IAM es en gran medida desconocida.

Como reguladores altamente específicos de la expresión génica, los microRNAs (miRNAs) están emergiendo como nuevos biomarcadores, habiendo sido identificados como actores clave en el desarrollo de enfermedades.

La presente Tesis Doctoral aborda como objetivo general caracterizar la utilidad de estas dos familias de reguladores génicos en el IAM: SNPs y miRNAs, como biomarcadores con finalidad pronóstica a largo plazo en pacientes con IAM, así como analizar la potencial implicación de los miRNAs en el daño miocárdico crónico tras IAM, y por tanto, su capacidad para constituirse como nuevas dianas terapéuticas.

En primer lugar, dado que la prevalencia de variantes genéticas de riesgo en población joven no diabética que presenta un IAM es superior a la de la población general, se planteó un estudio clínico prospectivo en una cohorte de 81 pacientes con IAM y elevada susceptibilidad hereditaria. Dicho estudio nos ha permitido documentar que el perfil genético evaluado con un GRS basado en 11 SNPs está asociado con una mayor probabilidad de eventos cardiovasculares recurrentes futuros, incrementando el rendimiento de los algoritmos de estratificación pronóstica tras IAM.

Sucesivamente, se puso en marcha un ambicioso programa de identificación y validación de miRNAs en IAM para su utilización en práctica clínica. Para ello se planteó un estudio clínico prospectivo en una cohorte general de 311 pacientes con IAM con seguimiento a largo plazo, se estableció una cohorte de control con población sana y se realizaron varios modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*.

El estudio clínico nos ha permitido identificar, de forma inédita, una combinación de miRNAs desregulados en IAM con capacidad de constituirse en biomarcadores con utilidad pronóstica. De forma destacada, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-27b-3p, miR-122-5p, miR-210-3p y miR-221-3p fueron capaces de identificar a pacientes con mayor riesgo de desarrollo de insuficiencia cardíaca y mortalidad cardiovascular a largo plazo tras IAM. La información proporcionada por estos miRNAs fue independiente y adicional a ofrecida por las variables clínicas, mejorando todas las estrategias de predicción de riesgo actuales.

Adicionalmente, los hallazgos de los modelos experimentales *in vivo* de oclusión coronaria permanente e isquemia reperusión en ratas, así como los modelos *in vitro* en cardiomiocitos H9c2, correlacionaron con los resultados obtenidos en pacientes, validando estos modelos experimentales para el estudio de las bases génicas y moleculares por las que los miRNAs ejercen el papel regulador que les dota de utilidad pronóstica. Finalmente, la modulación exógena en cardiomiocitos de dos de los miRNAs más prometedores (miR-210-3p y miR-23a-3p) indujo cambios en la expresión en varios genes fundamentales para el proceso de apoptosis y remodelado ventricular adverso tras IAM que pueden estar en relación con su capacidad pronóstica a nivel clínico.

Para concluir, el estudio de biomarcadores génicos en el IAM ha permitido constatar la utilidad pronóstica de una escala de riesgo poligénico en pacientes con IAM. De forma destacada, el estudio de identificación y valoración pronóstica de miRNAs en pacientes con IAM realizado en el presente trabajo constituye un ejemplo de investigación traslacional *bench to bedside* en el que, partiendo de unos resultados prometedores en pacientes, se han podido explorar en modelos *in vitro* e *in vivo* los mecanismos que regulan la adaptación celular tras un daño isquémico agudo, y que pueden justificar su utilidad pronóstica. Así, el resultado de este trabajo evidencia la posible utilidad de estos biomarcadores génicos en la práctica clínica y permite sentar las bases para el desarrollo de potenciales tratamientos dirigidos en un futuro.

Summary

Cardiovascular diseases, with acute myocardial infarction (MI) in the lead, remain the first cause of mortality and disability both worldwide and in our setting. Etiopathogenic mechanisms underlying MI are complex, with a sum of environmental and hereditary factors. The constant improvement in healthcare networks and therapies have improved initial survival of MI, but the long-term risk of new events and complications such as heart failure remains significant.

As genetic determinants of risk for MI, dozens of single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified, each of which is associated with a small increase in risk. Thus, to carry out a global estimate, polygenic risk scores (GRS) made up of multiple SNPs have been developed. Until now, GRS have been evaluated in the general population, but their usefulness among patients who have already suffered an MI is largely unknown.

As highly specific regulators of gene expression, microRNAs (miRNAs) are emerging as new biomarkers, having been identified as key mediators in the development of diseases.

The present Doctoral Thesis addresses the general objective of characterizing the usefulness of these two families of gene regulators in MI: SNPs and miRNAs, as biomarkers for long-term prognosis in patients with MI, as well as analyzing the potential involvement of miRNAs in chronic myocardial damage after MI, and therefore, their ability to become new therapeutic targets.

In the first place, given that the prevalence of risk genetic variants in the young non-diabetic population with MI is higher than that of the general population, a prospective clinical study was proposed in a cohort of 81 patients with MI and high susceptibility. This study has allowed us to document that the genetic profile evaluated with a GRS based on 11 SNPs is associated with a greater probability of future recurrent cardiovascular events, increasing the performance of prognostic stratification algorithms after MI.

Subsequently, an ambitious program for the identification and validation of miRNAs in MI was launched for their use in clinical practice. For this, we set up a prospective clinical

study in a general cohort of 311 patients with MI and long-term follow-up, a control cohort with healthy population and several *in vivo* and *in vitro* experimental models.

The clinical study has allowed us to identify, for the first time, a combination of miRNAs with the ability to become biomarkers with prognostic utility. Notably, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-27b-3p, miR-122-5p, miR-210-3p and miR-221-3p were able to identify patients with a higher risk of development of heart failure and long-term cardiovascular mortality after MI. The information provided by these miRNAs was independent and additional to that offered by the clinical variables, improving all current risk prediction strategies.

Additionally, the findings of the *in vivo* experimental models of permanent coronary occlusion and ischemia-reperfusion in rats, as well as the *in vitro* models in H9c2 cardiomyocytes correlated with the results obtained in patients, validating these experimental models for the study of the genetic and molecular bases by the that miRNAs exert the regulatory role that gives them prognostic utility. Finally, the exogenous modulation in cardiomyocytes of two of the most promising miRNAs (miR-210-3p and miR-23a-3p) induced changes in the expression of several target genes fundamental for apoptosis and adverse ventricular remodeling after MI that can be related to its prognostic capacity at the clinical level.

To conclude, the study of gene biomarkers in MI has made it possible to verify the prognostic usefulness of a polygenic risk score in patients with MI. Notably, the study of identification and prognostic assessment of miRNAs in patients with MI carried out in the present work constitutes an example of translational bench-to-bedside research in which, based on promising results in patients, it has been possible to explore through *in vitro* and *in vivo* models, the underlying mechanisms that regulate cell adaptation after acute ischemic damage, which gives them prognostic utility. Thus, the results of this work prove the potential usefulness of gene biomarkers in clinical practice and allows to lay the foundations for the development of potential targeted treatments in the future.

Fuentes de Financiación

La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en el marco del Programa “*Multimodality imaging techniques for valve and other structural heart diseases*” del Centro de Investigación Biomédica En Red en enfermedades Cardiovascular (CIBERCV) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (CB16/11/00250), Ministerio de Ciencia e Innovación. El trabajo se ha realizado en el contexto y con la financiación de los siguientes proyectos:

- PI12/0564: “*Estratificación del riesgo cardiovascular en arteriopatía coronaria precoz – combinación de tomografía computarizada con estudio genético*” financiado por el ISCIII cuyo investigador principal es el Prof. José L. Zamorano.
- PI15/00667: “*Identification and validation of miRNAs as novel prognostic markers for acute myocardial infarction - validation study for their use in clinical practice*” financiado por el ISCIII cuyo investigador principal es el Prof. José L. Zamorano y co-investigador principal Luis Miguel Rincón.
- SEC/2016/CC: “*microRNAs como biomarcadores pronósticos en IAM*” financiado por la Sociedad Española de Cardiología y cuyo investigador principal es Luis Miguel Rincón.
- “*Valor pronóstico y regenerador de los microRNAs tras infarto agudo de miocardio*” financiado por la Fundación Eugenio Rodríguez Pascual (2018), cuyos investigadores principales son el Prof. José L. Zamorano y Luis Miguel Rincón.

El doctorando ha sido beneficiario de los siguientes contratos de investigación en concurrencia competitiva: *Contrato de Formación en Investigación “Rio Hortega”* (2013-2014) (CM12/00122; ISCIII) y *Contrato para la intensificación de la actividad investigadora* (Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Ramón y Cajal) (2018).

Abreviaturas

| | |
|----------------------|--|
| <i>AUC</i> | <i>Area under the curve</i> - Área bajo la curva |
| <i>ARA-II</i> | Antagonista de los receptores de angiotensina II |
| <i>BNP</i> | Péptido natriurético cerebral |
| <i>BSA</i> | <i>Bovine serum albumin</i> - Albúmina de suero bovino |
| <i>cDNA</i> | DNA complementario |
| <i>C-HDL</i> | Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad |
| <i>C-LDL</i> | Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad |
| <i>cNRI</i> | <i>Continuous net reclassification improvement index</i> - Índice de reclasificación neta continua |
| <i>C_t</i> | <i>Cycle threshold</i> / Umbral de ciclo |
| <i>CV</i> | Cardiovascular |
| <i>DLCN</i> | <i>Dutch Lipid Clinic Network</i> |
| <i>DMEM</i> | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| <i>DNA</i> | Ácido desoxirribonucleico |
| <i>EAC</i> | Enfermedad arterial coronaria |
| <i>ECG</i> | Electrocardiograma |
| <i>ESC</i> | <i>European Society of Cardiology</i> - Sociedad Europea de Cardiología |

| | |
|----------------|---|
| <i>FBS</i> | <i>Fetal bovine serum</i> - Suero fetal bovino |
| <i>FEVI</i> | Fracción de eyección del ventrículo izquierdo |
| <i>FG</i> | Tasa de filtrado glomerular estimado |
| <i>GnomAD</i> | <i>Genome Aggregation Database</i> |
| <i>GO</i> | <i>Gene Ontology database</i> |
| <i>GRACE</i> | <i>Global Registry of Acute Coronary Events</i> |
| <i>GRS</i> | <i>Genetic risk score</i> / Puntuación de riesgo poligénico |
| <i>GWAS</i> | <i>Genome-wide association study</i> - Estudio de asociación global del genoma |
| <i>HIF</i> | <i>Hipoxia Inducible Factor</i> |
| <i>HF</i> | Hipercolesterolemia familiar |
| <i>HR</i> | <i>Hazard ratio</i> – Cociente de riesgo |
| <i>I/R</i> | Isquemia-reperfusión coronaria |
| <i>IAM</i> | Infarto agudo de miocardio |
| <i>IAMCEST</i> | Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST |
| <i>IAMSEST</i> | Infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST |
| <i>IC</i> | Insuficiencia cardiaca |
| <i>ICP</i> | Intervencionismo coronario percutáneo |
| <i>IC95%</i> | Intervalo de confianza al 95% |
| <i>IDI</i> | <i>Integrated discrimination improvement index</i> – índice de mejora de discriminación integrada |
| <i>IECA</i> | Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina |

| | |
|------------------|---|
| <i>i.v.</i> | intravenoso |
| <i>LNA</i> | <i>Locked nucleic acid</i> / ácido nucleico bloqueado |
| <i>lncRNA</i> | <i>Long non-coding RNA</i> - RNA no codificante de cadena larga |
| <i>MACE</i> | <i>Major adverse cardiac events</i> – Eventos cardiovasculares agudos mayores |
| <i>miR</i> | Micro RNA |
| <i>miRNA</i> | Micro RNA |
| <i>MMP</i> | Metaloproteinasas de la matriz extracelular |
| <i>mRNA</i> | RNA mensajero |
| <i>ncRNA</i> | RNA no codificante |
| <i>NT-proBNP</i> | Prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral |
| <i>Nx</i> | Normoxia |
| <i>NYHA</i> | <i>New York Heart Association</i> |
| <i>OP</i> | Oclusión coronaria permanente |
| <i>OR</i> | <i>Odds Ratio</i> – Razón de probabilidad |
| <i>PA</i> | Presión arterial |
| <i>PBS</i> | <i>Phosphate buffered saline</i> - Buffer fosfato salino |
| <i>PCR</i> | Reacción en cadena de la polimerasa |
| <i>qRT-PCR</i> | <i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> - Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real |
| <i>RNA</i> | Ácido ribonucleico |

| | |
|----------------|---|
| <i>ROC</i> | <i>Receiver operating characteristic</i> - Característica operativa del receptor |
| <i>rRNA</i> | RNA ribosómico |
| <i>RT</i> | Retrotranscripción |
| <i>s.c.</i> | subcutáneo |
| <i>SCA</i> | Síndrome coronario agudo |
| <i>SCACEST</i> | Síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST |
| <i>SCASEST</i> | Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST |
| <i>siRNA</i> | <i>Short interfering RNA</i> – RNA pequeño de interferencia o RNA de silenciamiento |
| <i>SNP</i> | <i>Single nucleotide polymorphism</i> - Polimorfismo de nucleótido único |
| <i>snRNA</i> | <i>Small nuclear RNA</i> – RNA nuclear pequeño |
| <i>snoRNA</i> | <i>Small nucleolar RNA</i> – RNA nucleolar pequeño |
| <i>TC</i> | Tomografía computarizada |
| <i>TIMI</i> | <i>Thrombolysis In Myocardial Infarction</i> |
| <i>TIMP-1</i> | Inhibidor tisular de la metaloproteasa 1 de la matriz |
| <i>TGFβ</i> | <i>Transforming growth factor-β</i> |
| <i>tRNA</i> | RNA de transferencia |
| UCI-CV | Unidad de Cuidados Intensivos Cardiovasculares |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| <i>VI</i> | Ventrículo izquierdo |
| <i>VUS</i> | Variante de significado incierto |

Índice abreviado

| | |
|---|------------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. HIPÓTESIS | 33 |
| 3. OBJETIVOS | 35 |
| 4. MÉTODOS | 37 |
| 5. RESULTADOS..... | 77 |
| 6. DISCUSIÓN | 147 |
| 7. CONCLUSIONES | 173 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 175 |
| 9. PUBLICACIONES, COMUNICACIONES A CONGRESOS Y RECONOCIMIENTOS | 195 |
| 10. ANEXO..... | 205 |

Índice general

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Infarto agudo de miocardio..... | 1 |
| 1.1.1 Definición y epidemiología | 1 |
| 1.1.2 Fisiopatología..... | 3 |
| 1.1.3 Complicaciones a largo plazo..... | 6 |
| 1.1.4 Tratamientos en prevención secundaria tras IAM | 8 |
| 1.1.5 Estratificación del riesgo de eventos tras IAM..... | 10 |
| 1.2 Riesgo genético poligénico en IAM | 13 |
| 1.2.1 Genética y riesgo cardiovascular..... | 13 |
| 1.2.2 SNPs en la estimación del riesgo de eventos | 15 |
| 1.2.3 Escalas de riesgo poligénico..... | 19 |
| 1.3 miRNAs en las enfermedades cardiovasculares | 20 |
| 1.3.1 Biogénesis y su regulación | 22 |
| 1.3.2 Función de los miRNAs | 24 |
| 1.3.3 MicroRNAs como biomarcadores..... | 25 |
| 1.3.4 MicroRNAs en IAM | 27 |
| 1.3.5 MicroRNAs: implicaciones terapéuticas | 29 |
| 2. HIPÓTESIS | 33 |
| 3. OBJETIVOS | 35 |
| 3.1 Objetivo general | 35 |
| 3.2 Objetivos específicos | 35 |
| 4. MÉTODOS | 37 |
| 4.1 Evaluación del riesgo genético poligénico como marcador pronóstico en pacientes con IAM | 39 |
| 4.1.1 Diseño del subestudio - riesgo genético y eventos recurrentes en pacientes jóvenes no diabéticos con IAM | 39 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.1.2 | Consideraciones éticas | 40 |
| 4.1.3 | Endpoints subestudio – riesgo genético y eventos recurrentes | 40 |
| 4.1.4 | Genotipado y análisis de muestras | 41 |
| 4.1.5 | Tomografía computarizada cardiaca | 42 |
| 4.1.6 | Biomarcadores de remodelado de la matriz extracelular..... | 43 |
| 4.1.7 | Análisis estadístico | 44 |
| 4.2 | Evaluación de miRNAs como biomarcadores pronósticos en pacientes con IAM | 46 |
| 4.2.1 | Diseño del subestudio – miRNAs como biomarcadores pronósticos en pacientes con IAM | 46 |
| 4.2.2 | Consideraciones éticas | 47 |
| 4.2.3 | Endpoints subestudio 2 – miRNAs como biomarcadores pronósticos | 48 |
| 4.2.4 | Extracción de microRNAs de suero y reacción de retrotranscripción | 48 |
| 4.2.5 | Elaboración de un perfil de microRNAs..... | 48 |
| 4.2.6 | Validación de los miRNAs seleccionados mediante qRT-PCR individual..... | 51 |
| 4.2.7 | Análisis bioinformático..... | 52 |
| 4.2.8 | Análisis estadístico | 52 |
| 4.3 | Modelos experimentales <i>in vivo</i> | 56 |
| 4.3.1 | Modelo in vivo de isquemia/reperfusión: IAM con reperfusión | 56 |
| 4.3.2 | Modelo in vivo de oclusión coronaria permanente | 59 |
| 4.3.3 | Consideraciones éticas | 60 |
| 4.3.4 | Posprocesado de muestras de modelos experimentales in vivo | 60 |
| | Estudios histoquímicos..... | 60 |
| | Estudios inmunohistoquímicos..... | 61 |
| | Otros biomarcadores (troponina T y NT-proBNP) | 63 |
| 4.3.5 | Extracción de RNA total en tejidos..... | 64 |
| 4.3.6 | Extracción de RNA total en sangre periférica | 65 |
| 4.3.7 | Estudio de la expresión de miRNAs mediante qRT-PCR | 66 |
| 4.3.8 | Análisis estadístico | 66 |
| 4.4 | Modelos experimentales <i>in vitro</i>..... | 67 |
| 4.4.1 | Cultivos celulares | 67 |
| 4.4.2 | Diseño del modelo in vitro..... | 67 |
| 4.4.3 | Extracción de RNA total en células..... | 70 |
| 4.4.4 | Extracción de RNA total en sobrenadantes | 71 |
| 4.4.5 | Estudio de la expresión de miRNAs y genes mediante qRT-PCR..... | 71 |
| | Estudio de la expresión de miRNAs | 71 |
| | Estudio de la expresión de genes | 71 |
| 4.4.6 | Estudio de dianas predichas y validadas de miRNAs..... | 72 |
| 4.4.7 | Análisis estadístico | 72 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.5 | Modulación de miRNAs <i>in vitro</i> | 73 |
| 4.5.1 | Inhibición <i>in vitro</i> de miR-210-3p y miR-23a-3p mediante transfección | 74 |
| 4.5.2 | Sobreexpresión <i>in vitro</i> de miR-210-3p y miR-23a-3p mediante transfección | 74 |
| 4.5.3 | Estudio de la expresión de genes..... | 75 |
| 5. | RESULTADOS | 77 |
| 5.1 | Riesgo genético poligénico en la predicción de eventos recurrentes en pacientes jóvenes con IAM | 77 |
| 5.1.1 | Características basales de la población | 77 |
| 5.1.2 | Prevalencia de SNPs, riesgo genético poligénico (GRS) y predicción de eventos recurrentes..... | 83 |
| 5.1.3 | Tomografía computarizada cardíaca y riesgo de recurrencias..... | 93 |
| 5.1.4 | Biomarcadores de remodelado de la matriz extracelular..... | 93 |
| 5.2 | miRNAs como biomarcadores pronósticos en pacientes con IAM | 99 |
| 5.2.1 | Características basales de la población | 99 |
| 5.2.2 | miRNAs séricos con expresión diferencial en pacientes con IAM | 99 |
| 5.2.3 | Valor pronóstico de los miRNAs – análisis del objetivo primario..... | 106 |
| 5.2.4 | Análisis de funcionalidad de los miRNAs | 119 |
| 5.2.5 | miRNAs como herramientas de reclasificación pronóstica..... | 122 |
| 5.3 | miRNAs en modelos experimentales | 124 |
| 5.3.1 | Expresión de miRNAs en los modelos experimentales <i>in vivo</i> | 124 |
| 5.3.2 | Expresión de miRNAs en cardiomiocitos y sobrenadantes celulares | 136 |
| 5.4 | Modulación experimental – miRNAs como mecanismos fisiopatológicos y potenciales dianas en IAM | 141 |
| 5.4.1 | Modulación de miR-210-3p | 143 |
| 5.4.2 | Modulación de miR-23a-3p | 145 |
| 6. | DISCUSIÓN | 147 |
| 6.1 | Riesgo genético poligénico y predicción de eventos tras IAM | 149 |
| 6.2 | Desregulación de miRNAs en isquemia miocárdica e implicaciones pronósticas ... | 154 |
| 6.3 | miRNAs como mediadores fisiopatológicos del IAM: estudios en modelos experimentales | 156 |
| 6.4 | Potencialidad de los miRNAs como nuevos biomarcadores en IAM: miRNAs en grandes estudios | 158 |
| 6.5 | miRNAs como mecanismos fisiopatológicos en IAM | 161 |

| | | |
|-----|--|------------|
| 6.6 | Efectos de la modulación de miRNAs: potenciales nuevas dianas terapéuticas en IAM..... | 164 |
| 6.7 | Implicaciones clínicas | 165 |
| 6.8 | Limitaciones | 170 |
| 7. | CONCLUSIONES | 173 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA | 175 |
| 9. | PUBLICACIONES, COMUNICACIONES A CONGRESOS Y RECONOCIMIENTOS | 195 |
| 9.1 | Publicaciones | 196 |
| 9.2 | Comunicaciones a congresos..... | 197 |
| 9.3 | Premios y reconocimientos | 204 |
| 10. | ANEXO | 205 |

1. INTRODUCCIÓN

“The heart deserves to be styled the starting point of life and the sun of our microcosm just as much as the sun deserves to be styled the heart of the world”.

“De Motu Cordis”. Sir William Harvey (1628).¹

1.1 Infarto agudo de miocardio

1.1.1 Definición y epidemiología

Las enfermedades cardiovasculares continúan siendo la causa más frecuente de muerte e incapacidad, tanto a nivel global como en países desarrollados.^{2,3} También son la primera fuente de discapacidad y de mayor coste económico para los sistemas sanitarios de todos los países desarrollados. El sustrato común a la mayor parte de estas enfermedades es el desarrollo de aterosclerosis. El infarto agudo de miocardio (IAM) encabeza este grupo de enfermedades por su trascendencia clínica y la predisposición del lecho vascular coronario a la formación de placas ateroscleróticas.

Se define universalmente el IAM como la presencia de un daño miocárdico agudo identificado en el contexto de isquemia miocárdica aguda.⁴ El daño miocárdico se establece mediante la identificación de valores anormalmente elevados de troponina, proteína sarcoplásmica constitutiva del miocardio, reflejo de la lisis celular de cardiomiocitos. Para que este daño sea considerado agudo los valores de troponina deben seguir una curva ascendente-descendente. La isquemia miocárdica aguda es el resultado del desequilibrio entre aportes y demanda de oxígeno por parte del tejido miocárdico, pudiéndose manifestar en forma de síntomas, cambios electrocardiográficos (ECG)

agudos típicos, desarrollo de ondas Q patológicas, pruebas de imagen indicativas de pérdida de función miocárdica o identificación angiográfica de un trombo coronario. El IAM producido por enfermedad arterial coronaria (EAC) aterotrombótica es designado como IAM tipo 1, siendo el tipo más frecuente. A lo largo de la presente Tesis Doctoral la denominación de IAM corresponde al IAM tipo 1.

El IAM producido por rotura de placa aterosclerótica forma parte del espectro del síndrome coronario agudo (SCA). Debido a la necesidad inmediata de establecer una estrategia de reperfusión concreta, se clasifica a los pacientes como síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST (SCA-CEST) o de síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCA-CEST). El SCA-CEST es el resultado de la oclusión trombótica aguda total o subtotal de una arteria coronaria epicárdica, que en caso de no ser sometida a reperfusión precoz ocasionará necrosis miocárdica transmural. El diagnóstico de SCA-CEST se realizará en presencia de síntomas o signos de isquemia miocárdica aguda, pero sin elevación del segmento ST; en caso de constatarse la existencia de daño miocárdico agudo tendrá consideración de IAM, de lo contrario se denomina angina inestable.

Tendencias temporales del IAM

A pesar de las políticas de promoción de la salud, las enfermedades cardiovasculares causan la muerte de más de 4 millones de europeos al año, todavía por delante del cáncer.⁵ La cardiopatía isquémica es el origen del 38% de las muertes en varones y del 44% en mujeres. También suponen la primera causa de pérdida de años potenciales de vida. Las series temporales indican un descenso progresivo de la mortalidad cardiovascular global y prematura en Europa a lo largo de las últimas décadas, especialmente evidente en países de mayor desarrollo económico.⁵ En contraste, España, que clásicamente ha presentado una prevalencia y mortalidad inferior a otros países europeos, ha presentado un incremento de las cifras de mortalidad cardiovascular global. Si se analiza en exclusiva la cardiopatía isquémica, la mortalidad ha descendido en Europa y en España en las últimas décadas, aunque esta tendencia descendente está decelerándose tanto en Europa como en EEUU, probablemente como consecuencia del crecimiento de factores de riesgo como la obesidad y diabetes.^{2,6}

Dentro del espectro del IAM, se están produciendo cambios en el patrón de presentación predominante. En la mayor parte de los países desarrollados se observa un

descenso sostenido en la incidencia global del IAM a expensas de un menor número de SCACEST, mientras que los SCASEST han permanecido relativamente estables hasta convertirse en la manifestación más frecuente en la actualidad.⁷ La prevalencia de la cardiopatía isquémica se incrementa con la edad, pero la importancia de los pacientes jóvenes con IAM no es residual, hasta el punto de que 75 de cada 1000 varones adultos de 45-54 años en EEUU ha sido diagnosticado de IAM.⁸ En Europa, las enfermedades cardiovasculares son la causa más frecuente de muerte prematura en varones, por delante de cualquier otra enfermedad.⁵ Entre los pacientes jóvenes, el riesgo de presentar un nuevo evento cardiovascular o fallecer por esta causa a lo largo de la vida continuará siendo muy elevado.^{9,10} A nivel económico, las enfermedades cardiovasculares son las que conllevan mayor gasto a los sistemas sanitarios, alcanzando el 19% del total en países de nuestro entorno.^{11,12}

1.1.2 Fisiopatología

La fisiopatología de la aterosclerosis es compleja, y a ella contribuyen múltiples mecanismos que actúan por vías complementarias. El inicio de la aterosclerosis se produce por la acumulación a nivel endotelial de lipoproteínas susceptibles de sufrir procesos de oxidación o glucosilación no enzimática, cuyo resultado es la formación de hidroperóxidos y productos de degradación como lipoproteínas modificadas. En este punto, se produce una liberación de citocinas (IL-1, TNF- α , etc.) como mediadores de inflamación endotelial. Esto induce la expresión de moléculas de adhesión celular para el reclutamiento de monocitos y linfocitos en la íntima arterial, iniciándose la formación de la estría grasa. Una vez en la íntima, los monocitos se transforman primero en macrófagos, y debido a la captación de lipoproteínas en el espacio extracelular, finalmente lo hacen en células espumosas con alto contenido lipídico. Los macrófagos tienen un carácter depurador por su capacidad de migrar al torrente sanguíneo una vez convertidos en células espumosas. Sin embargo, la acumulación arterial de lípidos en mayor medida que su eliminación induce la apoptosis de algunas células espumosas que forman el núcleo necrótico rico en lípidos, característico de las placas ateroscleróticas con riesgo de ruptura.

En fases más avanzadas de la aterosclerosis se ven involucrados otros mecanismos que conducen a la evolución y rotura de la placa. Así, las células del músculo liso arterial juegan un papel fundamental para la proliferación del colágeno de la matriz extracelular y

la transformación en placa fibrosa, en respuesta a la producción de citocinas y factores de crecimiento (TGF- β , PDGF) segregadas por las células endoteliales y leucocitos. Otra vía complementaria es la de la trombosis y coagulación, en la que se produce activación plaquetaria, que facilita la formación de microtrombos en la superficie endotelial, así como mayor secreción de factores promotores de respuesta fibrótica. En las placas ateroscleróticas establecidas tienden a formarse plexos microvasculares que pueden funcionar como puerta de entrada de linfocitos a las placas de ateroma, y también a la extravasación, trombosis *in situ* y hemorragia intraplaca.

La aterosclerosis tiene un carácter progresivo, y cursa de forma intermitente en el espacio y tiempo, con mayor predilección por unas regiones que otras. El desarrollo de la aterogénesis puede extenderse a lo largo de años con carácter asintomático o “preclínico”, pero puede manifestarse de forma aguda en forma de IAM o muerte súbita cardíaca. Esto ha llevado a cambiar la antigua denominación de enfermedad arterial coronaria (EAC) estable al más reciente término de síndrome coronario crónico (SCC), a fin de reconocer su naturaleza dinámica.

Un IAM se produce por la rotura e inestabilidad de una placa aterosclerótica en las arterias coronarias epicárdicas, que en su inmensa mayoría no ocasionaban una estenosis significativa de forma previa al episodio. El mecanismo más habitual es la erosión superficial del endotelio o fisura de la cubierta fibrosa de una placa, que pone en contacto proteínas procoagulantes de las células espumosas como el factor hístico con factores de coagulación vasculares, cuya consecuencia es la formación de un trombo intravascular oclusivo.

Respuesta celular a isquemia, transición epitelio-mesénquima y fibrosis miocárdica.

El oxígeno es el mediador principal en las vías del metabolismo aeróbico en organismos aeróbicos. Las células tienen desarrollados mecanismos adaptativos y de supervivencia destinados a mantener su homeostasis en situaciones de tensión de oxígeno reducida. El regulador clave de la adaptación celular a la reducción de oxígeno es el *Hypoxia Inducible Factor* (HIF), un factor de transcripción compuesto por una subunidad- α , degradada en el citoplasma en situaciones de normoxia y una subunidad- β localizada en el núcleo y no sensible al oxígeno. Dentro de la subunidad- α se distinguen tres isoformas: HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α , con funciones reguladoras complementarias.¹³

En condiciones de hipoxia, HIF- α no se degrada, se acumula y termina por trasladarse al núcleo donde forma heterodímeros α - β , que se unen a secuencias diana de DNA ubicadas en varios genes y que se conocen como *Hypoxia Response Elements* (HRE), activándolos. Hay decenas de genes diana con secuencias HRE, regulando procesos de glicolisis, captación de glucosa (GLUT1), metabolismo del lactato (LDH), vasodilatación (iNOS), angiogénesis (VEGF), producción de eritropoyetina (EPO) o eliminación de radicales libres (HO-1). Varios miRNAs también están regulados por HIF, entre ellos miR-210.^{14,15}

HIF es considerado el mediador clave para la adaptación celular a situaciones de baja tensión de oxígeno, por lo que no es de extrañar que sea un factor transcripcional esencial en la respuesta a isquemia miocárdica. En los últimos años se han publicado trabajos que sugieren que la expresión de HIF tiene un papel protector en isquemia miocárdica. HIF-1 regula la adaptación aguda a la hipoxia, mientras que la expresión de HIF-2 y HIF-3 pone en marcha mecanismos de adaptación en fase crónica. Se ha demostrado que varios miRNAs, entre los que se encuentran miR-210, -21 o -107 son importantes reguladores de HIF.¹⁶

Pasada la fase aguda del IAM, se ponen en marcha mecanismos de remodelado cardíaco donde destaca el desarrollo de fibrosis, producida por la activación excesiva de fibroblastos y una producción exagerada de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs). A nivel celular, el estrés celular producido por la hipoxia induce cambios en la función y estructura. En el corazón conviven cardiomiocitos, células endoteliales y células intersticiales como los fibroblastos. Los cardiomiocitos suponen cerca del 90% de la masa total del corazón, pero numéricamente se reduce al 30-50% de las células cardíacas.

La necrosis causada por un IAM transforma la composición tisular, donde los cardiomiocitos son reemplazados por fibroblastos. Estos fibroblastos son activados en respuesta a la producción de citocinas y factores como TGF- β 1 o NF κ B, y están destinados a la formación de una cicatriz ventricular.¹⁷ Un proceso clave complementario en la respuesta subaguda es la transición epitelio-mesénquima (TEM), por las que células epiteliales son transformadas en fibroblastos, contribuyendo en el desarrollo de una cicatriz posinfarto. TGF- β 1 es considerado el estímulo principal para el desarrollo tanto de transición epitelio-mesénquima como de fibrosis miocárdica, y regula la expresión de miRNAs a nivel transcripcional y postranscripcional. En paralelo, varios miRNAs regulan

genes involucrados en la generación de matriz extracelular como el gen de colágeno I, en la transición epitelio-mesénquima a través de la regulación de E-Cadherina, en la producción de fibronectina y laminina y en la producción de metaloproteínas como MMP-2 o MMP-9. Estas metaloproteasas se modulan por el factor de transcripción STAT3, activador de genes como Bcl-2 o ciclina D1, claves en la apoptosis y en la proliferación celular, respectivamente.¹⁸

1.1.3 Complicaciones a largo plazo

“The central problem in heart failure is not that patients are short of breath or that they retain fluid: the problem is that they die. Heart failure is a mortal illness, more serious than most malignancies”.

Arnold M. Katz, MD (1965).¹⁹

Existen diversos tipos de complicaciones a largo plazo entre los pacientes que sufren un IAM, que pueden tener naturaleza aterotrombótica (IAM recurrente, ictus, arteriopatía periférica), arrítmica (taquicardia ventricular, fibrilación auricular, etc.), relacionadas con disfunción y remodelado ventricular adverso (insuficiencia cardiaca), u otros relacionados con el tratamiento (sangrado, enfermedad renal, etc.). El riesgo de complicaciones continúa siendo muy elevado a pesar del desarrollo de las redes de reperfusión precoz y las estrategias actuales de tratamiento, rehabilitación y seguimiento a largo plazo. De acuerdo a los datos procedentes de los registros ARIC, MESA, CARDIAC, FHS, CHS y JHS del *National Heart Lung and Blood Institute* americano, entre 1995 y 2012 el porcentaje de pacientes con un primer IAM que tuvieron un ingreso posterior por insuficiencia cardiaca en los siguientes 5 años osciló entre el 25-27% entre mayores de 75 años y 16-22% en mayores de 45 años.² Al menos uno de cada cinco pacientes con IAM presentará un nuevo IAM o fallecerá por causa CV en los siguientes 5 años, lo que da una idea de la magnitud del problema.²⁰

Dentro de las complicaciones a largo plazo, destaca la insuficiencia cardiaca por su gran prevalencia, trascendencia y mortalidad.²¹ La insuficiencia cardiaca es la primera causa de hospitalización, siendo la cardiopatía isquémica el factor causal en la mayoría de los casos. A nivel intrahospitalario, la incidencia de insuficiencia cardiaca en pacientes

con IAM varía en función de la definición empleada, oscilando entre el 14 y el 36%.²² La escala más empleada para describir la insuficiencia cardiaca aguda en este contexto es la clasificación de Killip, siendo uno de los predictores más potentes para mortalidad intrahospitalaria. Tras un IAM se ponen en marcha una serie de mecanismos, principalmente relacionados con la pérdida de cardiomiocitos funcionantes y sustitución de miocardio por fibrosis. El daño miocárdico inducido por el IAM pone en marcha un conjunto de cambios morfológicos y funcionales en el VI denominado remodelado ventricular adverso (Figura 1.1). A nivel morfológico se produce una dilatación progresiva y cambio de morfología (esferificación) del VI, lo que junto con la mayor activación neurohormonal inducida por sobrecarga, incrementa el deterioro de la función miocárdica de los segmentos miocárdicos no afectados.²³ Frecuentemente existe afectación arterial multivaso adicional a la que ha ocasionado el IAM, pudiendo existir zonas en las que el miocardio sea disfuncionante por isquemia o hibernación, contribuyendo al deterioro de función del VI. Finalmente, existen mecanismos ligados a disfunción endotelial que pueden ocasionar de forma independiente un mayor deterioro.

La importancia del remodelado ventricular a largo plazo es su consideración de antesala del desarrollo clínico de insuficiencia cardiaca. Su desarrollo induce cambios en múltiples niveles: a nivel celular se produce hipertrofia de cardiomiocitos, reactivación de genes fetales, pérdida de miofibrillas y desestructuración del citoesqueleto celular y cambios en el acoplamiento excitación-contracción; en su conjunto, estos cambios inducen una menor eficiencia del acortamiento actina-miosina en la sarcómera cardiaca y retraso en la relajación.²⁴ A nivel tisular, la pérdida de cardiomiocitos tiene impacto en la progresión de la disfunción y dilatación; la activación neurohormonal y citocinas proinflamatorias liberadas en el IAM inducen activación fibroblástica, responsable de la matriz extracelular, y activación de unas enzimas colagenolíticas denominadas metaloproteinasas de la matriz (MMPs) cuyo resultado es el depósito extracelular de colágeno tipo I, III, IV, VI, vimentina, fibronectina y laminina; a nivel funcional, este proceso de cicatrización se traduce en una mayor rigidez y dilatación ventricular. Finalmente, se producen cambios en la geometría ventricular debido al aumento del volumen telediastólico de VI, mayor estrés parietal y esferificación del miocardio, que facilitan la aparición de insuficiencia mitral funcional por *tethering* de los músculos papilares e incompetencia valvular, ocasionando una reducción adicional del gasto cardiaco, clave en la progresión clínica hacia insuficiencia cardiaca.²⁵

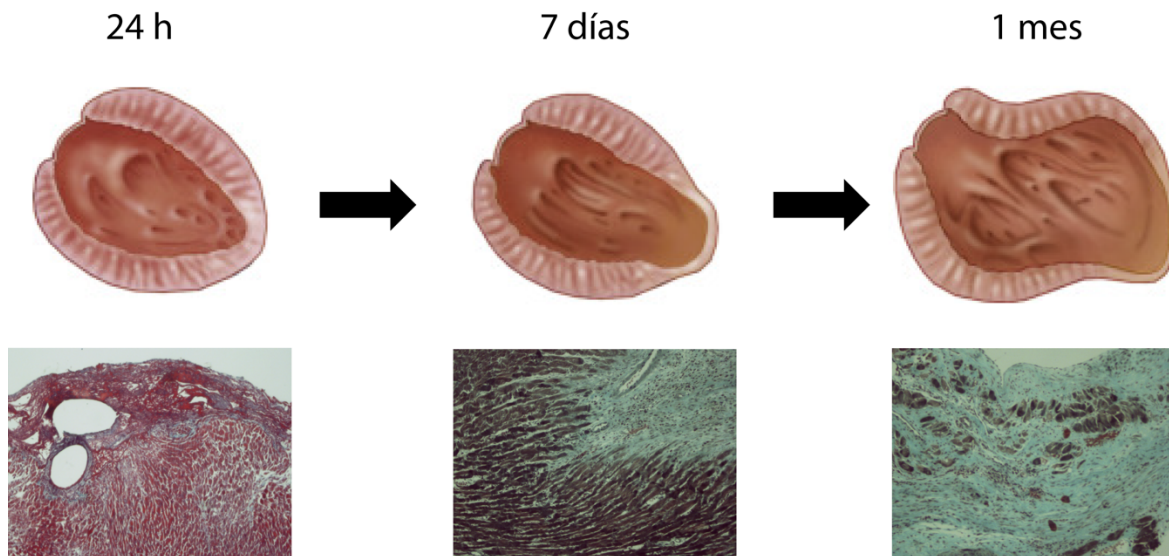


Figura 1.1 Desarrollo progresivo de remodelado ventricular adverso. Se muestran cortes histológicos de miocardio de rata a las 24 horas, 7 días y 1 mes de ser sometidas a isquemia miocárdica simulando IAM, usando tinción de Masson (10x) donde se objetiva muerte de cardiomiocitos y depósito progresivo de colágeno intercelular indicativo de fibrosis.

1.1.4 Tratamientos en prevención secundaria tras IAM

“The way to lead a long life is to get a chronic disease and take care of it”.

Sir William Osler, MD (1849–1919).

El tratamiento a largo plazo en pacientes con IAM dependerá del grado de afectación, comorbilidades y consecuencias del evento. En su conjunto está dirigido a minimizar la aparición de nuevos eventos cardiovasculares, abordando de forma global el riesgo cardiovascular, evitar el remodelado ventricular adverso o tratar la insuficiencia cardiaca, en caso de su existencia. A continuación, se resume la evidencia científica y recomendaciones vigentes:

Terapia antitrombótica: el objetivo es neutralizar el riesgo residual de origen trombotico, fundamentalmente a través de la utilización de fármacos antiagregantes y en ocasiones anticoagulantes; aquí se incluyen ácido acetyl salicílico e inhibidores del receptor P2Y12 como el prasugrel, ticagrelor o clopidogrel.²⁶

Tratamiento hipolipemiante: la importancia del control del perfil lipídico, fundamentalmente a través de una reducción de los niveles de colesterol-LDL ha sido demostrada de forma inequívoca.²⁷ Existe un gran cuerpo de evidencia centrado en el beneficio en prevención secundaria de las estatinas, aislada o en combinación con otros fármacos como ezetimibe o inhibidores de PCSK9.²⁸⁻³⁰

Control de factores de riesgo y hábitos de vida: su control tiene una importancia fundamental al ser la causa de gran parte del riesgo cardiovascular.³¹ Entre las intervenciones clave se encuentran el cese del hábito tabáquico, control de las cifras de presión arterial, control del peso, limitar el consumo de alcohol y el empleo de dieta cardiosaludable. Su implementación, así como la reanudación del ejercicio físico, suele iniciarse en unidades de rehabilitación cardíaca.

Fármacos inhibidores del remodelado ventricular adverso: existen varios grupos farmacológicos que han demostrado su capacidad para inhibir el proceso natural de remodelado ventricular que puede desarrollarse a largo plazo tras un IAM que promueve mayor disfunción ventricular.^{32,33} Se recomienda la utilización de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) o de antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA-II), así como beta-bloqueantes y antagonistas de los receptores de mineralocorticoides en pacientes que han presentado insuficiencia cardíaca aguda o presentan una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) $\leq 40\%$. También han demostrado su beneficio en términos de mortalidad cardiovascular y disminución de ingresos por insuficiencia cardíaca los inhibidores de los receptores de angiotensina y neprilisina (ARNI) así como los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (iSGLT2).³⁴

Otros tratamientos. Existen fármacos que intentan disminuir el riesgo residual, fundamentalmente interfiriendo en vías relacionadas con la inflamación arterial, aunque su uso aún no está recogido en guías clínicas. Así, canakinumab,³⁵ un anticuerpo monoclonal cuya diana es IL-1 β , o colchicina,³⁶ un antiinflamatorio utilizado en pericarditis o gota, han demostrado disminuir el riesgo de nuevos eventos cardiovasculares a largo plazo tras IAM.

1.1.5 Estratificación del riesgo de eventos tras IAM

La estratificación del riesgo es una parte fundamental de la atención en pacientes con IAM. El objetivo fundamental debe ser el identificar a aquellos que se encuentren en una situación de riesgo elevado de complicaciones, a fin de adaptar el seguimiento, tratamiento y medidas preventivas a este hecho. También es importante el informar al paciente y familia de esta situación, a fin de que puedan adoptar estrategias preventivas y tomar decisiones que modulen su riesgo individual a largo plazo. La estratificación pronóstica e identificación de pacientes en mayor riesgo de complicaciones es fundamental en planificación sanitaria, dado que la probabilidad de un evento condiciona la eficiencia de un tratamiento. La disponibilidad actual de terapias de alto impacto económico (ej. fármacos inhibidores de PCSK9 o implante de DAI) hacen precisa una selección adecuada de pacientes con riesgo absoluto elevado en los que la relación coste-efectividad sea compatible con la sostenibilidad del sistema sanitario.

El riesgo cardiovascular global es la suma de una base genética poligénica y la interacción de factores de riesgo que en gran medida están determinados por hábitos de vida y factores ambientales. Esto condiciona que todas las estrategias que persiguen realizar una valoración global del riesgo, tanto en prevención primaria como en el contexto del IAM, tengan carácter multiparamétrico, al estar basadas en la integración de diversos factores.

Dentro del campo de la cardiopatía isquémica, las escalas de predicción de riesgo más extendidas son aquellas dedicadas al ámbito de la prevención primaria, es decir, a la predicción de un primer evento cardiovascular. Entre los sistemas de predicción del riesgo cardiovascular validados para su uso en personas sin afectación clínica destaca SCORE, sistema el recomendado por las guías europeas para estimar la mortalidad cardiovascular a 10 años.^{37,38} Otros sistemas como la *Pooled Cohort Risk Equations* y el *Million Hearts Longitudinal ASCVD Risk Assessment Equation* son utilizados por las guías ACC/AHA para calcular el riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica a 10 años.³⁹⁻⁴¹ Estimadores como PROCAM, QRISK2, Framingham, ASSIGN-SCORE, Globorisk, CUORE o FINRISK han adaptado sus cálculos con el fin de mejorar su capacidad predictiva o adaptarse a determinadas poblaciones o periodos de tiempo.⁴²⁻⁴⁸ La importancia de todos estos sistemas radica en que gran parte de las intervenciones diagnósticas, recomendaciones terapéuticas y de hábitos de vida propuestos por las

diferentes guías de práctica clínica dependen de cuál sea la estimación de riesgo para ese paciente.

Podemos dividir las estrategias de prevención del riesgo en prevención secundaria tras IAM en función de su horizonte temporal (corto o largo plazo) y los parámetros analizados (ej. ECG, biomarcadores, parámetros clínicos o *scores* de riesgo multiparamétricos). Tanto los parámetros electrocardiográficos como la mayor parte de biomarcadores utilizados en diagnóstico han sido utilizados principalmente con objetivos de estratificación pronóstica intrahospitalaria en el seno del IAM. Sin embargo, también se ha evaluado la utilidad de algunos de los biomarcadores utilizados habitualmente con fines diagnósticos en el contexto del IAM a fin de ver su capacidad pronóstica a largo plazo. Así, los niveles de Troponina-T ultrasensible (cTn-T), pero no los de Troponina-I (cTn-I), se han asociado con un mayor riesgo de muerte en el seguimiento, por lo que está recomendado su uso con nivel de evidencia I-B,³² la generalización de su uso con este fin no obstante ha sido testimonial, dada la dificultad para establecer un momento óptimo para su determinación y los diferentes puntos de corte de cada fabricante.^{49,50} Otros biomarcadores habituales, como los péptidos natriuréticos BNP y N-terminal pro-BNP (NT-proBNP), han demostrado su capacidad pronóstica a largo plazo para determinar el riesgo de muerte, insuficiencia cardíaca aguda o el riesgo de fibrilación auricular; en este caso, los puntos de corte precisos con finalidad pronóstica tampoco han sido validados en el seno de un IAM.^{51,52} También se han evaluado biomarcadores emergentes, habiéndose descrito una modesta capacidad predictiva con la proteína C reactiva de alta sensibilidad, coceptina, GDF-15 o h-FABP. Sin embargo, ninguna de las guías clínicas europeas o americanas de IAM recomiendan su determinación con fines pronósticos, al aportar una mejoría marginal a la capacidad predictiva ofrecida por otros parámetros.^{32,33,53,54}

Debido a que ningún factor de riesgo o biomarcador ha demostrado ser suficiente de forma aislada, la estrategia seguida ha sido el desarrollo de escalas o algoritmos de predicción de riesgo o *scores* que integren la información procedente de variables clínicas, analíticas y electrocardiográficas. Existen varios modelos clínicos de predicción de riesgo de eventos en el SCA ya validados, pudiéndose destacar 2: el *score* GRACE (*Global Registry of Acute Coronary Events*), recomendado en las guías europeas ESC, y el *score* TIMI (*Thrombolysis In Myocardial Infarction*), incluido en las guías americanas ACCF/AHA.

Score GRACE: El *score* de riesgo GRACE fue desarrollado inicialmente entre 1999 y 2002 para estimar el riesgo de mortalidad hospitalaria a la llegada del paciente con SCA. Su desarrollo inicial se realizó a partir de una base de datos de pacientes con SCA procedentes de 94 hospitales de 14 países.⁵⁵ En los años posteriores el *score* fue adaptado y extensamente validado, tanto internamente (con 102.341 paciente de 247 hospitales y 30 países) como externamente.^{56,57} En su versión actual 2.0 (https://www.outcomes-umassmed.org/grace/acs_risk2/index.html) precisa la determinación de 8 variables en el momento de llegada al hospital: edad, frecuencia cardiaca, presión arterial sistólica, creatinina, parada cardiaca, alteraciones del segmento ST, elevación de troponina y clase Killip (Figura 1.2). Además de estimar la mortalidad hospitalaria, ha sido adecuadamente validado para estimar el riesgo de muerte a 6 meses, 1 y 3 años, o el combinado de muerte/reinfarto, obteniendo unos índices de discriminación adecuados y valores de estadístico C >0,7.^{55,56,58,59} El *score* GRACE fue capaz de ofrecer por primera vez una estimación fiable del riesgo de eventos isquémicos a largo plazo, lo que la ha llevado a las guías de práctica clínica europeas y americanas a considerar su utilización, tanto en paciente con SCACEST como con SCASEST.^{32,33,53,54}

1. Puntos por variable:

| Clase Killip | puntos | PAS, mmHg | puntos | FC, lpm | puntos | Edad, años | puntos | Creatinina, mg/dl | puntos | Otros factores | puntos |
|--------------|--------|-----------|--------|---------|--------|------------|--------|-------------------|--------|-----------------------------|--------|
| I | 0 | ≤80 | 58 | ≤50 | 0 | ≤30 | | 0 - 0.39 | 1 | PCR extrahospitalaria | 39 |
| II | 20 | 80-99 | 53 | 50-69 | 3 | 30-39 | | 0.40 - 0.79 | 4 | Alteración ST | 28 |
| III | 39 | 100-119 | 43 | 70-89 | 9 | 40-49 | | 0.80-1.19 | 7 | Ascenso enzimas miocárdicas | 14 |
| IV | 59 | 120-139 | 34 | 90-109 | 15 | 50-59 | | 1.20-1.59 | 10 | | |
| | | 140-159 | 24 | 110-149 | 24 | 60-69 | | 1.60-1.99 | 13 | | |
| | | 160-199 | 10 | 150 | 38 | 70-79 | | 2.00-3.99 | 21 | | |
| | | ≥200 | 0 | ≥200 | 46 | 80-89 | | >4.0 | 28 | | |
| | | | | | | ≥90 | | | | | |

2. Suma de puntos:

$$\text{Clase Killip} + \text{PAS} + \text{FC} + \text{Edad} + \text{Creatinina} + \text{PCR a su llegada} + \text{Alt. ST} + \text{ascenso troponina} = \text{Puntos totales}$$

3. Estimación del riesgo de eventos

| Puntos totales | ≤60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | ≥250 |
|---|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Probabilidad de muerte hospitalaria (%) | ≤0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.1 | 1.6 | 2.1 | 2.9 | 3.9 | 5.4 | 7.3 | 9.8 | 13 | 18 | 23 | 29 | 36 | 44 | ≥52 |

Figura 1.2. Nomograma para el cálculo del *score* de riesgo GRACE. PAS, presión arterial sistólica; FC, frecuencia cardiaca; PCR, parada cardiorrespiratoria.

Score TIMI: este algoritmo de estratificación del riesgo de mortalidad se elaboró con los datos de más de 15.000 pacientes procedentes del estudio TIMI (<https://www.mdcalc.com/timi-risk-score-stemi>).⁶⁰ Su objetivo fue estimar mortalidad a corto plazo a partir de 10 parámetros exclusivamente clínicos a fin de poder adoptar estrategias terapéuticas específicas. A diferencia del anterior fue diseñado específicamente en SCACEST sometido a fibrinólisis, y aunque fue posteriormente validado en población global su uso está menos extendido y alcanzó valores más modestos del estadístico C analizado en población global de SCA.⁶¹

1.2 Riesgo genético poligénico en IAM

1.2.1 *Genética y riesgo cardiovascular*

La enfermedad arterial coronaria tiene una etiología compleja, en la que intervienen factores de riesgo y ambientales sobre un sustrato personal ligado a la susceptibilidad genética (Figura 1.3). La primera descripción de que podía existir un patrón de afectación familiar que determinase la aparición de cardiopatía isquémica fue realizada en 1938.⁶² En sus fases iniciales, la Genética se focalizó en el estudio de trastornos monogénicos de muy baja prevalencia y que generaban fenotipos claramente reconocibles. Estos trastornos, cuyo paradigma es la Hipercolesterolemia Familiar, afectan a regiones codificantes generando una alteración morfológica y funcional de proteínas clave, teniendo habitualmente una elevada penetrancia. No obstante, la necesidad de partir del conocimiento de qué proteína se encontraba afectada y las técnicas de secuenciación disponibles limitaron enormemente el descubrimiento de mutaciones patogénicas en las primeras décadas.⁶³

A inicios de la década de 1990 parecía claro que las técnicas de ligamiento genético utilizadas con éxito para el estudio de enfermedades monogénicas no eran apropiadas para el estudio de enfermedades de elevada prevalencia como la cardiopatía isquémica o la mayor parte de cánceres. Los estudios epidemiológicos ya habían propuesto que la predisposición genética para enfermedades prevalentes derivaba de la combinación de múltiples variantes alélicas frecuentes, teniendo cada una de ellas un

efecto que oscilaría de mínimo a moderado.⁶⁴ Eso hizo que se diseñaran estudios de casos-controles dirigidos a evaluar la frecuencia poblacional de variantes ubicadas en genes previamente seleccionados por su función, en los que se propusieron decenas de variantes moduladoras de riesgo. Sin embargo, la nula reproducibilidad en estudios sucesivos limitó su uso posterior.^{65,66}

Los estudios epidemiológicos reflejan que entre un 40 y un 60% de la susceptibilidad global para la enfermedad arterial coronaria tiene un origen hereditario.⁶⁷ La mayor parte de pacientes que sufren un IAM a edad joven presentaban previamente un riesgo absoluto bajo de sufrir un evento cardiovascular, así como una menor prevalencia de factores de riesgo cardiovascular que otras cohortes de mayor edad. Es por este motivo que muchos de los estudios que persiguen evaluar el riesgo genético asociado a la cardiopatía isquémica se han focalizado en pacientes jóvenes, al considerarse que la importancia de los mecanismos etiopatogénicos de carácter hereditario se encuentra potenciada en este colectivo.⁶⁸

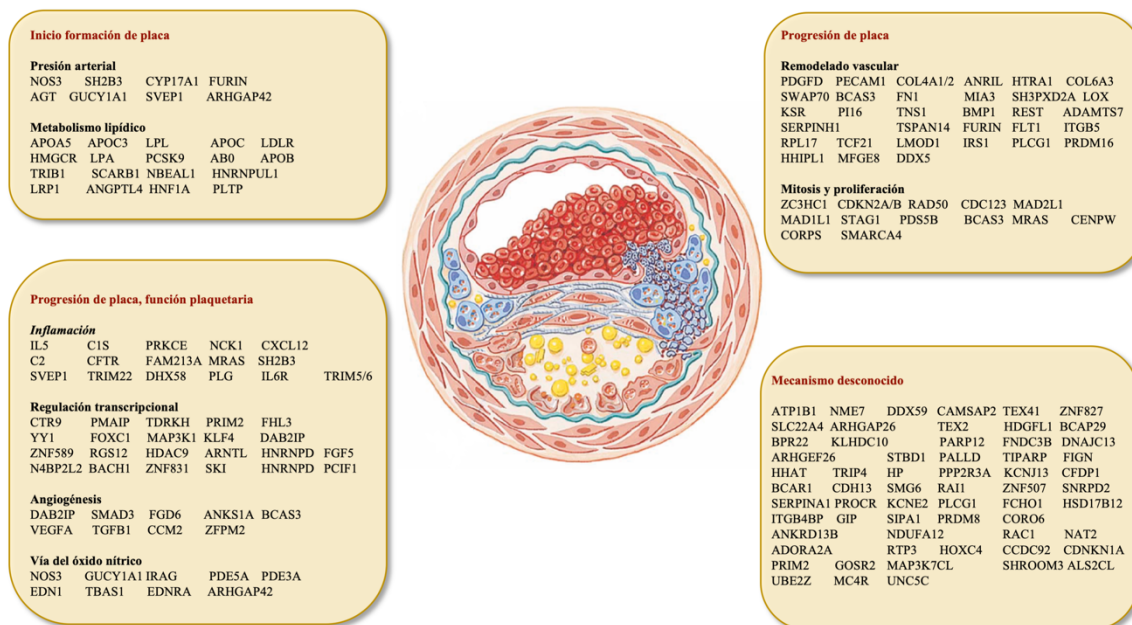


Figura 1.3. Principales genes involucrados en aterosclerosis coronaria. Se indica su fase del proceso de inicio, progresión o inestabilización de la placa aterosclerótica, así como el mecanismo de acción.

La enfermedad arterial coronaria no es infrecuente en pacientes jóvenes, representando los menores de 45 años aproximadamente el 10% de los ingresos por IAM.⁶⁹ La mayoría de los pacientes jóvenes que sufren un IAM tienen algún FRCV clásico, pero su estimación previa del riesgo cardiovascular es invariablemente baja hasta el mismo momento de aparición del evento.⁷⁰ Otro aspecto relevante es su elevado riesgo residual posterior, con una alta probabilidad de recurrencias futuras a lo largo de la vida a pesar de tratamiento en prevención secundaria.^{68,71} A pesar de esto, ninguno de las herramientas utilizadas para la estratificación del riesgo tras un IAM toma en consideración el riesgo genético residual.⁵⁶ Este mal funcionamiento de los estimadores de riesgo en pacientes jóvenes ha focalizado el interés en el estudio de factores de riesgo no clásicos en esta población, y en integrar el riesgo derivado de mecanismos genéticos, que se encuentran con mayor prevalencia en este grupo.^{68,72} No obstante, en el momento actual las guías de práctica clínica no recomiendan la realización de estudios genéticos para cuantificar el riesgo cardiovascular ni en prevención primaria ni secundaria.^{32,33,38}

1.2.2 SNPs en la estimación del riesgo de eventos

Se estima que las secuencias de genoma humano son idénticas en un 99,5%, habiéndose calculado que cada persona sea portadora de aproximadamente 3 millones de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), distribuidos de forma uniforme a lo largo del genoma y que son en gran medida responsables de las diferencias interindividuales, así como su predisposición a determinadas enfermedades.⁷³

Los SNPs son variantes en la secuencia de DNA que afectan a una única base de DNA, aunque también abarcan cambios de un pequeño número de nucleótidos. Para la denominación de SNP se debe cumplir la existencia de una frecuencia poblacional de al menos el 1%, mientras que si la prevalencia es inferior hablaremos de variantes o mutaciones puntuales. Pueden localizarse tanto dentro de secuencias codificantes de proteínas como en regiones no codificantes. En el caso de aparecer en secuencias codificantes, pueden inducir cambios en la secuencia de la proteína (SNPs no sinónimos) o no modificar la estructura de aminoácidos (SNPs sinónimos). Los SNPs localizados en regiones intrónicas o intergénicas (no codificantes) también pueden modificar la expresión de genes y ejercer su efecto en el proceso de traducción y *splicing* o unión de factores de transcripción. En ocasiones, los SNPs se agrupan en haplotipos, definidos

como un conjunto de SNPs ubicados en un mismo locus o loci cercanos y que se encuentran estadísticamente asociados, por lo que su hereditabilidad es común a nivel poblacional.

El inicio de los GWAS – estudios de asociación global del genoma- a partir de 2005, en paralelo al desarrollo de *microarrays* con capacidad de análisis de hasta 1 millón de variantes de DNA, revolucionaron el estudio de las enfermedades poligénicas.⁷⁴⁻⁷⁶ La principal característica de los GWAS es que permiten el estudio simultáneo de miles de SNPs y asociarlos con determinadas características clínicas o fenotipos sin necesidad de partir de hipótesis o conocimientos preexistentes, por lo que han demostrado una gran capacidad para identificar nuevos mecanismos moleculares y dianas terapéuticas. Un aspecto importante en el que hay que incidir en los GWAS es que a fin de acotar errores tipo I se aplican técnicas de corrección por comparaciones múltiples, con lo que en un análisis de 1 millón de SNPs se requiere un P valor de 5×10^{-8} para alcanzar la significación estadística, lo que llevó a que estos proyectos partieran de grandes bases poblacionales de decenas de miles de personas.

Los primeros SNPs asociados con cardiopatía isquémica, procedentes de GWAS fueron publicados en 2007.⁷⁶⁻⁷⁸ El principal hallazgo fue un locus en el cromosoma 9p21, hasta entonces desconocido, y que ha se confirmado como uno de los marcadores más consistentes de eventos cardiovasculares.^{77,78} El éxito de los GWAS en los años sucesivos multiplicó el interés y número de estudios dirigidos a desvelar el origen del riesgo genético en una patología tan prevalente como la cardiopatía isquémica.⁶⁷ Un GWAS de gran tamaño con >60.000 pacientes con enfermedad coronaria y 123.000 controles fue capaz de identificar 2213 variantes genéticas de riesgo distribuidas en 44 loci a lo largo del genoma.⁷⁹ En estudios sucesivos se identificaron loci independientes adicionales, hasta los más de 100 actualmente asociados a un mayor riesgo de cardiopatía isquémica que implican vías relacionadas con morfogénesis vascular, metabolismo lipídico, inflamación o vía de señalización del óxido nítrico entre otras (Tabla 1.1).⁸⁰

Tabla 1.1. Variantes genéticas y loci asociados con enfermedad arterial coronaria e infarto agudo de miocardio procedentes de GWAS*

| Localización cromosómica | SNP | Gen próximo | Frecuencia del alelo de riesgo | Odds Ratio |
|--|------------|------------------------|--------------------------------|------------|
| <i>Variantes de riesgo asociadas con hipertensión</i> | | | | |
| 4q31.1 | rs7692387 | GUCYA3 | 0.81 (G) | 1.13 |
| 10q24.32 | rs12413409 | CYP17A1, CNNM2, NT5C2 | 0.89 (G) | 1.12 |
| 12q24.12 | rs3184504 | SH2B3 | 0.44 (T) | 1.13 |
| 15q26.1 | rs17514846 | FURIN-FES | 0.44 (A) | 1.04 |
| <i>Variantes de riesgo asociadas con colesterol LDL</i> | | | | |
| 1p13.3 | rs599839 | SORT1 | 0.78 (A) | 1,29 |
| 1p32.3 | rs11206510 | PCSK9 | 0.82 (T) | 1,15 |
| 2p21 | rs6544713 | ABCG5-ABCG8 | 0.29 (G) | 1,07 |
| 2p24.1 | rs515135 | APOB | 0.83 (G) | 1,03 |
| 6q25.3 | rs3798220 | LPA | 0.02 (C) | 1,92 |
| 19p13.2 | rs1122608 | LDLR | 0.77 (G) | 1,14 |
| 19q13.32 | rs2075650 | APOE | 0.14 (G) | 1,14 |
| <i>Variantes de riesgo asociadas con colesterol HDL</i> | | | | |
| 6p21.31 | rs12205331 | ANKS1A | 0,81 (C) | 1,04 |
| <i>Variantes de riesgo asociadas con triglicéridos</i> | | | | |
| 8q24.13 | rs10808546 | TRIB1 | 0.65 (A) | 1,08 |
| 11q23.3 | rs964184 | ZNF259, APOA5-A4-C3-A1 | 0.13 (G) | 1,13 |
| <i>Variantes de riesgo no asociadas con factores de riesgo</i> | | | | |
| 1p32.2 | rs17114036 | PPAP2B | 0.91 (A) | 1,17 |
| 1q21 | rs4845625 | IL6R | 0.47 (T) | 1,09 |
| 1q41 | rs17465637 | MIA3 | 0.74 (C) | 1,20 |
| 2p11.2 | rs1561198 | VAMP5-VAMP8 | 0.45 (A) | 1,07 |
| 2q33.1 | rs6725887 | WDR12 | 0.15 (C) | 1,16 |
| 3q22.3 | rs2306374 | MRAS | 0.18 (C) | 1,15 |
| 5p13.3 | rs11748327 | IRX1, ADAMTS16 | 0.76 (C) | 1,25 |
| 5q31.1 | rs2706399 | IL5 | 0.48 (A) | 1,02 |
| 6p21 | rs10947789 | KCNK5 | 0.76 (T) | 1,01 |
| 6p21.3 | rs3869109 | HCG27 Y HLA-C | 0.60 (C) | 1,15 |
| 6p22.1 | rs6929846 | BTN2A1 | 0.06 (T) | 1,51 |
| 6p24.1 | rs6903956 | C6orf105 | 0.07 (A) | 1,65 |
| 6p24.1 | rs12526453 | PHACTR1 | 0.67 (C) | 1,13 |
| 6q23.2 | rs12190287 | TCF21 | 0.62 (C) | 1,08 |
| 6q26 | rs4252120 | PLG | 0.73 (T) | 1,07 |
| 7p21.1 | rs2023938 | HDAC9 | 0.10 (G) | 1,13 |

| Localización cromosómica | SNP | Gen próximo | Frecuencia del alelo de riesgo | Odds Ratio |
|--------------------------|------------|---------------------|--------------------------------|------------|
| 7q22.3 | rs10953541 | BCAP29 | 0.75 (C) | 1,08 |
| 7q32.2 | rs11556924 | ZC3HC1 | 0.62 (C) | 1,09 |
| 8p22 | rs264 | LPL | 0.86 (G) | 1,06 |
| 9p21.3 | rs4977574 | CDKN2A, CDKN2B | 0.46 (G) | 1,25-1,37 |
| 9q34.3 | rs579459 | ABO | 0.21 (C) | 1,10 |
| 10p11.23 | rs2505083 | KIAA1462 | 0.42 (C) | 1,07 |
| 10q11.21 | rs1746048 | CXCL12 | 0.87 (C) | 1,33 |
| 10q23.31 | rs1412444 | LIPA | 0.34 (T) | 1,09 |
| 11q22.3 | rs974819 | PDGF | 0.29 (T) | 1,07 |
| 13q12 | rs9319428 | FLT1 | 0.32 (A) | 1,1 |
| 13q34 | rs4773144 | COL4A1, COL4A2 | 0.44 (G) | 1,07 |
| 14q32.2 | rs2895811 | HHLPL1 | 0.43 (C) | 1,07 |
| 15q25.1 | rs3825807 | ADAMTS7 | 0.57 (A) | 1,08 |
| 17p13.3 | rs216172 | SMG6, SRR | 0.37 (C) | 1,07 |
| 17p11.2 | rs12936587 | RASD1, SMCR3, PEMT | 0.56 (G) | 1,07 |
| 17q21.32 | rs46522 | UBE2Z, GIP, ATP5G1, | 0.53 (T) | 1,06 |
| Chr 2 | rs2252641 | ZEB2-AC074093.1 | 0.45 (A) | 1 |
| Chr 4 | rs1878406 | EDNRA | 0.15 (T) | 1,09 |
| Chr 5 | rs273909 | SLC22A4-SLC22A5 | 0.14 (C) | 1,11 |

* Todas las variantes recogidas han alcanzado en GWAS valores de $P < 5 * 10^{-8}$. A, adenosina; C, citosina; G, guanina; T, tiamina; SNP, polimorfismo de un solo nucleótido.

Una de las primeras dificultades surgidas con el desarrollo de los GWAS fue el identificar cuáles son los mecanismos que unen genotipo y fenotipo. Inicialmente, se utilizó la estrategia del “gen más cercano”, por la que se consideraban genes candidatos a aquellos que se encontraban más cercanos a la variante identificada, complementando su estudio con análisis bioinformáticos o incluso estudios funcionales, ya que es frecuente que un SNP se asocie con cambios en la expresión de genes de localización más alejada.⁸¹

Los contribuyentes genéticos al desarrollo de la cardiopatía isquémica ya han sido en gran medida identificados. La dificultad actual estriba realizar una valoración conjunta del riesgo genético, teniendo en cuenta los miles de variantes documentadas y decenas de loci de riesgo, el valor de asociación modesto de cada variante por separado y las vías de acción común de muchas de ellas.

1.2.3 Escalas de riesgo poligénico

Las escalas o *scores* de riesgo poligénico han surgido como necesidad de integrar en cada individuo el mayor grado de información posible de las diferentes variantes genéticas que porta cada individuo. Existen varias posibilidades metodológicas y estadísticas para su construcción. Generalmente, su cálculo se realiza como la suma del número de variantes ponderadas por su estimación de efecto según se haya documentado en los GWAS o estudios de procedencia.⁸² El uso en Cardiología de los GRS está habitualmente circunscrito al ámbito de la investigación, utilizándose con los siguientes objetivos: 1) predecir el riesgo de eventos cardiovasculares; 2) seleccionar poblaciones o grupos de pacientes que puedan obtener un mayor beneficio de una terapia determinada.

El tratamiento instaurado en prevención secundaria tras un IAM tiene como objetivo minimizar el riesgo cardiovascular residual, abordando vías que en gran medida son las de los propios factores de riesgo cardiovascular clásicos. El hecho de que los *scores* de predicción de eventos cardiovasculares también estén basados en estos mismos parámetros clínicos puede limitar su capacidad predictiva, al no incorporar el componente hereditario del riesgo residual.⁵⁶

La asociación entre *scores* de riesgo genético con la aparición de un primer evento cardiovascular ya ha sido evaluada prospectivamente en estudios poblacionales, con resultados positivos con carácter general.^{83,84} La disminución progresiva del coste de los estudios genéticos ha hecho que cálculo del riesgo genético poligénico sea ya hoy en día asequible, aunque las dudas que persisten sobre su coste-efectividad y la ausencia de reembolso en los sistemas sanitarios continúan limitado la generalización de su uso.^{85,86}

Dentro de la prevención secundaria, la capacidad de los *scores* de riesgo poligénico para estimar la probabilidad de eventos cardiovasculares entre pacientes que ya han presentado un primer episodio permanece en gran medida sin evaluar. Existe una necesidad no atendida de identificar a aquellos pacientes con enfermedad cardiovascular que se encuentran en situación de mayor riesgo de presentar nuevos eventos en el seguimiento, y que pudieran beneficiarse de estrategias de prevención secundaria más agresivas. Los pacientes jóvenes con cardiopatía isquémica surgen como uno de los principales focos de interés, dado que parten de un sustrato genético *a priori* poco favorable y tienen un pronóstico con una elevada probabilidad de recurrencias sucesivas.⁸⁷ En este contexto, el poder incorporar una herramienta que analiza el riesgo

genético residual a las escalas actuales puede ser clínicamente útil para hacer una evaluación global del riesgo, así como un gran paso hacia una medicina personalizada.

En esta Tesis hemos buscado determinar si un *score* GRS basado en SNPs puede predecir la aparición de eventos cardiovasculares recurrentes en el seguimiento a largo plazo en una cohorte de pacientes jóvenes no diabéticos con IAM, estudiando en esta población con alta probabilidad de presentar susceptibilidad genética si estas herramientas pueden mejorar las estrategias actuales de estratificación de riesgo.⁸⁸ También hemos analizado si un riesgo genético desfavorable se asocia a una enfermedad coronaria más agresiva, estudiando de forma invasiva y no invasiva las características y presencia de calcio en las placas ateroscleróticas (mediante tomografía computarizada), así como otros biomarcadores emergentes ligados al riesgo cardiovascular como son las metaloproteinasas de la matriz extracelular.

1.3 miRNAs en las enfermedades cardiovasculares

Durante décadas, la investigación en el genoma humano ha estado centrada en el DNA de las regiones codificantes de proteínas o exones, a pesar de que solo supone el 1,5% del total. A partir de los años 60, se popularizó la denominación de DNA “basura” para referirse al 98% restante. Este término se prolongó en el tiempo debido a su aparente falta de función y al hecho de que, dentro del mismo, un 59% de las secuencias forman secuencias repetidas. Análisis más recientes sugieren que un 80% del genoma, aunque no codifique proteínas, sí produce transcripciones de RNA que participan en procesos biológicos esenciales mediante la regulación de genes. Esta participación en procesos básicos celulares puede ser la causa de estas secuencias se encuentren altamente conservadas entre especies.⁸⁹

Estas transcripciones de RNA reciben la denominación de RNA no codificante (ncRNA). Los ncRNAs se dividen en función de su longitud en RNA no codificante de cadena larga (lncRNA), si su secuencia es mayor a 200 nucleótidos, o en ncRNA de cadena corta, que a su vez se subdividen en ncRNAs funcionales o regulatorios. Los ncRNAs funcionales están involucrados directamente en procesos de traducción, por lo que son consideradas moléculas constitutivas o *housekeeping*, que se expresan de forma abundante y ubicua en todo tipo de células de los organismos.⁸⁹ Dentro de los ncRNAs

funcionales, los más conocidos son las moléculas de RNA ribosómico (rRNA) y de RNA de transferencia (tRNA), ambas imprescindibles para la síntesis de proteínas; también nos encontramos el RNA nuclear pequeño (snRNA) y el RNA nucleolar pequeño (snoRNA), involucrado en procesos de empalme génico y modificación de otras secuencias de RNA de pequeño tamaño.^{90,91} El segundo grupo de ncRNAs está constituido por los ncRNAs regulatorios, que han sido descubiertos más recientemente en mamíferos, y han centrado gran parte del estudio en los últimos años al detectarse su papel clave en la regulación de la expresión génica de múltiples vías celulares;⁹⁰ los ncRNAs regulatorios más relevantes son los RNAs asociados a PIWI (piRNAs), los RNAs pequeños de interferencia o de silenciamiento (siRNA) y los microRNAs (miRNAs).⁸⁹

Se definen los microRNAs (miRNAs) como pequeños fragmentos no codificantes de cadena simple de RNA de ~22 nucleótidos, que interaccionan con sus secuencias complementarias en la región 3' no traducida (3'UTR) de RNA mensajero (mRNA) codificante de proteína, con el resultado de que se inhibe la traducción proteica o la degradación del RNA.⁹² A lo largo de este trabajo, nos hemos focalizado en el estudio de los miRNAs, debido a que regulan más de dos tercios de las secuencias de RNA humano y están implicados en diferenciación celular, desarrollo y homeostasis celular, y por haberse asociado fehacientemente su desregulación en distintos contextos patológicos.^{93,94} Al igual que otros muchos descubrimientos fundamentales en fisiología, el primer miRNA no fue descrito en mamíferos; el estudio de los genes *lin-4* y *let-7*, de gran importancia para el desarrollo de *Caenorhabditis elegans*, un invertebrado del grupo de los nematodos, resultó en el hallazgo de que en vez de producir mRNA, estos genes producían un RNA no codificante de pequeño tamaño, con capacidad de inhibir la traducción a través de interacciones *antisense*.^{95,96} Poco después *let-7* fue identificado también en humanos y otros mamíferos descubriéndose que cubría funciones similares, con lo que esto dejó de ser una curiosidad detectada en gusanos para constituirse la idea de que podían existir pequeños miRNAs con capacidad de regular el desarrollo celular.⁹⁷ Desde entonces, el número de miRNAs descubiertos en diferentes especies se ha incrementado exponencialmente gracias también al desarrollo de las técnicas de secuenciación y métodos bioinformáticos de predicción de dianas y posibles funciones.⁹⁸ En la actualidad han sido identificadas 2.581 secuencias de miRNAs en humanos (<https://www.mirbase.org>), y la mayor parte de ellos se encuentran altamente conservados entre especies.

1.3.1 Biogénesis y su regulación

Los miRNAs son moléculas endógenas de RNA no codificante de unos 18-25 nucleótidos con capacidad de inhibir la expresión de genes a nivel postranscripcional al tener como objetivo secuencias específicas de RNA mensajero para las que reprimen la traducción o inducen su degradación.⁹⁹

La síntesis de los miRNAs (Figura 1.4) sigue una serie de etapas que se inician con la transcripción de los genes donde se encuentran integrados los miRNAs en el genoma, por parte de la enzima RNA polimerasa II (Pol II), que produce el RNA primario (pri-miRNA), un transcrito de varias kilobases de longitud y estructura en horquilla, tallo-lazo o *stem loop*. Dentro del genoma, la mayor parte de los miRNAs se ubican en regiones intergénicas (miRNAs intergénicos), pero también existen miRNAs intrónicos, regiones que agrupan varios miRNAs (miRNAs policistrónicos) o transcritos desde su propio promotor (miRNAs monocistrónicos o mirtron), que requieren la intervención del espliceosoma o complejo de corte y empalme para generar el transcrito primario. Los miRNAs policistrónicos son transcritos como un único pri-miRNA de mayor tamaño con capacidad de segmentarse en varios miRNAs a partir de un procesamiento posterior.^{100,101} Posteriormente se produce el complejo microprocesador a nivel del núcleo celular gracias a Drosha, una enzima RNasa III de clase 2 que requiere la región crítica del gen 8 del síndrome de DiGeorge (DGCR8), para separar el tallo de la estructura circular del miRNA transcrito por Pol II, y liberar una estructura de ~70 nucleótidos con forma de horquilla denominada miRNA precursor (pre-miRNA). El pre-miRNA será transportado al citoplasma a través de RAN-GTP y exportina-5 (EXP5). Una vez que el pre-miRNA se ubica en el citoplasma es procesado por la proteína Dicer, una enzima endonucleasa RNasa III citoplásmica que lo convierte en un dúplex miRNA maduro de unos 22 nucleótidos. En humanos, Dicer se encuentra asistida en este proceso por otras 2 proteínas, TRBP y PKKRA (también denominada PACT), que contribuyen a la formación del efector *miRNA-induced silencing complex* (miRISC). Una vez generada la estructura madura de doble cadena y 22 nucleótidos del miRNA, se acopla en un complejo proteico de la familia Argonauta (Ago) para producir el precursor (preRISC). El resultado será la degradación de una de las hebras del miRNA (*passenger strand*) quedando la otra (*guide strand*) unida a Ago, siendo la que constituya el miRNA maduro final. El último paso se producirá al guiar el miRNA maduro a RISC hacia sus dianas en

la región 3' no traducida (UTR) del mRNA que será silenciada por degradación o represión de su traducción, dependiendo de los requerimientos celulares.^{93,98}

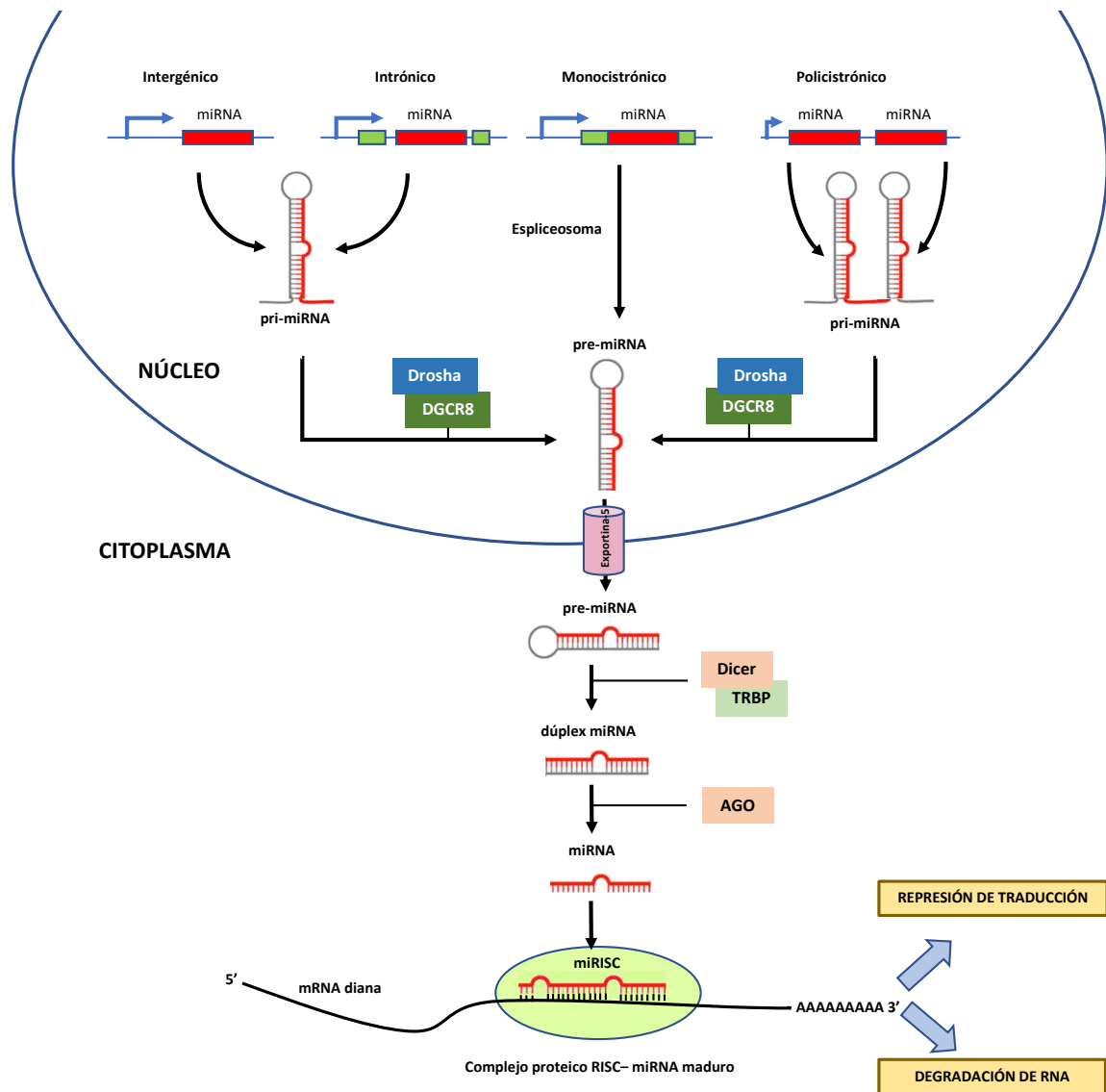


Figura 1.4 Biogénesis de los miRNAs. Los miRNAs son transcritos mediante la RNA polimerasa II (Pol II) desde regiones intergénicas, intrónicas o policistrónicas del genoma, o mediante espliceosoma en miRNAs monocistrónicos, para generar estructuras stem-loop denominadas pri-miRNAs, que serán procesadas por el complejo Drosha-DGCR8 para producir pre-miRNAs. Posteriormente, estas estructuras con forma de horquilla son transportadas al citoplasma por EXP-5, donde son procesadas por Dicer-TRBP para producir un dúplex miRNA/miRNA* eliminando la estructura circular final. El dúplex miRNA/miRNA* es procesado por la familia de proteínas AGO para eliminar una de las hebras, manteniendo la más estable. Finalmente, el miRNA maduro de cadena única y Ago constituyen el complejo miRISC-Ago en el que el miRNA guía el reconocimiento del mRNA diana y se inhibe la expresión génica mediante degradación o represión de traducción del mRNA. Adaptado de Rivera-Barahona A, et al.¹⁰¹

Existen varios mecanismos que regulan la biogénesis de los miRNA. El primer control se produce a nivel de transcripción de los pri-miRNAs: la expresión de miRNAs intrónicos está habitualmente regulada por el promotor del gen hospedador, aunque pueden existir promotores adicionales sujetos a regulación específica. Los miRNAs intergénicos suelen tener sus propios promotores, de características similares a la transcripción de la RNA polimerasa II. Los miRNAs cistrónicos suelen compartir un único promotor y son transcritos como un único pri-miRNA de cadena larga.¹⁰² El procesado de los pri-miRNAs está sujeto a controles adicionales a nivel de la RNasa III. El procesado de Drosha también está regulado por factores de crecimiento como *Bone Morphogenic Protein* (BMP) o *Tumor Growth Factor-β* (TGF-β), que pueden estimular el procesado de determinados miRNAs.¹⁰³ Otras proteínas de unión de RNA, como las encargadas del corte y empalme de mRNA también pueden regular esta etapa.¹⁰⁴ El procesado de Dicer está regulado por Lin-28 en células embrionarias pluripotenciales, uniéndose al lazo terminal de la familia de pre-miRNAs let-7 y reprimiendo su procesado.¹⁰⁵

1.3.2 Función de los miRNAs

La función de los miRNAs es regular a nivel postranscripcional la expresión de genes, mediante el silenciamiento de sus RNA mensajeros diana. Una vez incorporado en el complejo RISC, el miRNA actúa como guía, reconociendo al mRNA diana por complementariedad de sus pares de base. A partir de ahí, las proteínas efectoras AGO se encargan de reclutar cofactores y llevar a cabo de forma efectiva la represión de la traducción.

La unión de los miRNAs a sus dianas suele realizarse en la región 3'UTR del mRNA, siendo fundamental para que pueda reconocerla la secuencia de nucleótidos 2 al 7 (*seed sequence*) del dominio terminal 5' del miRNA.¹⁰⁶ La mayoría de los genes que codifican proteínas en humanos tienen al menos una secuencia de unión a miRNAs con elevado grado de conservación, por lo que son potencialmente regulables por miRNAs.⁹⁸ Cada miRNA puede ser capaz de reconocer múltiples sitios como diana a lo largo del transcriptoma en función de su secuencia, por lo que no siempre existe una única interacción miRNA-mRNA. A pesar de poder actuar a varios niveles, la mayor parte de los miRNAs presentan especificidad celular y tisular.⁹³ Se les agrupa en familias o *clusters* en función de la similitud de su *seed sequence*, dando lugar a redes de interacción

complejas por las que un mRNA también puede ser regulado por varios miRNAs que den respuesta a funciones biológicas relacionadas con el desarrollo, diferenciación celular, organogénesis, metabolismo y apoptosis celular.¹⁰⁷ Es por este motivo que su desregulación o expresión anormal han sido relacionadas con varias enfermedades y pueden ser consideradas como potenciales marcadores de las mismas.

1.3.3 *MicroRNAs como biomarcadores*

Inicialmente se consideró que los miRNAs únicamente se encontraban presentes en el interior de las células. Sin embargo, posteriormente se demostró que éstos también son segregados al espacio extracelular, con capacidad de actuar como reguladores de actividades celulares y mediar en la comunicación intercelular. Esta capacidad de ser segregados conduce a que se encuentren en fluidos corporales acelulares, como orina, suero o líquido cefalorraquídeo, y permiten el ser detectados.¹⁰⁷

La secreción de miRNAs es un proceso altamente regulado, con lo que sus niveles extracelulares responden a la puesta en marcha de procesos intracelulares (Figura 1.5). Los miRNAs son muy estables frente a la degradación, a diferencia de otras especies de RNA, pudiendo resistir a temperaturas extremas, congelación o variaciones marcadas en el pH, lo que facilita su utilización como biomarcadores.¹⁰⁸ También son muy resistentes a la elevada actividad RNasa endógena en sangre, lo que sugiere que los miRNAs disponen de algún tipo de protección para sortear estas condiciones adversas, aunque el mecanismo que justifica su alta estabilidad aún no está del todo aclarado.¹⁰⁹ La explicación más aceptada es que la mayor parte de los miRNAs circulantes en sangre encontrados hasta la fecha se encuentran asociados con la proteína Argonauta 2 (Ago2), y que sea esto lo que dote de estabilidad al complejo que forma con los miRNAs. Se ha especulado que la mayoría de los miRNAs detectados en sangre puedan ser productos segregados por células muertas que permanecen en el espacio extracelular.¹¹⁰ También pueden ser hallados asociados a otras proteínas como lipoproteína de alta densidad (HDL) o nucleofosmina 1 (NPM1), o en vesículas como exosomas, microvesículas o cuerpos multivesiculares, lo que les protege de la degradación.^{94,107} Otra de las ventajas de los miRNAs como biomarcadores, frente a biomarcadores proteicos, es la posibilidad de ser detectados con elevada sensibilidad y especificidad utilizando *microarrays* y mediante qRT-PCR, pudiendo cuantificar varios biomarcadores de interés de forma simultánea, utilizando un único proceso de determinación.

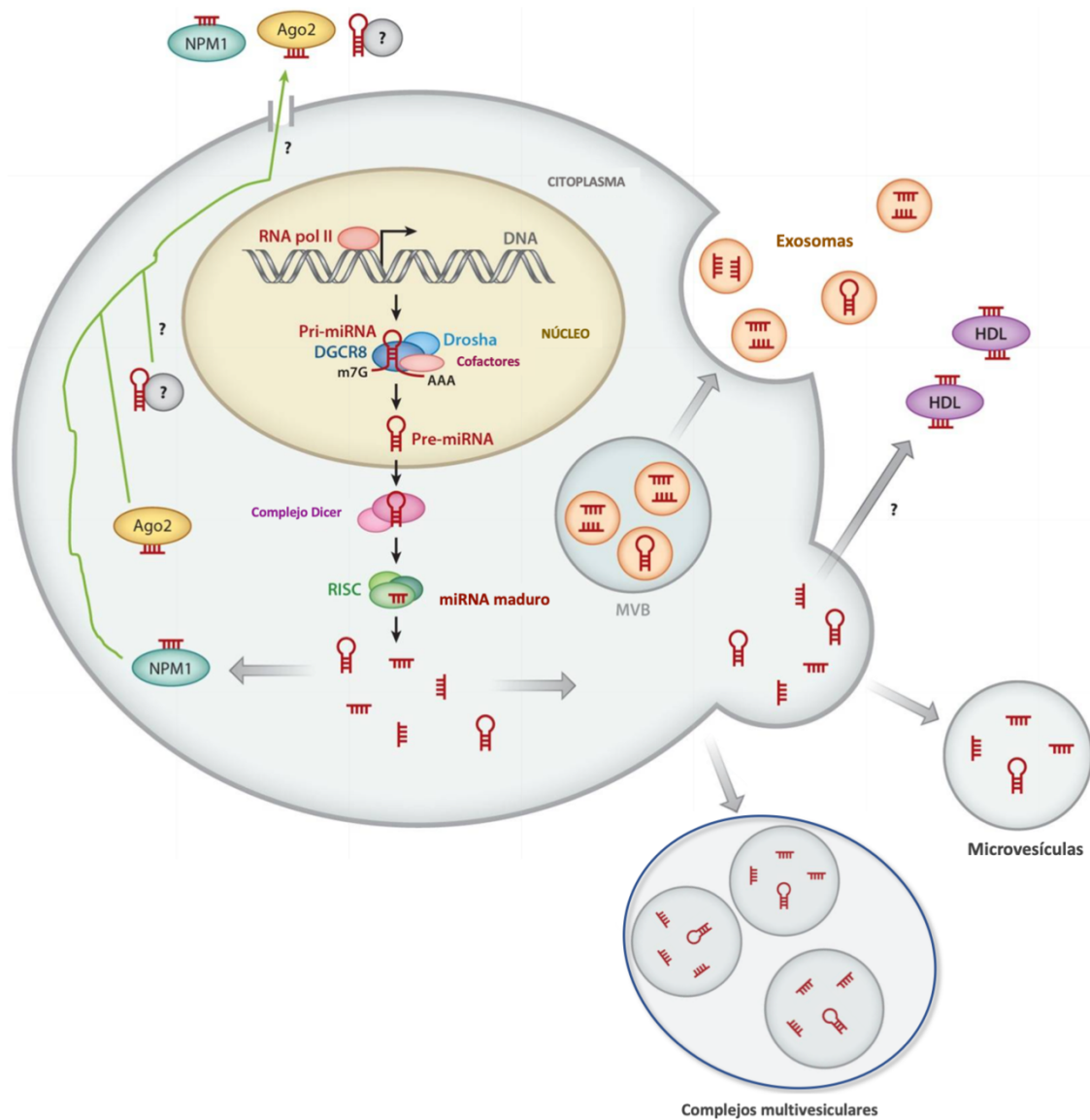


Figura 1.5. miRNAs como potenciales biomarcadores: liberación al espacio extracelular. *Los miRNAs maduros y pre-miRNAs situados en el citoplasma son liberados al espacio extracelular para actuar como moléculas de señalización y reguladoras sobre otras células. Entre los mecanismos de transporte de miRNAs destacan la formación de complejos con proteínas de unión a RNA como Ago2 o NPM1, la asociación con lipoproteínas como HDL, o formación de vesículas como exosomas, microvesículas y cuerpos multivesiculares. Modificado de Hata A, et al.¹¹¹*

Entre los condicionantes para que los miRNAs logren constituirse como biomarcadores, es preciso señalar que la cantidad de miRNAs en líquidos biológicos es relativamente pequeña, por lo que en ocasiones es difícil establecer una cuantificación y normalización adecuada. Por el momento no hay consenso sobre qué miRNA debe ser utilizado como *housekeeping* o control endógeno para la normalización de los resultados. Adicionalmente la tecnología de *microarrays* y qRT-PCR continúa requiriendo más

tiempo (horas) que las determinaciones de biomarcadores proteicos (minutos), lo que es preciso considerar en caso de su potencial traslado a práctica clínica.¹¹²

Existen múltiples estudios de validación clínica de patrones de expresión de miRNAs como biomarcadores precoces en diferentes enfermedades, alcanzándose ya en algunos casos el punto de utilización en práctica clínica y su cobertura por compañías aseguradoras.¹¹³

1.3.4 MicroRNAs en IAM

Desde su descubrimiento en la década de 1990, se ha descrito la especificidad de numerosos miRNAs por determinados órganos o tejidos. No obstante, es preciso tener en cuenta que el corazón contiene diferentes tipos celulares y que hay miRNAs no específicos del corazón que también pueden ser expresados a este nivel. En el ámbito cardiovascular, son ya numerosos los estudios que han confirmado el papel de determinados miRNAs circulantes como biomarcadores de daño miocárdico e IAM.¹¹⁴ También se les ha utilizado para predecir el riesgo individual de IAM en individuos sanos,¹¹⁵ desarrollo de aterosclerosis coronaria,¹¹⁶ disfunción ventricular e insuficiencia cardíaca,¹¹⁷ remodelado ventricular adverso,¹¹⁸ y susceptibilidad arrítmica¹¹⁹ (Figura 1.6).

Una de las principales funciones relevantes de los miRNAs en IAM es en la mediación de la **supervivencia de los cardiomiocitos**. Se han identificado a nivel experimental varios reguladores de supervivencia (inhibiendo apoptosis celular) y proliferación de cardiomiocitos. Entre ellos destacan la familia de miR-15 y miR-24 por su efecto sobre el mediador de apoptosis Bcl-2, la familia miR-34 por su efecto sobre p53, miR-320 que es considerado efector de la *heat shock protein β6* o miR-214 con capacidad protectora celular frente a H₂O₂. Otra vía importante de regulación es la **proliferación de los cardiomiocitos**; aquí es importante reseñar que, a diferencia de otros órganos, el corazón tiene una baja capacidad de regeneración. Sin embargo, estudios embriológicos han señalado a las familias de miR-17 y miR-199a o miR-590 como inductores de proliferación de células musculares cardíacas. También se han obtenido resultados prometedores en el estudio de la **angiogénesis**, dado el carácter esencial de la neovascularización en el proceso de regeneración funcional miocárdica: las familias miR-

15 y miR-17 no solo han regulado la supervivencia de los cardiomiocitos, sino que también tienen como dianas factores de supervivencia endotelial y proangiogénicos.¹²⁰

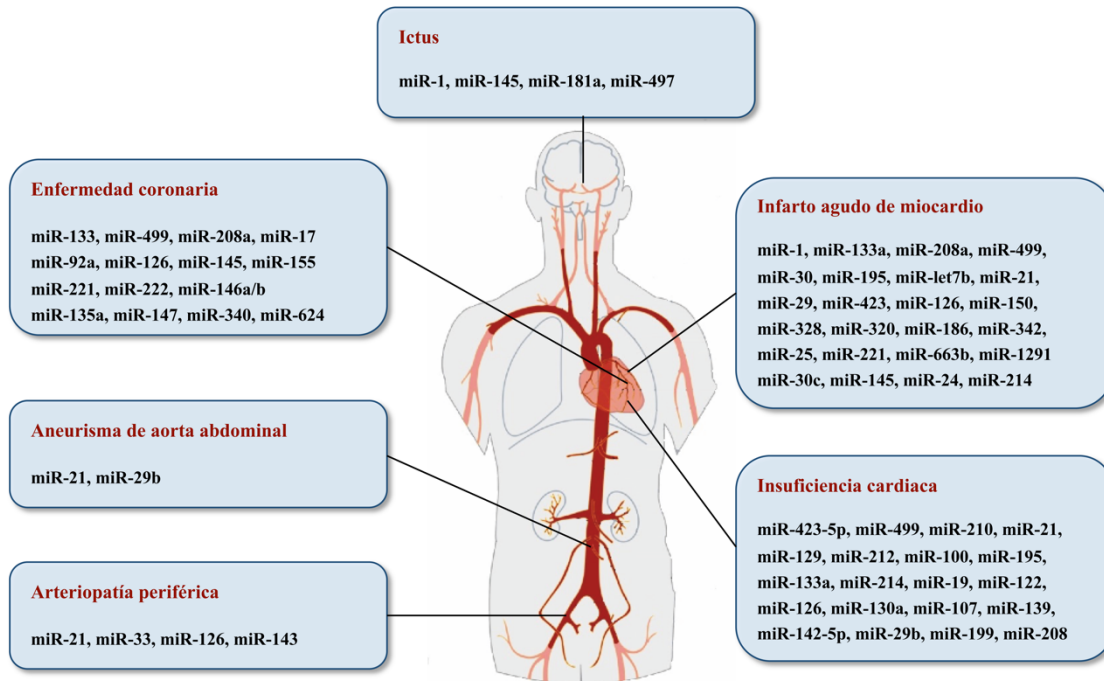


Figura 1.6. MicroRNAs asociados con enfermedades cardiovasculares. Se muestran algunos de los miRNAs descritos en humanos o animales en las principales enfermedades cardiovasculares como más prometedores por sus capacidades como biomarcadores o potenciales tratamientos a través de su modulación.

A pesar de la intensa investigación llevada a cabo sobre miRNAs en el sistema cardiovascular en los últimos años, la mayor parte de las publicaciones se centran en identificar los miRNAs más relevantes y sus correspondientes vías de actuación utilizando modelos experimentales animales e *in vitro*. La mayor parte de estudios realizados en humanos se han limitado a intentar replicar estos hallazgos previos, estando sujetos a limitaciones metodológicas ligadas al tipo de estudio (predominio de estudios retrospectivos caso-control), número reducido de sujetos o seguimiento clínico limitado.¹²¹

1.3.5 *MicroRNAs: implicaciones terapéuticas*

Múltiples estudios han confirmado que los miRNAs extracelulares son capaces de regular funciones biológicas a distancia, actuando como moléculas de señalización intercelular.¹⁰⁶ También se ha documentado como la regularización de un patrón alterado de miRNAs a niveles normales puede restaurar la homeostasis y regular vías moleculares en modelos animales.¹⁰⁰ Hoy en día es posible modular miRNAs *in vivo*, induciendo su sobreexpresión o inhibición.

Existen dos estrategias principales para conseguir la modulación terapéutica de miRNA: las estrategias directas, en las que se utilizan oligonucleótidos y construcciones basadas en virus para sobreexpresar o inhibir un miRNA, y las estrategias indirectas, donde se utilizan fármacos con capacidad de modular la expresión de un miRNA a nivel transcripcional.

Modulación directa de miRNAs

Los métodos directos más extendidos para lograr la sobreexpresión *in vivo* de miRNAs están basados en la utilización de oligonucleótidos anti-miR, consistentes en un ácido nucleico con secuencia complementaria frente a un miRNA específico, con capacidad de unirse al mismo y bloquear su efecto. Su utilización ha sido empleada con éxito tanto *in vitro* como *in vivo* en múltiples campos, destacando hasta el momento el oncológico (Figura 1.7).

También es posible lograr la modulación mediante el uso de esponjas y máscaras de miRNAs (miR-masks), consistentes en tránsitos con múltiples sitios de unión para un miRNA que disponen de una protuberancia entre los lugares de unión de miRNAs en la posición escindida por Ago2. De esta forma se consigue una asociación entre las esponjas y el complejo que contiene el miRNA correspondiente. A diferencia de lo anterior, un miR-mask es una cadena simple complementaria al mRNA diana del miRNA de interés, y frente a las estrategias anteriores no basa su acción a través de la interacción con el miRNA sino en la unión mediante hibridación complementaria al mRNA diana en su región 3'-UTR. La utilización de miR-masks implica el actuar sobre un único mRNA, con la ventaja de ser altamente selectivo, reduciendo los efectos colaterales no deseados, pero con la limitación de no bloquear todas las vías de acción del miRNA objetivo.

Existe también la posibilidad de sobreexpresar un miRNA cuya inhibición haya sido asociada a enfermedad o una respuesta patológica frente a una agresión inicial. Las

estrategias de restablecimiento de niveles de expresión de miRNAs patológicamente reducidos puede conseguirse mediante la utilización de oligonucleótidos sintéticos similares a miRNAs maduros endógenos denominados miRNAs miméticos (*miRNA mimics*). La mayoría de estudios realizados hasta la fecha se han basado en la utilización de partículas virales como lentivirus o adenovirus que contienen la secuencia de los pre-miRNAs, sin embargo también existen sistemas de vectores no virales para la transferencia de miRNAs exógenos *in vivo* utilizando vehículos liposomales, polímeros conjugados o nanopartículas.¹⁰⁷

Ya disponemos de ejemplos de utilización de terapias basadas en miRNAs que están siendo evaluados mediante ensayos clínicos en humanos, más allá del grueso de investigación en fase preclínica. Así, MRX34, una inyección liposomal que contiene miR-34a *mimic* ha completado recientemente su primer ensayo clínico en fase I para el tratamiento de varios tumores sólidos (ClinicalTrials.gov NCT01829971).¹²² Otros ensayos clínicos en marcha incluyen la evaluación de miravirsén, un inhibidor de miR-122 utilizado en hepatitis C y RG-012, un *mimic* de miR-21 evaluado en síndrome de Alport (<https://clinicaltrials.gov/>).

Modulación indirecta de miRNAs

Una vía alternativa para modular la expresión de miRNAs es el empleo de fármacos que afectan a los mecanismos epigenéticos, y que tienen la capacidad de modular de forma colateral los niveles de expresión de miRNAs. Entre los fármacos epigenéticos más estudiados destacan desmetilantes como 5-AZA-CdR o inhibidores de la histona desacetilasa, utilizados en oncología, con capacidad de incrementar los niveles de expresión en humanos de hasta el 5% de los miRNAs.^{123,124} También existe evidencia que vincula a los miRNAs como reguladores epigenéticos: se ha documentado correlación entre el estado de metilación del DNA y los niveles de expresión de varios miRNAs; la expresión de miRNAs ubicados en el genoma en regiones silenciadoras epigenéticas de largo alcance oscila en función de la metilación del DNA, las modificaciones de histonas y la estructura de la cromatina; algunos miRNAs interaccionan con actores epigenéticos importantes como DNMTs, teniendo capacidad de regular la metilación global del DNA.¹²⁵ Por estos motivos, la activación de miRNAs involucrados en la respuesta a isquemia miocárdica o transición epitelio-mesénquima podría permitir la apertura de nuevas vías de tratamiento en pacientes que han sufrido un infarto agudo de miocardio.¹²⁶

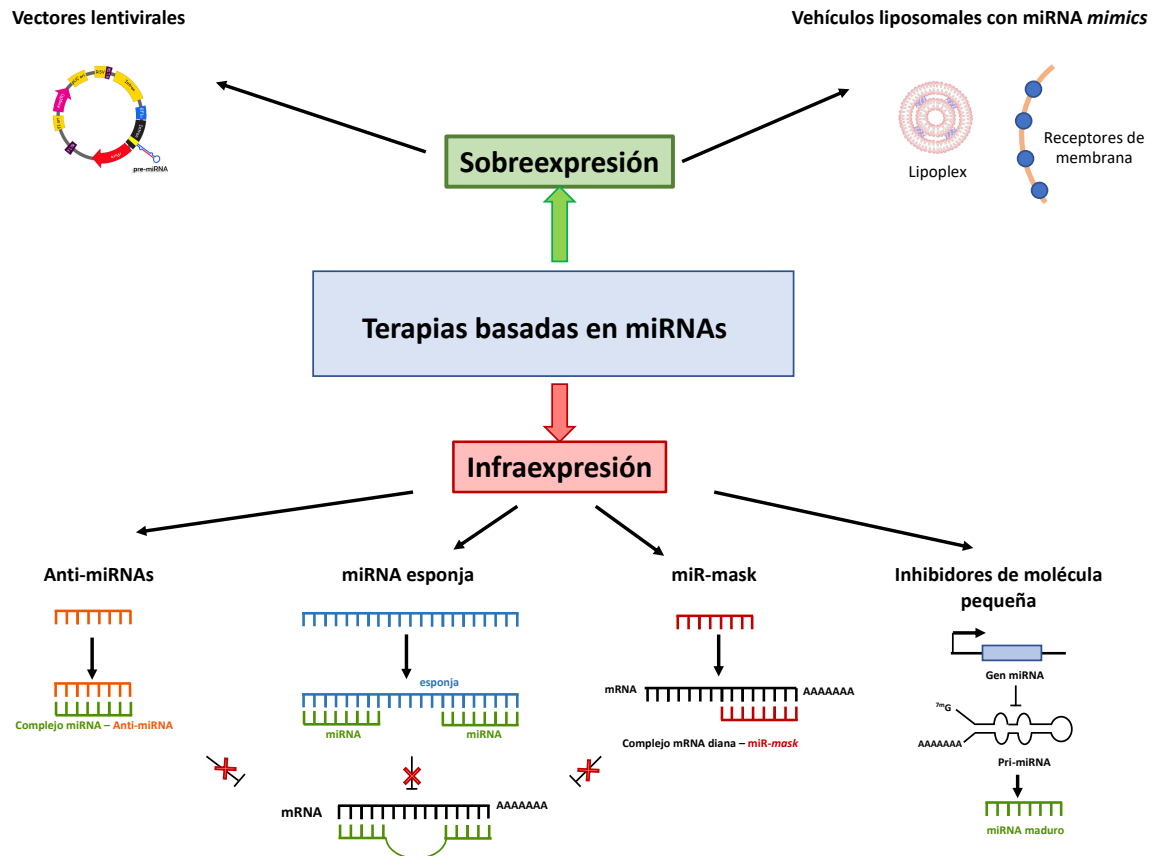


Figura 1.7. Modulación de miRNAs: opciones terapéuticas disponibles. El tratamiento dirigido a la infraexpresión de un miRNA endógeno puede ser realizado mediante oligonucleótidos Anti-miRNAs, esponjas de miRNAs o enmascaramiento de miRNAs (miR-mask). Un Anti-miRNA bloquea la interacción miRNA – mRNA diana mediante hibridación complementaria. Las esponjas de miRNAs son miRNAs sintéticos con múltiples sitios de unión para uno o varios miRNAs. Un miR-mask es una secuencia complementaria al sitio de unión del miRNA en el mRNA diana; con cualquiera de estas técnicas se bloquea la interacción del miRNA con su mRNA diana. La sobreexpresión de un miRNA puede realizarse mediante vectores lentivirales (o adenovirus) y miRNA mimics. Los miRNA mimics son RNA de doble cadena y pequeño tamaño que imitan miRNAs maduros y pueden ser acoplados en liposomas catiónicos (lipoplex) que contengan un ligando reconocible por un receptor específico de la superficie celular para lograr la transferencia génica.

Esta presente Tesis Doctoral basa su pertinencia en que el infarto agudo de miocardio continúa siendo una patología frecuente, y aunque la mortalidad aguda ha disminuido, el daño miocárdico ocasionado por el infarto puede conducir al desarrollo de insuficiencia cardíaca. Hoy en día, se carece de biomarcadores adecuados para realizar un diagnóstico precoz de en qué casos se va a producir un remodelado adverso o se van a activar mecanismos deletéreos de recuperación celular tras el estímulo isquémico. Por

este motivo, el caracterizar y validar nuevas dianas moleculares que puedan servir para desarrollar terapias futuras para el IAM, es una necesidad clínica relevante. Los miRNAs, por su papel central en la regulación génica y de respuesta celular a la isquemia miocárdica, están emergiendo como biomarcadores potencialmente útiles con finalidad pronóstica, en paralelo al desarrollo de técnicas que permiten su modulación como estrategia efectiva para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Es importante recalcar que en los últimos años se están llevando a cabo investigaciones exhaustivas relacionadas con miRNAs en enfermedades cardiovasculares. La mayor parte de las publicaciones son realizadas en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* y buscan identificar miRNAs desregulados en diferentes condiciones patológicas y sus vías moleculares y génicas de acción. Alternativamente, las publicaciones en humanos, buscan validar la desregulación de los miRNAs previamente identificados a nivel experimental, centrándose se forma repetida en el estudio de unos pocos miRNAs e ignorando los mecanismos subyacentes a la aparición de la enfermedad y su desarrollo.

El daño miocárdico ocasionado por un IAM puede conducir al desarrollo de complicaciones a largo plazo como la insuficiencia cardíaca. En este sentido, la identificación de nuevos biomarcadores como los miRNAs con capacidad pronóstica, y el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas para inducir la regeneración miocárdica o prevenir su deterioro tras un IAM, tiene una gran relevancia clínica, y este trabajo profundiza en su conocimiento.

2. HIPÓTESIS

En base al conocimiento mostrado anteriormente, proponemos las siguientes hipótesis de trabajo para la presente Tesis Doctoral:

- La predisposición genética juega un papel fundamental en la aparición de un IAM entre pacientes jóvenes no diabéticos.
- Las escalas de riesgo poligénicas compuestas por múltiples SNPs integran el riesgo genético global de un paciente y pueden ser útiles en la predicción de eventos recurrentes tras IAM y mejorar la estratificación de riesgo a largo plazo.
- Un perfil genético desfavorable determinado por una escala de riesgo poligénico puede asociarse con una aterosclerosis coronaria más agresiva.
- Determinados microRNAs pueden constituirse como nuevos biomarcadores con utilidad pronóstica en pacientes con IAM.
- Los miRNAs constituyen un mecanismo regulador esencial en el IAM, siendo responsables de la evolución a insuficiencia cardíaca crónica, y pudiendo constituirse como nuevas dianas de actuación terapéuticas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es caracterizar la contribución de los determinantes génicos en el infarto agudo de miocardio, su capacidad para constituirse como biomarcadores con finalidad pronóstica y evaluar su potencial como dianas terapéuticas. Así, se propone evaluar la capacidad predictiva de una **escala de riesgo poligénica** compuesta por múltiples SNPs en pacientes con IAM y riesgo elevado de susceptibilidad genética. En segundo lugar, se propone identificar y validar una **combinación de miRNAs** como biomarcadores de utilidad pronóstica en pacientes con IAM, analizando su potencial implicación en el daño miocárdico, y por tanto su capacidad para constituirse en nuevas dianas terapéuticas.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de SNPs asociados a riesgo coronario en una población de pacientes jóvenes no diabéticos ingresados por IAM.
- Analizar en esta población la capacidad de una escala de riesgo poligénica para identificar a pacientes con mayor riesgo de nuevos eventos cardiovasculares, y si esta mejora las herramientas de estratificación pronóstica disponibles actualmente.
- Evaluar si un perfil de riesgo genético desfavorable se asocia con un patrón de aterosclerosis más agresivo en pacientes jóvenes con IAM.

- Cuantificar el grado de expresión sérica de una combinación de miRNAs como nuevos biomarcadores diagnósticos en IAM, validando estos resultados en una cohorte global de pacientes con IAM y controles sanos.
- Determinar la utilidad pronóstica de un patrón de expresión de miRNAs para predecir la aparición de insuficiencia cardiaca o mortalidad cardiovascular a largo plazo, así como su capacidad de mejorar las escalas de estratificación de riesgo actuales.
- Identificar en un modelo experimental *in vivo* si los miRNAs seleccionados en humanos se expresan y modulan en ratas sometidas a isquemia miocárdica aguda, estudiando su evolución a largo plazo tanto en tejido miocárdico como en suero.
- Determinar mediante un modelo experimental *in vitro* si los miRNAs están implicados en las alteraciones celulares que promueven el daño miocárdico crónico y aparición de insuficiencia cardiaca tras un IAM.
- Evaluar el efecto de modular aquellos miRNAs que muestren un efecto significativo en los estudios anteriores, determinando su efecto sobre genes reguladores de apoptosis y desarrollo de fibrosis miocárdica.

4. MÉTODOS

Para el desarrollo del presente trabajo se pusieron en marcha varios estudios clínicos y modelos experimentales dirigidos a dar respuesta a cada uno de los objetivos generales planteados (Figura 4.1). En primer lugar, se diseñó un modelo clínico destinado a evaluar la contribución del riesgo genético evaluado mediante una puntuación de riesgo poligénico (GRS) a la aparición, desarrollo y agresividad de la enfermedad coronaria aterosclerótica en una población de alta susceptibilidad genética. Posteriormente, se desarrolló un modelo clínico en población general con infarto agudo de miocardio dirigido a caracterizar microRNAs con un patrón de expresión diferencial en IAM y determinar su capacidad pronóstica. Finalmente se llevaron a cabo modelos *in vitro* e *in vivo* destinados al estudio del papel de los miRNAs como mecanismos fisiopatológicos en IAM y los efectos de su modulación en este contexto clínico.

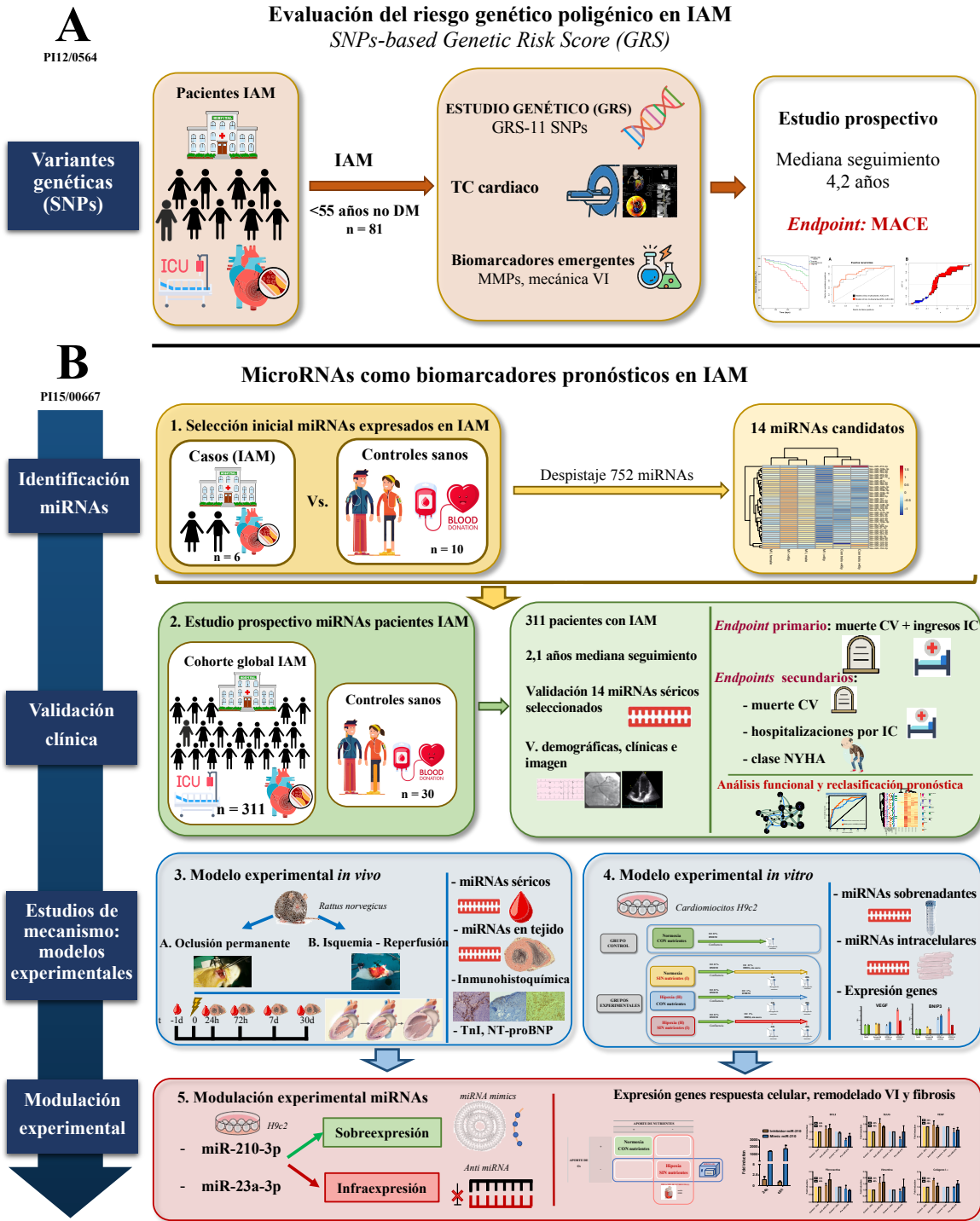


Figura 4.1 Diseño experimental de Tesis Doctoral. *A. Evaluación de una escala de riesgo poligénica basada en SNPs en la estratificación pronóstica de pacientes jóvenes con IAM y elevada susceptibilidad genética. B. Evaluación de miRNAs como biomarcadores pronósticos en IAM: 1. Selección inicial de miRNAs con expresión diferencial en pacientes con IAM; 2. Estudio prospectivo en una cohorte general de pacientes con IAM de 14 miRNAs con fines de validación y estratificación pronóstica; 3. Modelo experimental in vivo de IAM con y sin reperusión para el estudio de miRNAs, genes diana y remodelado ventricular en sangre y tejido; 4. Modelo experimental in vitro para el estudio de miRNAs y genes diana en sobrenadantes y células; 5. Modulación de miR-210-3p y miR-23a-3p para estudio de genes diana.*

4.1 Evaluación del riesgo genético poligénico como marcador pronóstico en pacientes con IAM

4.1.1 *Diseño del subestudio - riesgo genético y eventos recurrentes en pacientes jóvenes no diabéticos con IAM*

Se diseñó un estudio prospectivo con inclusión consecutiva de pacientes de edad inferior a 55 años y no diabéticos, hospitalizados por IAM tipo 1 en la Unidad Coronaria del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Se establecieron los siguientes criterios de inclusión:

- a) edad entre 18 y 55 años;
- b) IAM tipo 1, incluyendo tanto síndrome coronario agudo (SCA) con elevación como sin elevación del segmento ST y
- c) realización de cateterismo.

Los criterios de exclusión fueron:

- a) antecedentes de diabetes o cumplir los criterios diagnósticos de diabetes de acuerdo a la definición de las guías de la Sociedad Europea de Cardiología / *European Association for the Study of Diabetes*;
- b) edad mayor a 55 años.

Se recogieron datos clínicos, demográficos, ecocardiográficos y angiográficos de forma exhaustiva. Se extrajo una muestra de sangre para el estudio genético y el análisis de metaloproteinasas dentro de las primeras 24 horas del ingreso, almacenándose en el Biobanco del Hospital Universitario Ramón y Cajal / Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), integrado en la Red Nacional de Biobancos. Durante el ingreso, se realizó una tomografía computarizada (TC) cardíaca para analizar la carga de calcio coronario, así como una angiografía coronaria no invasiva, salvo contraindicación clínica, para analizar las características de cada placa (Figura 4.2).

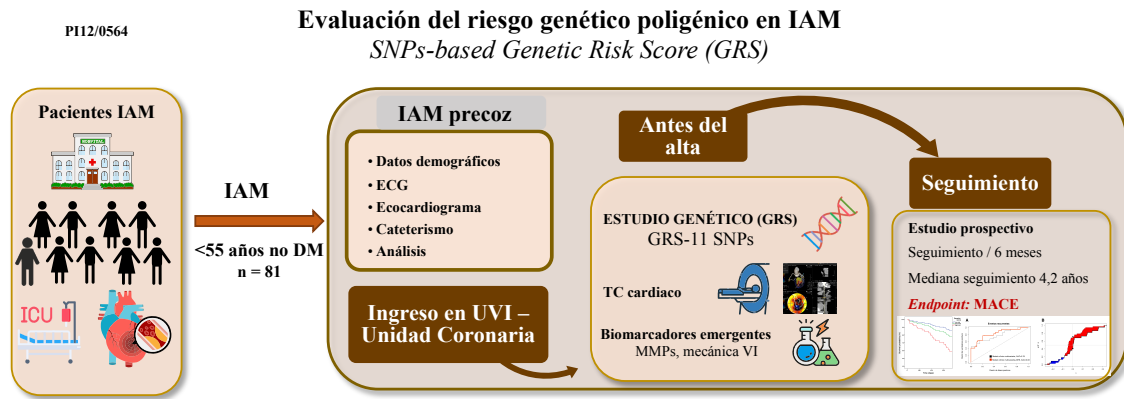


Figura 4.2. Protocolo clínico 1 para la evaluación del riesgo genético poligénico. *Estudio prospectivo con pacientes no diabéticos de edad inferior a 55 años ingresados por IAM, realizándose estudio genético (determinación de SNPs y GRS), cuantificación de metaloproteinasas, TC coronario y seguimiento clínico a largo plazo para la identificación de eventos cardiovasculares recurrentes.*

4.1.2 Consideraciones éticas

Todos los procedimientos se realizaron cumpliendo con los principios de la Declaración de Helsinki. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Ramón y Cajal (referencia CEIC 175/13). Todos los pacientes recibieron información adecuada y dieron su consentimiento informado por escrito para su participación.

4.1.3 Endpoints subestudio – riesgo genético y eventos recurrentes

El **endpoint primario** de este subestudio inicial, denominado “evento recurrente”, fue definido como un combinado de mortalidad cardiovascular, SCA u hospitalización de causa cardiovascular. Dentro del SCA recurrente se incluyó tanto al IAM como a la angina inestable. No se consideraron como eventos recurrentes aquellos ingresos derivados de la revascularización programada en un segundo tiempo de lesiones coronarias no culpables del infarto índice pero que ya se hubieran detectado en el momento inicial. Cada uno de los eventos recogidos en el seguimiento fue revisado por dos cardiólogos. El seguimiento clínico fue llevado a cabo cada 6 meses. La definición de cada covariable fue estandarizada para el análisis.

Se estableció un **endpoint secundario** combinado, definido como la aparición de SCA recurrente o mortalidad cardiovascular, siguiendo los mismos parámetros de análisis que para el objetivo primario.

4.1.4 Genotipado y análisis de muestras

La extracción de ADN se realizó siguiendo técnicas estándar, utilizando kit de extracción de DNA desde linfocitos de sangre periférica (PBMCs) (Qiagen, Alemania). El procedimiento de genotipado fue llevado a cabo en el laboratorio Gen inCode (Barcelona, España), utilizando matrices Affymetrix Axiom diseñadas *ex professo*.⁸³ Las matrices de genoma completo dieron como resultado genotipos de gran calidad, con un cociente elevado de genotipado correcto (100%) y una reproducibilidad de SNPs del 100%. La asignación de genotipo se hizo a partir de matrices utilizando IMPUTE2 v2.2.2, utilizando 1.000 genomas como matriz de referencia. Para el estudio de las variantes genéticas (Tabla 4.1) se utilizó la plataforma comercial Cardio inCode Score® (Gen inCode, España), que incluye 11 variantes genéticas asociadas con enfermedad arterial coronaria, pero no con factores de riesgo clásicos. Esta combinación fue escogida basada en los datos disponibles en el catálogo de estudios de asociación de genoma completo (GWAS) revisado en agosto de 2010 y descritos en GWAS (rs10455872 en LPA, rs12526453 en PHACTR1, rs1333049 en CDKN2A/B, rs17465637 en MIA3, rs501120 en CXCL12, rs6725887 en WDR12, rs9818870 en MRAS y rs9982601 en SLC5A3/KCNE2) e incluyendo también un haplotipo en el gen ALOX5AP (Hap B, compuesto por: rs10507391-A, rs93155050-A y rs17222842-G), el cual se ha visto que está relacionado con la enfermedad arterial coronaria en distintas poblaciones.¹²⁷⁻¹²⁹ Este haplotipo no fue extraído de GWAS dado que las variantes genéticas individuales suelen ser analizadas excluyendo los haplotipos. La matriz proporcionó una tasa de genotipado correcto del 100%. Se utilizó la prueba exacta para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg en cada una de las variantes teniendo en cuenta un valor de $P = \frac{0,05}{11}$ para determinar la significación estadística en un contexto de comparaciones múltiples.¹³⁰

Se calculó una puntuación de riesgo genético (GRS) utilizando la siguiente fórmula $GRS = \sum_{i=1}^n SNP_i$ donde se incluyó la suma del número de alelos de riesgo descritos en la Tabla 4.1 (con los valores 0, 1, o 2) en todas las variantes genéticas (n). De cara al análisis, se realizó una división de los pacientes en terciles en función de su puntuación de riesgo.

Tabla 4.1. Variantes genéticas analizadas

| Banda cromosómica | rsID | Locus genético | Cromosoma | AR / ASR (FAR) | p valor H-W |
|-------------------|------------|-------------------------------|-----------|----------------|-------------|
| 1q41 | rs17465637 | <i>MIA3</i> | 1 | C/A (0.69) | 0.925 |
| 2q33.2 | rs6725887 | <i>WDR12</i> | 2 | C/T (0.18) | 1.000 |
| 3q22.3 | rs9818870 | <i>MRAS</i> | 3 | T/C (0.13) | - |
| 6q25.3 | rs10455872 | <i>SLC22A3-LPAL2-LPA</i> | 6 | G/A (0.11) | 0.072 |
| 6p24.1 | rs12526453 | <i>PHACTR1</i> | 6 | C/G (0.66) | 0.674 |
| 9p21.3 | rs1333049 | <i>CDKN2B-AS1</i> | 9 | C/G (0.39) | 0.512 |
| 10q11.21 | rs501120 | <i>CXCL12</i> | 10 | T/C (0.84) | 0.037 |
| 21q22.11 | rs9982601 | <i>KCNE2-SCL5A3</i> | 21 | T/C (0.13) | - |
| 13q12.3 | rs10507391 | <i>ALOX5AP</i> (Haplotipo) | 13 | A/T (0.36) | 0.589 |
| | rs17222842 | | | G/A (0.92) | 0.822 |
| | rs9315050 | | | G/A (0.07) | 0.616 |

H-W, equilibrio de Hardy-Weinberg; *AR*, alelo de riesgo; *ASR*, alelo sin riesgo; *FAR*, frecuencia del alelo de riesgo. $P < 0.0045$ para la significación estadística.

4.1.5 Tomografía computarizada cardiaca

Se realizó una tomografía computarizada (TC) cardiaca a todos los pacientes antes del alta hospitalaria, salvo contraindicación clínica. En todos los casos el TC fue realizado después de la revascularización. Se utilizó un equipo de TC multidetector de 128 cortes, realizándose estudio sin contraste para cuantificación de calcio coronario seguido de angio-TC de arterias coronarias con administración de contraste yodado intravenoso. Se empleó el modo de adquisición prospectivo de forma preferencial. El posprocesado de las imágenes incluyó la realización de reconstrucciones multiplanar, de máxima intensidad de proyección y tridimensional. Los estudios fueron interpretados de forma independiente por dos investigadores. Se siguió una metodología previamente validada y estandarizada para la adquisición del *score* de calcio coronario, así como para la interpretación de la

angiografía no invasiva.¹³¹ El calcio coronario fue valorado con el método de cuantificación de Agatston; no se tuvieron en cuenta los voxels de alta atenuación correspondientes a zonas de implante de stents, que fueron excluidos del análisis.

4.1.6 Biomarcadores de remodelado de la matriz extracelular

Adicionalmente, se estudiaron los niveles de metaloproteinasas (MMPs) como marcadores proteolíticos implicados en procesos de isquemia tisular y remodelado posterior, a fin de buscar posibles correlaciones con la presencia de variantes genéticas de riesgo y otros biomarcadores emergentes. Para ello se recogieron muestras de sangre periférica dentro de las primeras 24 horas destinadas al estudio de metaloproteinasas. Dentro de los primeros 30 minutos desde la extracción, se centrifugaron a 100 g durante 15 minutos. Se aisló el suero, que fue almacenado a -80°C en el Biobanco del Hospital Ramón y Cajal/IRYCIS. Una vez finalizado el reclutamiento, se realizaron determinaciones de las metaloproteinasas (MMP) 1, 2, 7, 9 y 10, y del inhibidor tisular de la metaloproteasa 1 de la matriz (TIMP-1) en el Laboratorio de Aterosclerosis del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) – Universidad de Navarra (Pamplona, España). Las MMP 1, 2, 7, 9 y 10 se analizaron en suero mediante un ensayo multiplex basado en microesferas con tecnología Luminex de Merck (MILLIPLEX MAP, Darmstadt, Alemania). Los niveles de TIMP-1 fueron analizados mediante un ensayo de inmunoabsorción enzimática (Quantikine; R&D Systems, Mineápolis, Minesota, EEUU). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayos fueron inferiores al 6%.

Dado que no existen valores de referencia universalmente aceptados para las MMPs se realizó un análisis comparativo frente a otras cohortes clínicas de pacientes con diferentes situaciones clínicas en las que se habían analizado las MMPs en el marco de su estudio como biomarcadores predictores de evolución. En todos los casos el procesado de las muestras fue llevado a cabo siguiendo la misma metodología y en el mismo Laboratorio de Aterosclerosis del CIMA que en nuestra población. Se establecieron las siguientes cohortes de comparación, circunscrito al análisis de MMPs:

- Cohorte de control: muestra no aleatorizada de 400 sujetos con riesgo cardiovascular elevado pero sin enfermedad cardiovascular establecida, estudiados en el CIMA entre los años 2003 y 2005.¹³²

- Cohorte de pacientes con enfermedad arterial periférica: 187 pacientes con diagnóstico de enfermedad arterial periférica valorados ambulatoriamente en el Servicio de Cirugía Vascular del Complejo Hospitalario de Navarra entre 2010 y 2013.¹³³
- Cohorte de pacientes con ictus isquémico: 50 pacientes con ictus isquémico grave por oclusión de la arteria cerebral media ingresados en 6 Unidades de Cuidados Intensivos españolas y analizados en el CIMA en el marco de un estudio observacional multicéntrico.¹³⁴

4.1.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se dividió a los pacientes en grupos en función de su riesgo genético determinado por el GRS, dividiéndolos en 3 terciles. Se trazaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los *endpoints* primario y secundario para cada grupo. Tomando como referencia al grupo de bajo riesgo genético se construyeron varios modelos de regresión de Cox:

- a) modelo univariado, donde se analizó individualmente cada una de las variables de interés recogidas;
- b) modelo clínico multivariado en él se incluyeron el ya establecido score de riesgo GRACE y se evaluaron todas las variables que habían alcanzado significación estadística con el objetivo compuesto primario en el modelo univariado inicial; se utilizó el modelo de *backward elimination* para la selección final de covariables, en el que se van eliminando progresivamente aquellas variables con menor relevancia, utilizándose criterios estándar (PIN .05, POUT .010);
- c) el modelo clínico multivariado anterior, añadiendo la puntuación de riesgo genético GRS.

Se estudió la interacción entre las variables incluidas en cada modelo. El porcentaje de riesgo para el score de riesgo GRACE se calculó utilizando un nomograma con los resultados de mortalidad o IAM a 3 años. La bondad del ajuste de cada modelo se evaluó con el cociente de probabilidad y el estadístico C.

Se comparó el modelo clínico multivariado que añadía el *score* de riesgo genético frente al que no lo incluía utilizando el índice de mejora de discriminación integrada o *integrated discrimination improvement index* (IDI), y con el índice continuo de reclasificación neta o *continuous net reclassification improvement* (cNRI).¹³⁵ El índice IDI compara la diferencia promedio en la predicción de riesgo para pacientes que presentan el evento combinado frente a aquellos que no lo presentan. El intervalo de confianza al 95% para el IDI se obtuvo mediante muestreo repetido o *bootstrapping*.

Los valores perdidos (< 3%) se analizaron utilizando una técnica de asignación múltiple basada en el método de Markov. Al tratarse de un estudio exploratorio y generador de hipótesis no se realizó un cálculo formal del tamaño de la muestra. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS, versión 22.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Estados Unidos) y con el programa R versión 3.3.2 (R Development Core Team) utilizando los siguientes paquetes estadísticos: para el cálculo del estadístico-C de ambos modelos con y sin GRS utilizamos el paquete ‘survAUC’; para el incremento del estadístico-C (ΔC) entre modelos utilizamos el paquete ‘survC1’; para las curvas de Característica Operativa del Receptor – *Receiver Operating Characteristic* (ROC) el paquete ‘survivalROC’; y para la generación de gráficos el paquete ‘ggplot2’ para R.

4.2 Evaluación de miRNAs como biomarcadores pronósticos en pacientes con IAM

4.2.1 Diseño del subestudio – miRNAs como biomarcadores pronósticos en pacientes con IAM

Pacientes

Se diseñó un estudio prospectivo con reclutamiento de pacientes hospitalizados por IAM de manera consecutiva en la Unidad de Cuidados Críticos Cardiológicos del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Figura 4.3). El principal criterio de inclusión fue el presentar un IAM tipo 1, bien como síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST (SCACEST) o como síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST).

No se establecieron criterios de exclusión a fin de evitar sesgos de selección y aumentar la representatividad de la población estudiada.

Se realizó un estudio exhaustivo de los datos clínicos, epidemiológicos, analíticos, pruebas de imagen y angiografía coronaria invasiva. Se recogieron muestras de sangre venosa periférica para el análisis de biomarcadores tanto ya establecidos como emergentes. Las muestras de sangre venosa para la determinación de miRNAs séricos fueron extraídas dentro de las primeras 24 horas desde la llegada del paciente al hospital, y almacenadas en el Biobanco local. Todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado por escrito.

Controles sanos

Se estableció un grupo control con el objeto de servir como referencia para los valores de normalidad en los niveles de expresión de miRNAs. Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 30 individuos sanos pareados por edad y sexo con los pacientes con IAM incluidos en el estudio. Las muestras de suero y datos de pacientes incluidos en este grupo control fueron proporcionados por el Biobanco del Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS, procedentes de la colección de donantes de sangre (PT17/0015/0010), con la aprobación de sendos Comités Ético y Científico.

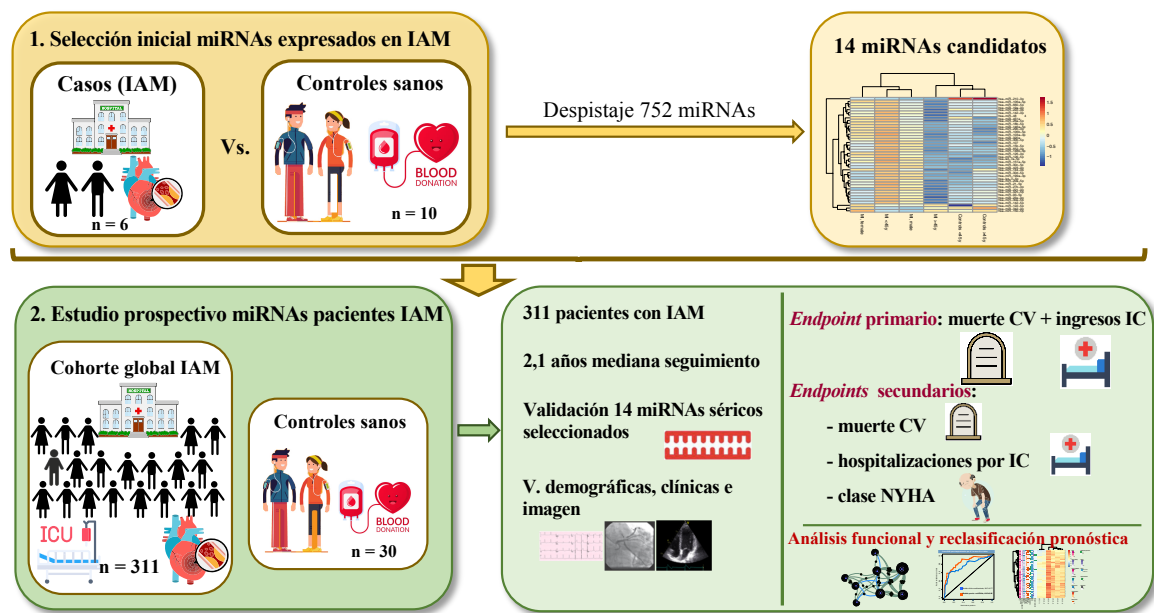


Figura 4.3. Diseño del subestudio 2 para la identificación y validación de miRNAs como biomarcadores pronósticos en pacientes con IAM. 1. Despistaje inicial entre 752 miRNAs de aquellos que presentan expresión diferencial en un grupo seleccionado de 6 pacientes con IAM y 10 controles sanos ajustados por edad, sexo y factores de riesgo. 2. Estudio longitudinal prospectivo entre 311 pacientes ingresados por IAM, y 30 controles sanos pareados, para la validación y evaluación de la utilidad pronóstica de los 14 miRNAs seleccionados previamente.

Tanto en pacientes con IAM como individuos sanos, las muestras de sangre se recogieron en tubos VACUETTE® (Z Serum Sep Clot Activator) de 8ml, siendo centrifugados a 2.500 rpm durante 10 minutos. El suero separado por centrifugación fue aislado y distribuido en alícuotas almacenadas conforme a los criterios del Biobanco del Hospital Ramón y Cajal, utilizando tubos anonimizados, con código único y a -80°C. Para estudios de miRNAs se requirieron alícuotas con 250 µL de suero.

4.2.2 Consideraciones éticas

Todos los procedimientos se realizaron cumpliendo con los principios de la Declaración de Helsinki. Este protocolo clínico fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Ramón y Cajal (referencia CEIC 061/16). Todos los pacientes recibieron información adecuada y proporcionaron su consentimiento informado escrito para su participación.

4.2.3 Endpoints subestudio 2 – miRNAs como biomarcadores pronósticos

El **endpoint primario** de este subestudio fue definido como el combinado de **hospitalización por insuficiencia cardiaca (IC) o muerte cardiovascular**.

Como **endpoints secundarios** se establecieron:

- 1) muerte de origen cardiovascular;
- 2) hospitalización por insuficiencia cardiaca, incluyendo las visitas al Servicio de Urgencias por IC en las que se administraran diuréticos intravenosos;
- 3) clase funcional NYHA a largo plazo, determinada al final del seguimiento.

Todos los eventos registrados fueron revisados por dos cardiólogos ciegos a los resultados de las determinaciones de miRNAs. Se realizó seguimiento clínico presencial cada 6 meses. Las variables clínicas fueron estandarizadas para su análisis posterior.

4.2.4 Extracción de microRNAs de suero y reacción de retrotranscripción

Previo a aislar el RNA, se añadió un RNA sintético (*Spike-in*) a las muestras de suero, utilizado como control técnico de homogeneidad en la extracción mediante sucesivas amplificaciones de los *Spike-in* UniSp2, UniSp4 y UniSp6. En la extracción del RNA total enriquecido en miRNAs se utilizaron 200 μ L de suero y un kit mini RNAeasy (Qiagen). Como control de eficiencia en la síntesis de cDNA, se añadió un RNA externo (cel-miR-39), que fue posteriormente amplificado. Para la síntesis de cDNA se utilizó un el sistema Universal RT miRNA PCR System (Qiagen). De forma resumida, se utilizan 4 μ L de RNA como molde para la retrotranscripción en un volumen final de 20 μ L.

4.2.5 Elaboración de un perfil de microRNAs

Con el objetivo de identificar miRNAs séricos que se expresaran de forma diferencial en pacientes con IAM frente a controles sanos, se diseñó ensayo de cribado para 752 miRNAs utilizando qRT-PCR, con muestras de 6 pacientes con infarto y 10 controles sanos ajustados por edad, sexo y hábito tabáquico (Tabla 4.2). Se utilizaron Paneles PCR I+II miRCURY LNA miRNA miRNome (YAHS-312 YG-8, Qiagen). Los datos obtenidos fueron normalizados en base a la media de expresión de todos los miRNAs que mostraron un C_T igual o inferior a 34. Para el análisis de los datos se utilizó software GenEx v.6.

Tabla 4.2. Población de pacientes utilizados para el cribado de miRNAs. Características clínicas principales de los pacientes y controles sanos utilizados.

| Paciente | Grupo | Presentación clínica | Edad | Sexo | Hábito tabáquico |
|----------|---------|----------------------|------|-----------|------------------|
| 1 | IAM | IAMCEST | 33 | Masculino | Yes |
| 2 | IAM | IAMCEST | 36 | Masculino | Yes |
| 3 | IAM | IAMCEST | 34 | Femenino | No |
| 4 | IAM | IAMSEST | 36 | Masculino | Yes |
| 5 | IAM | IAMSEST | 51 | Femenino | Yes |
| 6 | IAM | IAMSEST | 54 | Masculino | No |
| 7 | Control | NA | 33 | Masculino | Yes |
| 8 | Control | NA | 37 | Masculino | Yes |
| 9 | Control | NA | 39 | Masculino | No |
| 10 | Control | NA | 35 | Femenino | Yes |
| 11 | Control | NA | 38 | Femenino | No |
| 12 | Control | NA | 49 | Masculino | Yes |
| 13 | Control | NA | 47 | Masculino | Yes |
| 14 | Control | NA | 50 | Masculino | No |
| 15 | Control | NA | 49 | Femenino | Yes |
| 16 | Control | NA | 45 | Femenino | No |

IAM, infarto agudo de miocardio; IAMCEST, infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST; IAMSEST, infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST; NA, no aplicable.

A partir del cribado inicial de 752 miRNAs, se llevó a cabo una selección de miRNAs para su validación posterior. En esta selección se utilizaron dos criterios:

- 1) Criterio estadístico: solo se seleccionaron los miRNAs que mostraron valores absolutos con un cambio de más de un logaritmo frente a los controles sanos, descartándose aquellos con expresión no específica. Se diseñó un diagrama tipo *heat map* (Figura 4.4) del ensayo qRT-PCR realizado, en el que los miRNAs se organizan en una agrupación jerárquica bidireccional en función de las muestras y los miRNAs, objetivándose 42 miRNAs con un mayor patrón de expresión diferencial en cada grupo de muestras. Basados en esta agrupación, los pacientes con infarto presentaron un patrón de expresión diferente para varios miRNAs en comparación con los controles.
- 2) Criterio funcional: se realizó un análisis bioinformático, basado en el estudio de los genes diana predichos a partir de la base de datos Targetscan Human 5.1 (http://www.targetscan.org/vert_50/).¹³⁶ La lista de genes diana obtenidos en este primer paso fue posteriormente analizada utilizando la *Bioinformatic Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp>).¹³⁷ Solo se consideró incluir en el panel de miRNAs seleccionados para su validación posterior a aquellos miRNAs con genes diana involucrados en procesos biológicos relevantes en un infarto de miocardio.

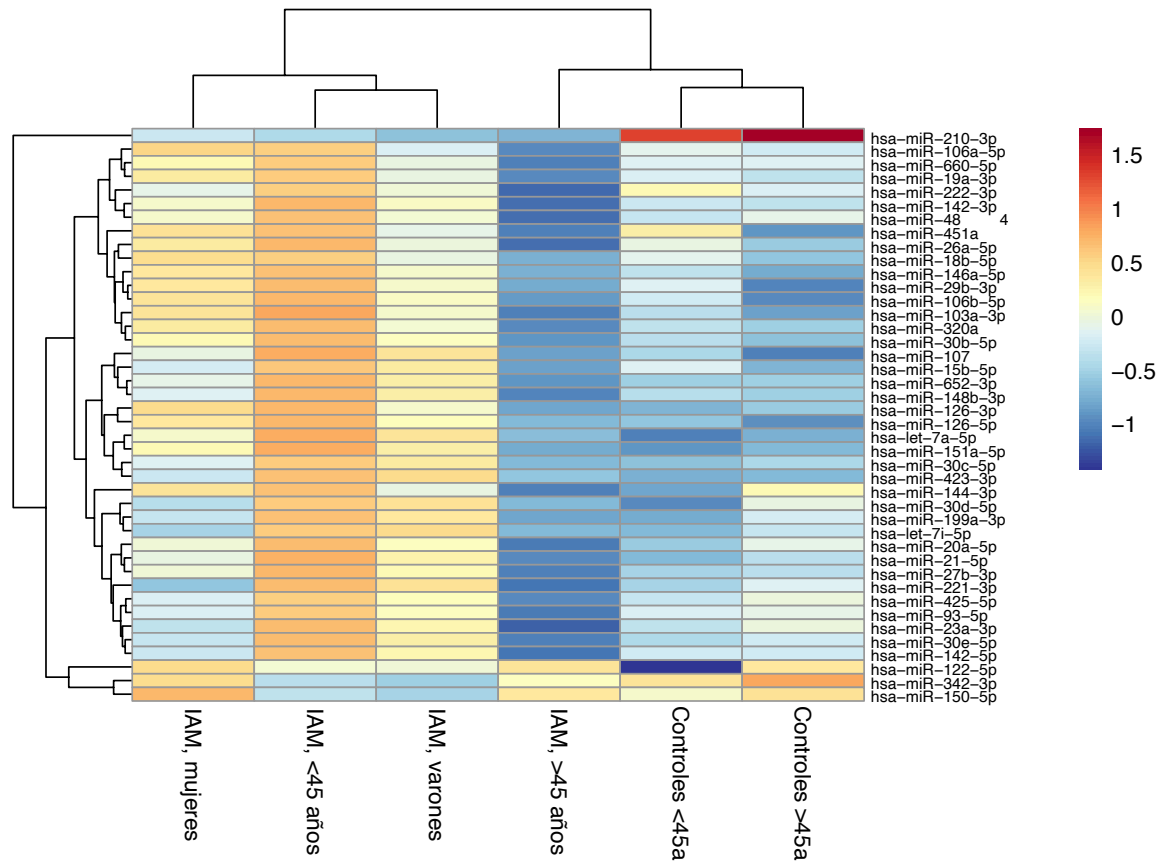


Figura 4.4. Cribado inicial de 752 miRNAs desglosado por grupos de pacientes y controles. *Heat map* y análisis jerárquico de los niveles de expresión de miRNAs en muestras de sangre venosa de 6 pacientes con infarto agudo de miocardio y 10 controles sanos. Se analizaron 752 miRNAs, mostrándose aquí los 42 miRNAs con mayor diferencia media entre grupos. Se utilizaron valores normalizados de ΔC_T para el análisis.

4.2.6 Validación de los miRNAs seleccionados mediante qRT-PCR individual

Se diluyó 1/11 el cDNA con agua estéril libre de nucleasas, y se usaron 4 μ L de dilución como molde para la PCR. La detección de la PCR fue llevada a cabo utilizando SYBR Green y sondas con modificación LNA específicas para cada uno de los miRNAs seleccionados (Qiagen). Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado utilizando como termociclador un Light Cycler 480 (Roche), calculando los valores de C_t aplicando el método de segunda derivada (Light Cycler 480 Software 1.5, Roche). Los valores de expresión de miRNAs se presentan como ΔC_T , calculado de la siguiente forma: $\Delta C_T = \Delta C_t (miRNA) - \Delta C_t (housekeeping)$. Se utilizaron los programas Normfinder y Bestkeeper para determinar cuáles eran los miRNAs *housekeeping* (controles internos) más estables,

siendo seleccionado hsa-miR-103 como miRNA normalizador por su mayor estabilidad en los estudios realizados en pacientes.

4.2.7 Análisis bioinformático

Se utilizó la base de datos miRGate para obtener las predicciones de genes diana asociados con las variables de estudio. Los genes diana fueron seleccionados basados en el criterio de que debían tener al menos dos predicciones informáticas positivas utilizando algoritmos diferentes, o bien existía evidencia biológica ya publicada. Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional utilizando el paquete ‘clusterProfiler’ de R, con un punto de corte del p-valor de 0,001 para el filtrado.¹³⁸ Se construyeron redes bipartitas, utilizando los miRNAs candidatos como fuente y los genes regulados putativos como dianas. Para la representación de las redes se utilizó un algoritmo de composición ForceAtlas2 implementado en GephiTM.¹³⁹

4.2.8 Análisis estadístico

Para la selección inicial de miRNAs candidatos, se analizaron las diferencias entre pacientes con IAM y controles sanos utilizando el test de Mann-Whitney. Los umbrales de ciclo (C_t) fueron normalizados frente a hsa-miR-103 mediante la fórmula $\Delta C_T = (C_t[\text{miRNA}] - C_t[\text{hsa-miR-103}])$.

En la cohorte de validación, se calcularon los coeficientes de correlación parcial de Spearman para describir el grado de colinearidad entre los miRNAs seleccionados. Las características clínicas de la población de estudio se describen en función de la aparición o no del evento combinado primario. Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para confirmar la distribución normal de las características basales de los pacientes. Para las variables que cumplieran el supuesto de normalidad, se aplicaron el test t-Student o ANOVA según aplicara, después de evaluar la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene. Para los datos no paramétricos se utilizaron los test U de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis, en función de lo que correspondiera.

El análisis de supervivencia se realizó mediante regresión de riesgos proporcionales de Cox, siguiendo los siguientes pasos:

- **Modelo 1:** regresión de Cox estudiando la relación entre los niveles de expresión de miRNAs con el evento primario combinado (hospitalización por IC o muerte CV), ajustado por edad (años) y sexo.
- **Modelo 2:** regresión de Cox ajustado por edad y sexo, añadiendo como variables factores de riesgo convencional: hipertensión arterial, hábito tabáquico, diabetes, dislipemia y antecedentes previos de IAM.
- **Modelo 3:** regresión de Cox ajustado por edad y sexo, añadiendo parámetros bioquímicos indicativos de extensión del infarto con los niveles de Troponina I (ng/mL).
- **Modelo 4:** regresión de Cox ajustado por edad y sexo, añadiendo péptidos natriuréticos con los niveles de NT-proBNP (pg/mL).
- **Modelo 5:** regresión de Cox ajustado por edad y sexo, añadiendo como parámetro de gravedad clínica el ya validado score de riesgo GRACE.
- **Modelo 6:** regresión de Cox ajustado por edad y sexo, añadiendo parámetros indicativos de afectación de la función sistólica como la fracción de eyección del ventrículo izquierdo al alta (FEVI - %) y la clase Killip-Kimbal (I-IV).

Se comprobó el cumplimiento de las condiciones de aplicación de la regresión de Cox, verificando en la parte paramétrica cada modelo que la contribución de cada una de las variables explicativas en la predicción de la supervivencia, o de la tasa instantánea de riesgo, se mantiene a lo largo del periodo de seguimiento. Para comprobar este supuesto se utilizó la siguiente expresión, en la que las tasas instantáneas de riesgo correspondientes a los patrones de respuesta X_A y X_B mantienen su cociente constante para cualquier tiempo t de seguimiento al no depender de $h_0(t)$:

$$h(t; X_A) = h(t; X_B) * [e^{\beta'(X_A - X_B)}]$$

A partir de la fórmula que expresa la regresión de Cox:

$$h(t; X) = h_0(t) \times e^{\beta'X} = h_0(t) \times e^{(\beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \dots + \beta_n x_n)}$$

en el que $h(t; X)$ expresa la función o tasa de riesgo, $h_0(t)$ es la función de riesgo de referencia para un sujeto hipotético que no presentara ninguna de las variables predictivas de riesgo, y $e^{\beta'X}$ es la función exponencial de las n variables explicativas, se comprobó

la relación log-lineal entre la tasa instantánea de riesgo y las variables explicativas incluidas en los sucesivos modelos siguiendo la siguiente fórmula:

$$\ln h(t; X) = \ln h_0(t) + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \dots + \beta_n x_n$$

en el que se escribe en forma de modelo de regresión múltiple el logaritmo neperiano de la tasa instantánea de riesgo $h(t; X)$ en función de una combinación lineal de las variables x_i .

A los p -valor de la razón de tasas de riesgo o *hazard ratio* (HR) obtenidos, se les aplicó el método de Benjamini y Hochberg para corrección en supuestos de comparaciones múltiples en base al número de miRNAs seleccionados. Se determinó el valor del estadístico-C para cada modelo, calculado en el momento de seguimiento medio (2 años). También se calcularon los intervalos de confianza al 95% para los valores del estadístico C en cada modelo, así como su incremento tras la inclusión individual de cada miRNA, determinado mediante un método de remuestreo de perturbaciones usando 1.000 iteraciones.

Se comparó el modelo clínico multivariado que obtuvo un mayor valor del estadístico-C con vs. sin la inclusión de miRNAs. Para ello se empleó el *integrated discrimination improvement index* (IDI), siendo este un método que compara la diferencia promedio en realizar una predicción correcta del riesgo para pacientes que presentan el *endpoint* primario durante el tiempo de seguimiento frente a aquellos que no lo sufren. También se determinó el *continuous net reclassification improvement* (cNRI), detallado previamente. El área bajo la curva ROC fue calculado para mostrar la fuerza del efecto.

El análisis de supervivencia también incluyó el trazado de las curvas de Kaplan-Meier tanto para el objetivo primario del estudio como para las variables secundarias clave descritas; la segmentación se realizó utilizando como variables de análisis aquellos miRNAs con mayor grado de asociación con la variable de estudio, dividiendo los grupos por la mediana.

Finalmente, se llevó a cabo un modelo de regresión logística multinomial para analizar la relación entre los niveles de expresión de los miRNAs estudiados y la clase funcional al final del seguimiento determinada mediante la clasificación de la *New York Heart Association* (NYHA), manteniendo como parámetros de ajuste la edad y el sexo. La clase NYHA (I-IV) fue considerada como variable dependiente ordinal tomando como referencia la clase funcional I (pacientes asintomáticos sin limitación a la actividad física

habitual), cuantificando el *Odds Ratio* (OR) o riesgo de presentar limitación funcional al final del seguimiento (clases NYHA II-IV) en función de los valores de expresión de cada miRNA determinados en el momento inicial. Se utilizó el método de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*) por presentar mayor eficiencia que el modelo de mínimos cuadrados. La bondad de ajuste del modelo estimado para cada uno de los miRNAs fue estudiada con estadísticos derivados de la verosimilitud del modelo, utilizando el coeficiente de determinación R^2 para explicar la proporción de variabilidad explicada por la ecuación de regresión, aplicando la corrección de Nagelkerke:

$$R_c^2 = \frac{R^2}{R_{max}^2}$$

, en el que R_c^2 es el índice corregido, R^2 es el coeficiente de determinación del modelo estudiado y R_{max}^2 el coeficiente de determinación de un modelo hipotético con máxima bondad de ajuste. Finalmente, se calibró el modelo, valorando la concordancia entre las probabilidades observadas en nuestra muestra y las predichas por cada modelo utilizando la prueba de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow. Para cada OR se estimó su intervalo de confianza IC 95%, utilizando 1.000 iteraciones por miRNA estudiado.

Los análisis estadísticos realizados en este subestudio fueron realizados con el programa SPSS v26.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EEUU) y con R versión 4.0.0 (R Development Core Team): se utilizó el paquete ‘ppcor’ para el cálculo de los coeficientes de correlación parcial ordinales de Spearman (ρ); el índice (IDI) fue calculado según la descripción de Uno et al.¹⁴⁰ utilizando el paquete ‘survIDINRI’, obteniendo los intervalos de confianza para el IDI mediante un método de remuestreo o *bootstrapping*. Se utilizó el paquete ‘survAUC’ para calcular el estadístico-C en los modelos con y sin miRNAs, mientras que se uso el paquete ‘survC1’ para calcular el ΔC -estadístico y su IC 95% entre modelos, y el paquete ‘survivalROC’ para las curvas ROC. Los gráficos fueron generados con los paquetes ‘ggplot2’ y ‘forestplot’ para R.

4.3 Modelos experimentales *in vivo*

4.3.1 Modelo *in vivo* de isquemia/reperfusión: IAM con reperfusión

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) macho de la cepa Sprague Dawley de 8-9 semanas y 200-250g, obtenidas de Charles River Laboratories, Francia. Durante el tiempo del estudio se mantuvieron en condiciones estándar, con acceso a comida y agua *ad libitum* en un entorno con temperatura y humedad constante, respetando el ciclo circadiano.

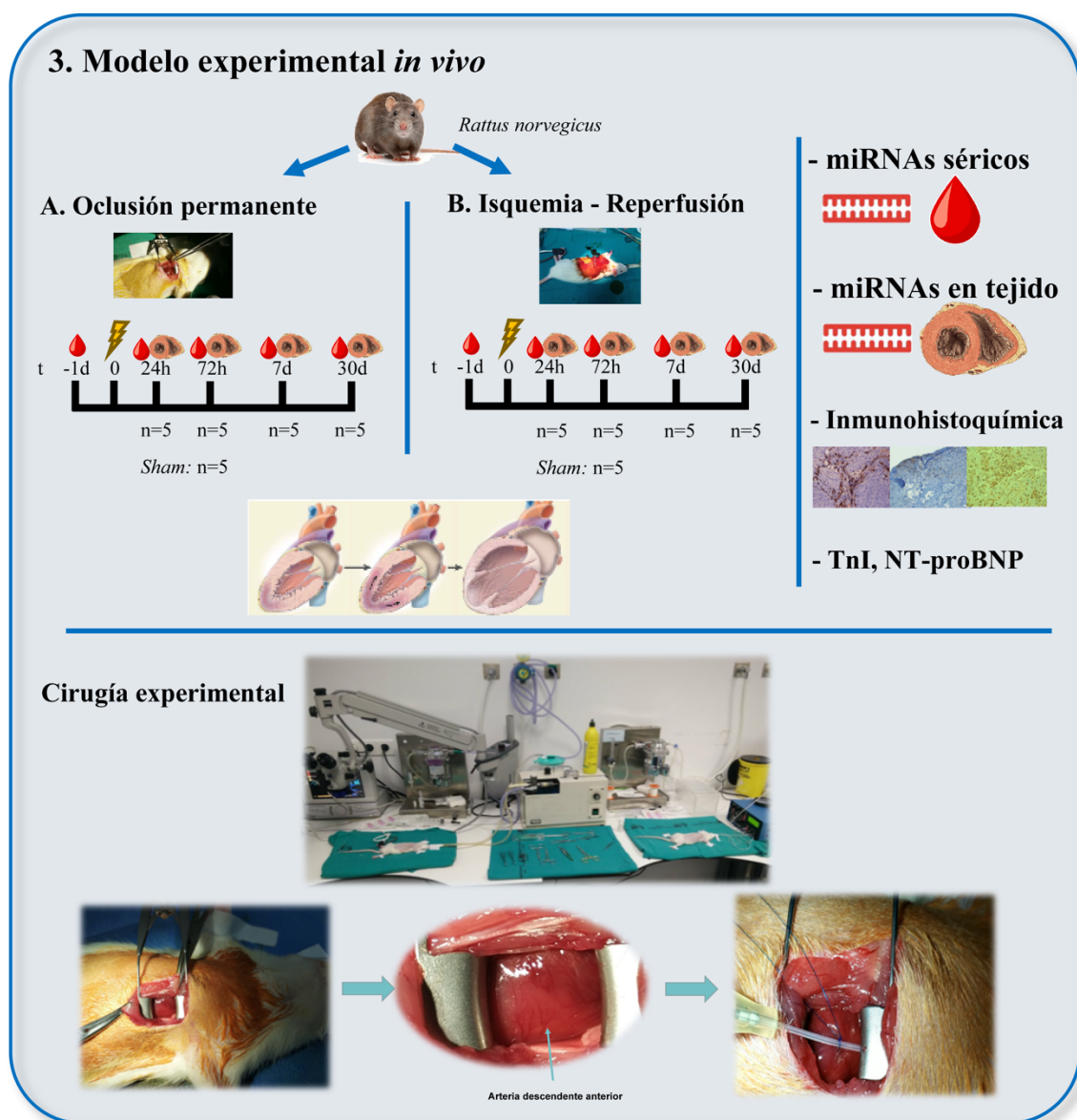


Figura 4.5 Modelo quirúrgico experimental en ratas para simular IAM. Diseño del modelo y distribución en los grupos experimentales de oclusión permanente (OP) e isquemia-reperfusión (I/R) coronaria. Instrumentación requerida en el modelo murino, común a los procedimientos de OP e I/R.

Se utilizaron un total de 30 animales en este modelo, estando integrado cada uno de los grupos experimentales por 5 animales (n=5). Se incluyeron los siguientes grupos, definido por el tiempo hasta el sacrificio: a) *sham* (cirugía sin oclusión coronaria, con punto final a las 24 horas); b) isquemia/reperfusión (I/R) 24 horas; c) I/R 48 horas; d) I/R 3 días; e) I/R 7 días; f) I/R 30 días.

Se realizó anestesia por inhalación de isoflurano (5% en inducción, 1-2,5% en mantenimiento) (Abbott Laboratories Ltd.) y 1 l/min de O₂ (Figura 4.5). La temperatura corporal del animal se mantuvo con una almohadilla eléctrica. Antes de iniciar el procedimiento quirúrgico se inyectó tramadol (Adolonta) 100mg/kg subcutáneo y lidocaína 1% sc a fin de servir como analgesia posoperatoria. Las ratas fueron intubadas utilizando un catéter Abocath n° 14-16, apoyándose en la utilización de un otoscopio, y ventiladas utilizando un respirador mecánico (NEMI Scientific, New England Medical Instruments Inc, Modelo 121/1) programado en modo volumen control con frecuencia respiratoria de 55 rpm y volumen tidal de 2,5 cm³. Se mantuvo monitorización continua con pulsioxímetro a fin de controlar la frecuencia cardíaca y saturación de oxígeno durante el procedimiento. Se realizó una incisión paralela al borde costal inferior izquierdo, disecando el músculo pectoral mayor izquierdo y con exposición de las costillas seguido de toracotomía entre el tercer y cuarto espacio intercostal para poder visualizar la superficie anterior del corazón. Mediante el uso de un retractor Weitlaner se consiguió expandir el espacio intercostal y permitir el acceso y apertura de la cavidad pericárdica. La arteria descendente anterior (DA) se visualiza mediante microscopía, realizándose ligadura transitoria a nivel próximo-medial durante 30 minutos utilizando sutura sintética (polipropileno) no absorbible monofilamento de 6-0 (Prolene, Ethicon, EEUU) y un tubo de propileno (PE-10) para facilitar la liberación posterior. La oclusión de la arteria DA se confirmaba visual y ecocardiográficamente con el cambio de coloración (de rojo a pálido) y pérdida de contracción segmentaria del territorio miocárdico en la cara anterior. Una vez transcurridos los 30 minutos de isquemia se retira el torniquete compuesto por la pieza de PE-10 y la ligadura, a fin de restablecer el flujo coronario iniciando la reperfusión. Se procedió a hemostasia, seguido de cierre por planos con suturas de 3-0 y 4-0 con colocación de tubo torácico izquierdo. Finalmente, se realizó sutura cutánea en bolsa de tabaco, retirada del tubo torácico y extubación, manteniendo la monitorización continua hasta la recuperación completa del animal. Se realizó administración profiláctica de ceftriaxona 4mg sc o cefazolina 5mg sc, según

disponibilidad. En el grupo de cirugía *sham* se realizaron los mismos procedimientos quirúrgicos a excepción de la ligadura coronaria. Durante el posoperatorio se administró tramadol sc. a las 24h o en función de las necesidades.

Se realizó toma de sangre venosa basal, a las 24 h (mediante punción en la vena caudal) y en el punto final del sacrificio (mediante punción en la vena cava) para medición de péptidos natriuréticos y Troponina I (Figura 4.6). En el punto final del protocolo se realizó eutanasia mediante parada respiratoria inducida por anestesia (isoflurano 5%, O₂ al 1%). Para la extracción de suero, los tubos fueron incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente centrifugados a 2.500 rpm durante 10 min a 4°C.

Los corazones fueron procesados para los diferentes estudios: medio corazón fue fijado en formol tamponado y posteriormente incluido en parafina para su estudio histopatológico (H/E y PAS), hibridación *in situ* para determinación celular de miRNAs e inmunohistoquímico para dianas de miRNAs. Un cuarto fue incluido en OCT (*Optimal cutting temperature*). El cuarto restante fue congelado en N₂ líquido y conservado a -80°C para extracción posterior de RNA total y miRNAs.

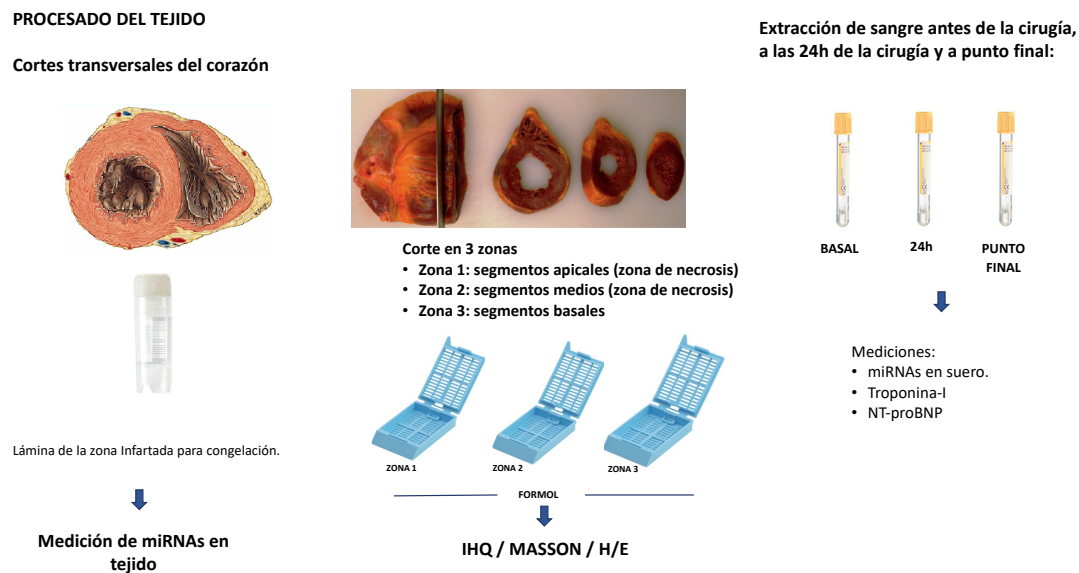


Figura 4.6. Preparación y procesamiento de las muestras biológicas procedentes de los procedimientos de cirugía experimental en modelo murino.

4.3.2 *Modelo in vivo de oclusión coronaria permanente*

Los animales de experimentación, técnicas y procedimientos fueron llevados a cabo de forma análoga al modelo de isquemia reperusión.

Al igual que en el modelo de isquemia-reperusión, se utilizaron un total de 30 animales, constando cada uno de los grupos experimentales de 5 animales (n=5). Se definieron los siguientes grupos en función del procedimiento realizado y tiempo al sacrificio: a) grupo *sham*; b) grupo oclusión permanente (OP) 24 horas; OP 48 horas; d) OP 3 días; e) OP 7 días; f) OP 30 días.

La técnica quirúrgica fue idéntica a la descrita previamente. En el punto de apertura de la cavidad pericárdica se procedió a oclusión de la arteria DA con sutura sintética no absorbible monofilamento de 6-0, sin utilización de tubo de PE-10 dado el carácter permanente de la oclusión. Una vez confirmada visualmente la oclusión coronaria se procedió al cierre por planos según lo explicado.

La extracción de muestras de sangre, eutanasia y procesado de tejidos en el punto final del protocolo fue idéntica a la descrita en el modelo isquemia-reperusión.

En la puesta a punto de ambos modelos, se realizaron **tinciones Evans Blue y TTC** para confirmar la necrosis del territorio miocárdico de la arteria DA, así como la reproducibilidad del territorio infartado. En este caso, se realizó inyección por vía intravenosa de tinción de Evans Blue 5-10 minutos antes del punto final del sacrificio; una vez realizada la eutanasia, se extrajeron los corazones y se lavaron con PBS. Los ventrículos fueron congelados a -20°C durante al menos 20 minutos y posteriormente cortados en secciones con microtomo, con grosor de corte de 2mm. Los cortes fueron colocados en placas precalentadas a 37°C con tinción TTC, manteniéndolas a esta temperatura y en cámara sin luz durante 15 minutos. Tras confirmar la distribución homogénea de la tinción se procedió al lavado con PBS por triplicado.

4.3.3 Consideraciones éticas

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio, siguiendo la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y la Recomendación 2007/526/EC en relación con los cuidados relacionados con la experimentación animal, incorporadas al ordenamiento jurídico español en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.¹⁴¹ El protocolo fue aceptado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid, como Órgano habilitado por la Comunidad de Madrid para la evaluación de proyectos, con código de referencia PROEX 298/16 (tanto para el modelo OP como I/R), para su realización en el Servicio de Cirugía y Experimentación Animal del Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), con número de registro ES-280790001941. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo el principio de las “3R” (reemplazo, reducción y refinamiento), y siguiendo las recomendaciones establecidas en las guías ARRIVE para el diseño y descripción de resultados de experimentación animal (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>).¹⁴² Tanto el doctorando como la codirectora de la Tesis están acreditados con las funciones A, B, C y D para el diseño, manejo y dirección de experimentación animal.

La mortalidad posquirúrgica previa al punto final de sacrificio fue del 25%, siendo preciso incrementar en ese número los animales usados. Adicionalmente, se dispusieron otros 10 animales con fines de puesta a punto de los dos modelos quirúrgicos y confirmación histológica y reproducibilidad del grado de necrosis miocárdica inducida.

4.3.4 Posprocesado de muestras de modelos experimentales in vivo

Estudios histoquímicos

Los estudios histológicos fueron llevados a cabo en las instalaciones del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Se realizaron cortes de bloques de parafina enfriados a temperatura de 4°C, con una distancia de 4 µm, utilizando un microtomo rotatorio HM 325, Thermo Scientific Microm, Fisher Scientific, NH, EEUU. Los cortes fueron recogidos en baño de flotación y secados durante 1 hora a 37°C.

Se realizaron **tinciones de hematoxilina/eosina (H/E)** para evaluar los cambios morfológicos e histopatológicos inducidos en el tejido miocárdico. Para ello, los cortes ventriculares de aproximadamente 2 mm de espesor fueron colocados en paraformaldehído 4% durante 72 horas, a fin de lograr su fijación. Posteriormente se embebieron en parafina, extrayéndose cortes de 4 μm con microtomo. Las secciones fueron posteriormente desparafinadas con xileno durante 10 minutos (x2), hidratadas con etanol graduado (etanol 96% 5 min (x2), etanol 70% 5min (x2) y agua ultrapura Milli-Q® (x2)), tintadas con H/E, deshidratadas con etanol graduado, lavadas en xileno y montadas en resina neutra. En las imágenes, visualizadas con microscopio óptico, la hematoxilina tiñe las estructuras ácidas (basófilas) en tonos púrpura y azulados, marcando núcleos celulares; por su parte, la eosina tiñe los componentes básicos (acidófilos) en tonos rosados gracias a su carácter ácido o aniónico, marcando el citoplasma.

Las tinciones tipo **tricroómico de Masson** fueron realizadas para evaluar el tejido conectivo y la presencia de fibrosis miocárdica en el punto final del modelo en todos los animales instrumentados. De forma similar, las muestras de tejido eran colocadas en paraformaldehído 4%, embebidas en parafina siguiendo procedimientos habituales y extrayéndose cortes de 4 μm de espesor. El procedimiento de tinción fue realizado tras desparafinar, empleando hematoxilina durante 3 minutos y aclarando posteriormente con agua. En el siguiente paso se utilizó una solución alcohólica de ácido clorhídrico 1% durante 3-5 segundos. Se sumergió la muestra en agua para aclarado durante un minuto. Tras un nuevo aclarado las secciones fueron tintadas con solución de fucsina durante 3 minutos, aclarando con agua destilada y diferenciado con ácido fosfomolibdico 1% durante 1 minuto. Una vez aclarada la muestra de nuevo, las secciones fueron tintadas con solución de azul de anilina durante 1 minuto, aclaradas con etanol 95%, deshidratadas con alcohol 95% y alcohol anhidro, secado al aire y montado sobre resina neutra.

Estudios inmunohistoquímicos

Se realizaron estudios de inmunohistoquímica para analizar la infiltración por células inmunes en el tejido infartado, así como factores de transcripción relacionados con la respuesta celular a la isquemia. Finalmente, se estudió el desarrollo progresivo de fibrosis miocárdica analizando el depósito intercelular de colágeno y procesos de transición epitelio-mesénquima.

Para ello, se utilizaron cortes obtenidos siguiendo el mismo proceso que en los estudios histopatológicos, siendo deshidratados y sometidos a un protocolo de recuperación antigénica inducida por calor (*HIER*), sumergiendo las muestras en una Solución de Recuperación Antigénica (ácido cítrico 0,1 M, citrato de sodio 0,1 M) en una olla a presión durante 20 minutos. Posteriormente se llevó a cabo un bloqueo de la peroxidasa endógena con *Peroxidase-Blocking Solution, Dako REAL S2023* (Agilent, CA, EEUU) durante 30 minutos en cámara húmeda. Tras el bloqueo de la peroxidasa se realizaron 3 lavados de 5 minutos en tampón fosfato salino (PBS) con polisorbato 20 al 0,05% (Tween 20, Merck Millipore, MA, EEUU). Se mantuvo el tejido en PBS con BSA 1% durante 30 minutos. A continuación, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario durante la noche a temperatura de 4 °C. Se realizaron 3 lavados adicionales de 5 minutos en PBS con Tween 20 al 0,05%, incubándose las muestras con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras realizar otros 3 lavados se disponen las muestras para su visualización con un kit de revelado que contiene tampón sustrato (solución tampón imidazol-HCL a PH 7,5) y DAB/cromógeno (3,3-diaminobenzidina, DAKO K3468, Agilent, CA, EEUU). Una vez que el tejido toma coloración marrón se interrumpe la reacción poniendo las muestras en agua y contrastándolas mediante tinción con hematoxilina, hidratándolas y pasándolas por una cadena de alcoholes. Finalmente, los cortes fueron montados en portaobjetos con medio DePeX (SERVA Electrophoresis, Alemania). Las imágenes presentadas fueron adquiridas con cámara digital Olympus C-7070 *wide zoom*. Para el análisis de las imágenes obtenidas se utilizó el software ImageJ (National Institutes of Health, EEUU).

Se utilizaron los siguientes marcadores inmunohistoquímicos:

a) **Estudio del infiltrado inflamatorio (IHQ):**

- **CD68:** marcador de macrófagos (Abcam Ref. Ab 125212, con dilución del anticuerpo primario 1/500 - anticuerpo secundario Envision HRP Dako, Agilent, CA, EEUU).
- **CD3:** marcador de linfocitos T (Abcam Ref. ab16669, con dilución del anticuerpo primario 1/100 – anticuerpo secundario Envision HRP Dako, Agilent, CA, EEUU).

- **CD163**: marcador de macrófagos M2 (Abcam Ref. ab182422, con dilución del anticuerpo primario 1/300 - anticuerpo secundario Envision HRP Dako, Agilent, CA, EEUU).
- **Mieloperoxidasa (MPO)**: utilizada para reconocimiento de neutrófilos. MPO es responsable de la actividad microbicida lisosomal de neutrófilos, monocitos y macrófagos, usada como marcador global de leucocitos (Thermo Fisher Ref. PAS16672, con dilución del anticuerpo primario 1/75 – anticuerpo secundario Envision HRP Dako, Agilent, CA, EEUU).
- **Actina alfa de músculo liso (α -SMA)**: los anticuerpos anti- α contra actina del músculo liso, también denominada ACTA2, son marcadores de células transicionadas a miofibroblastos y por tanto fibrotización del tejido (Abcam Ref. 7817, con dilución del anticuerpo primario 1/200 - anticuerpo secundario Envision HRP Dako, Agilent, CA, EEUU).

b) **Otros marcadores:**

- **HIF-1 α** : factor de transcripción clave en la respuesta celular y sistémica a la isquemia tisular e hipoxia celular (Novus Biológicas. Ref: NB 100-105, dilución anticuerpo primario 1/20 – anticuerpo secundario Envision HRP Dako, Agilent, CA, EEUU).
- **VEGF**: factor de crecimiento endotelial vascular, implicado en la neovascularización asociada a isquemia tisular e hipoxia celular.

Otros biomarcadores (troponina I y NT-proBNP)

Se realizaron determinaciones de los niveles de troponina ultrasensible (cTnI us) y NT-proBNP en suero en dos momentos: previo al inicio del procedimiento quirúrgico y a las 24 horas de la oclusión de la DA. Utilizando un volumen de muestra de 210 μ L, se procedió a un análisis de micropartículas quimioluminiscentes para la determinación cuantitativa de los niveles séricos de troponina-I usando el sistema Architect STAT (Abbott Laboratories, IL, EEUU). Las determinaciones de NT-proBNP fueron realizadas sobre un volumen de 9 μ L con un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia Elecsys proBNP II (Roche Diagnostics, Suiza). En ambos casos se utilizaron las instalaciones de laboratorio del Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

4.3.5 Extracción de RNA total en tejidos

Se extrajo RNA para el análisis de expresión intracelular de mRNAs y miRNAs en las muestras de tejido miocárdico isquémico de las ratas sometidas a IAM por oclusión coronaria permanente o isquemia/reperfusión.

Lisado celular, extracción y cuantificación de RNA

Para la preparación y homogeneización de las células procedentes de tejidos, procedentes de los modelos *in vivo*, las muestras fueron ubicadas en 10 volúmenes de solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, TRIzol (Invitrogen, MA, EEUU) y se siguieron las instrucciones del fabricante Qiagen RNeasy en relación a la preparación y concentraciones adecuadas. Brevemente, se colocaron las muestras de tejido de hasta 1g en tubos cónicos de 50 ml con 15ml de TRIzol refrigerado, homogeneizando posteriormente la muestra y refrigerando a -80°C . El RNA extraído fue cuantificado utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU).

qRT-PCR

El cDNA de los miRNAs seleccionados se obtuvo de 2 μg de RNA total de cada muestra, utilizando miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR (Exiqon, 339340, QUIAGEN, Alemania) y 1 μl de muestra de cDNA como molde o *template* para la PCR, llevada a cabo con LightCycler 480 YBR[®] Green master mix (Exiqon, 339347, QUIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo las PCR con un equipo LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Suiza). Cada muestra y experimento fue llevado a cabo por triplicado, utilizando normalizadores en cada uno de estos experimentos. Se utilizaron primers para los miRNAs a estudio: hsa-let-7a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-221-3p.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos exógenos (*Spike-in*) como controles a lo largo del proceso:

- control de hemólisis: hsa-miR-451 y hsa-miR-23a;
- control de extracción: UniSp2
- control de retrotranscripción (RT): cel-miR-39-3p (miRNA sintético de *C. elegans*).

El cDNA de los genes seleccionados se obtuvo de 2 µg de RNA total de cada muestra utilizando Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit Ref: 04897030001 (Roche Diagnostics), 1 µl de muestra de cDNA como cDNA molde (*template*) y LightCycler 480 SYBR® Green Master (Roche Diagnostics) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las PCR fueron llevadas a cabo en un equipo LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Cada muestra y experimento fueron analizados por triplicado.

Los valores de C_t fueron calculados utilizando el método matemático a partir de la obtención del valor máximo de la segunda derivada de la curva de amplificación, utilizando el software LightCycler® 480, versión 1.5 (Roche Diagnostics). Los valores de expresión de los miRNAs y genes se presentan como ΔC_t , definido como:

$$\Delta C_t = C_t \text{ miRNA} - C_t \text{ housekeeping}$$

Para la normalización de los niveles de expresión de miRNAs se cuantificaron los siguientes miRNAs con expresión estable:

- modelo *in vivo*, tejido miocárdico de rata: hsa-miR-30c. También se analizaron hsa-miR-103 y hsa-miR-191 que mostraron menor estabilidad, por lo que fueron desestimados.
- modelo *in vivo*, sangre periférica de rata: hsa-miR-30c. También se analizaron hsa-miR-103, hsa-miR-124 y hsa-miR-191, que presentaron menor estabilidad por lo que fueron desestimados.

4.3.6 Extracción de RNA total en sangre periférica

Se recogió suero procedente de sangre periférica de las ratas sometidas al modelo quirúrgico en los tiempos indicados. Estas muestras fueron centrifugadas para la extracción de miRNAs. Se extrajo el RNA total enriquecido en miRNAs utilizando un miRCURY RNA Isolation Kit- Biofluids Ref: 300112 (Exyqon, Dinamarca), siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección y cuantificación de los niveles de expresión de los miRNAs estudiados fue realizada mediante qRT-PCR utilizando el sistema Universal RT miRNA PCR System (Exyqon, Dinamarca). Se utilizaron como molde o *template* 200 ng de RNA, distribuidos en pocillos de 20 µl. Se preparó una dilución 1/11 con el cDNA y agua estéril libre de nucleasas.

Para la detección de miRNAs en las PCR se utilizaron sondas SYBR Green y sondas LNA específicas de cada miRNA (Exiqon, Dinamarca). Cada una de las reacciones fue llevada a cabo por triplicado utilizando como instrumento un LightCycler 480 (Roche, Suiza).

4.3.7 Estudio de la expresión de miRNAs mediante qRT-PCR

El procesado de **tejidos y muestras de suero procedentes de estudios *in vivo*** para la determinación de los miRNAs implica el uso de TRIzol (Fisher Scientific, NH, EEUU) y precipitación. El RNA total que contiene miRNAs es cuantificado, valorándose su integridad y utilizándose para la realización de qRT-PCR tal como se ha indicado previamente. En este caso se utilizó como *housekeeping* hsa-miR-30c (hsa-miR-30c LNA™ PCR primer set, Qiagen, Alemania), por su mayor estabilidad frente a hsa-miR-103, hsa-miR-124 y hsa-miR-191.

Los datos fueron presentados utilizando el método de segunda derivada aplicando la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. De esta forma los resultados se muestran en *fold*s o veces de inducción y se elimina la necesidad de establecer curvas estándar para su cuantificación relativa. En nuestro trabajo se realizaron experimentos de comprobación de la eficiencia de las reacciones de PCR, verificando el cumplimiento de sus condiciones de aplicación.

4.3.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos procedentes del modelo animal han sido expresados como media \pm desviación estándar (SD). Las comparaciones entre los diferentes grupos experimentales fueron realizadas mediante análisis de la varianza (ANOVA) en caso de distribución normal o con el test de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney de lo contrario. En el análisis de expresión de miRNAs en sangre periférica para cada grupo experimental, los resultados fueron normalizados respecto a los niveles basales previos a la intervención quirúrgica. En las comparaciones entre grupos experimentales se tomó como referencia el grupo de cirugía *sham*. Se estableció un punto de corte de 0,05 para la significación estadística en las comparaciones entre grupos experimentales. Los datos fueron analizados con el programa SPSS, versión 26.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Estados Unidos) y con el programa Graph-Pad Prism, versión 9, para la generación de gráficos.

4.4 Modelos experimentales *in vitro*

Se planteó un modelo experimental *in vitro* en cardiomiocitos para poder estudiar a nivel intra- y extracelular la expresión de miRNAs y su papel como mecanismos reguladores ante situaciones de hipoxia y/o privación de nutrientes que simulan isquemia miocárdica aguda. El estudio se centró en los miRNAs previamente identificados en el protocolo clínico en pacientes con IAM y que habían sido estudiados también en el modelo quirúrgico en ratas, a fin de profundizar en el estudio mecanístico en un entorno controlado en el que únicamente se analizaron células musculares cardíacas.

4.4.1 Cultivos celulares

Se utilizaron células procedentes de la línea celular H9c2 de cardiomiocitos ventriculares inmortalizados procedentes de rata por ser el tipo celular más ampliamente empleado en modelos de isquemia/reperfusión miocárdica y de preconditionamiento isquémico.¹⁴³ Esta línea celular representa una población homogénea de células cardíacas que permite el desarrollo simulado de numerosas patologías, y es considerado actualmente como el mejor modelo para simular daño isquémico. Para llevar a cabo los procedimientos experimentales *in vitro*, se adaptó un modelo de privación de oxígeno y nutrientes puesto a punto en el Laboratorio de Biomarcadores y Dianas Terapéuticas con células epiteliales del túbulo proximal renal, que mimetiza el daño de las células epiteliales proximales renales.¹⁴⁴

Las células H9c2 (ATCC, VA, EEUU) fueron cultivadas en placas P60, en medio DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - (Gibco™, Fisher Scientific, NH, EEUU), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 0,5% de PSG, compuesto por penicilina G 100 U/ml, estreptomina 10 mg/ml y glutamina 2 mM. Se mantuvieron en incubadora en condiciones estándar para cultivo celular a 37°C, con atmósfera húmeda y un 5% de CO₂. El cultivo se mantuvo hasta alcanzar un 80-90% de confluencia.

4.4.2 Diseño del modelo *in vitro*

Se utilizó un diseño experimental factorial 2x2 para el estudio de dos intervenciones: 1) aporte de O₂ (+/-) y 2) aporte de nutrientes (+/-), para someter a las células a una situación análoga a la isquemia (Figura 4.7).

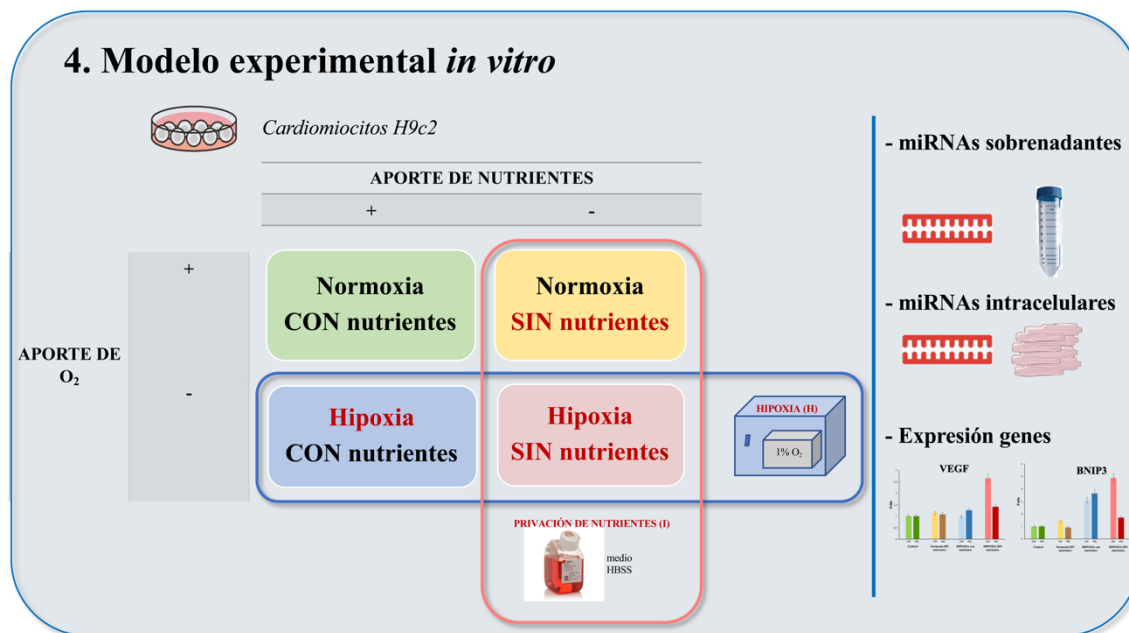


Figura 4.7. Modelo factorial empleado para el protocolo *in vitro*. Se establecieron 4 grupos en función del aporte de oxígeno (normoxia vs hipoxia) y de nutrientes (aporte vs privación de nutrientes).

Los procedimientos llevados a cabo fueron los siguientes:

- 1) Privación de nutrientes (I): retirada de medio DMEM, lavando con PBS 1x y cambio a un medio mínimo HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) sin factores de crecimiento, sin nutrientes y con baja concentración de glucosa y derivados.
- 2) Hipoxia (H): privación de oxígeno, mediante una incubadora hermética a 37°C perfundida con una mezcla de gases con baja cantidad de O₂ (1%), y con CO₂ (5%) y N₂ (94%). Durante 30 min apertura de la bala con gases hasta alcanzar la concentración indicada, manteniéndose posteriormente cerrada la cámara de hipoxia hasta la recogida de muestras (Air Liquide, Francia).

Las células del grupo control (normoxia con nutrientes) permanecieron en todo momento en medio completo (DMEM) suplementado con PSG e incubadora convencional en condiciones de 21% de O₂, 5% de CO₂ y 37°C (Figura 4.8). Las condiciones de privación de nutrientes e hipoxia se mantuvieron durante un periodo de tiempo entre 24 y 48 horas, realizando determinaciones experimentales en estos tiempos. En el momento de la recogida de muestras a las células se las retiró de su medio, fueron lavadas una vez con PBS frío, y posteriormente congeladas en sus placas a -80 °C. Los sobrenadantes también fueron recogidos y almacenados a -80 °C.

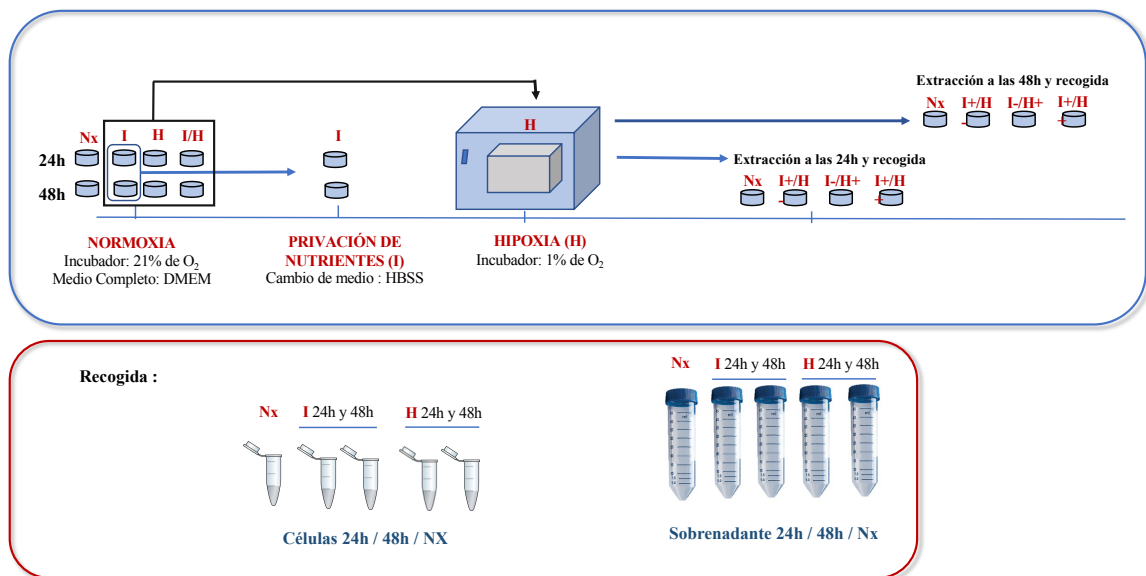


Figura 4.8. Protocolo experimental *in vitro* en cardiomiocitos H9c2. Las células fueron sometidas a hipoxia y/o privación de nutrientes con recogida de sobrenadantes y muestras celulares a 24 y 48 horas. I corresponde a privación de nutrientes; H, hipoxia; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), es un medio completo suplementado con nutrientes y suplementos; HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution), a un medio mínimo con privación de nutrientes.

Como resultado del diseño factorial seguido en estos procedimientos se obtuvieron células y sobrenadantes a 24 y 48 horas, procedentes de los siguientes grupos experimentales (Figura 4.9):

- normoxia con nutrientes (grupo control);
- normoxia + privación de nutrientes (I);
- hipoxia con nutrientes (H);
- hipoxia + privación de nutrientes (H/I).

Todos los experimentos *in vitro* fueron repetidos un total de 3 veces con el fin de verificar la reproducibilidad del modelo celular y asegurar su robustez estadística.

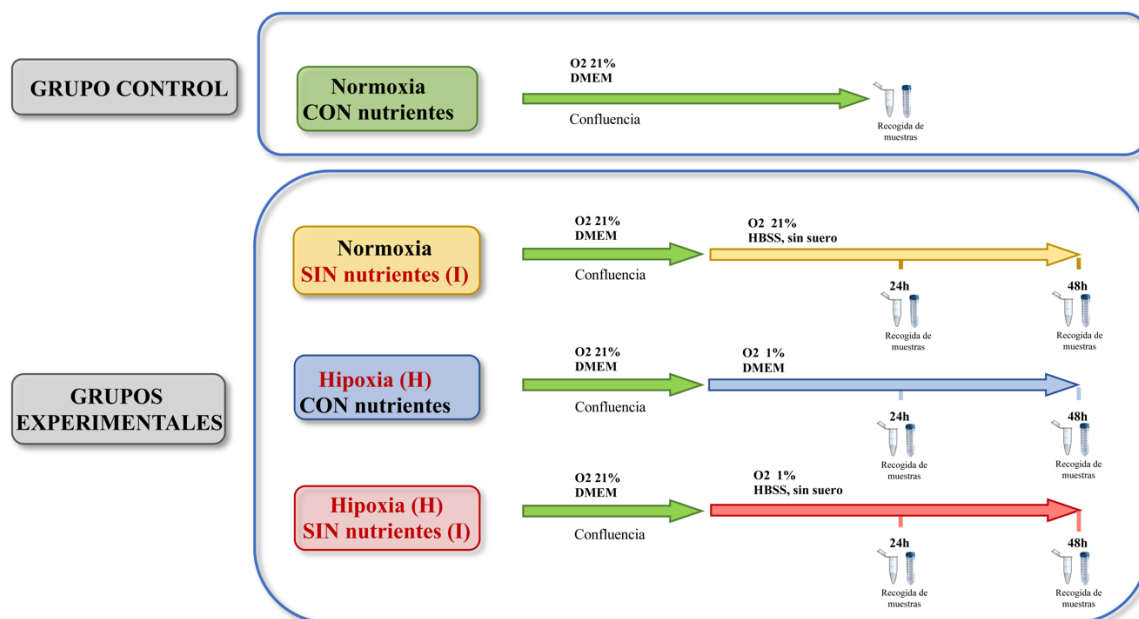


Figura 4.9. Grupos experimentales *in vitro* y recogida de muestras. Como resultado de los procedimientos *in vitro* a los que fueron sometidos los cultivos celulares con cardiomiocitos H9c2 se obtuvieron los grupos experimentales y control indicados, procediéndose a la extracción y procesado de muestras celulares y sobrenadantes a las 24 y 48 horas.

4.4.3 Extracción de RNA total en células

Se extrajo RNA para el análisis de expresión intracelular de miRNAs y genes relacionados en cada uno de los grupos experimentales del modelo *in vitro*: cardiomiocitos H9c2 sometidos a hipoxia y/o privación de nutrientes.

Lisado celular

En este caso se añadió 1 ml de TRIzol por cada pellet de células ($<1 \times 10^7$ células), recuperando el lisado celular con una espátula de caucho tras lo que se transfiere a un tubo de 2 ml de microcentrifugado.

Extracción de RNA

El proceso de extracción de RNA siguió la misma metodología descrita en el apartado 4.3.5 para las muestras procedentes del modelo *in vivo*.

En este caso se utilizaron los siguientes genes *housekeeping*:

- para las muestras celulares H9c2: el snRNA U6. También se analizó el rRNA 5S, que presentó menor estabilidad.

- para las determinaciones de genes: el gen ribosómico 28S
- para los sobrenadantes celulares: se utilizó una estrategia de normalización basada en los oligonucleótidos exógenos UniSp2 y cel-miR-39 como *Spikes-in*.

4.4.4 Extracción de RNA total en sobrenadantes

Para el estudio de los miRNAs seleccionados se recogieron los sobrenadantes de las muestras obtenidas *in vitro*. La metodología empleada en sobrenadantes celulares fue idéntica a la descrita en el apartado 4.3.6 para la extracción de RNA total en muestras de suero de las ratas sometidas a cirugía experimental.

4.4.5 Estudio de la expresión de miRNAs y genes mediante qRT-PCR

Estudio de la expresión de miRNAs

En el procesado de las **muestras procedentes de estudios *in vitro*** se añadió cel-miR-39 como control externo de retrotranscripción (*Spike-in*), tal y como se ha indicado, extrayéndose el RNA mediante un kit comercial miRNCURY RNA Isolation Kit – Biofluids Ref. 300112 de Exiqon (Qiagen, Alemania) y cuantificando y valorando su integridad mediante electroforesis con un chip (Bioanalyzer, Agilent, EEUU) antes de utilizarse en qRT-PCR. Como miRNA *housekeeping* se analizaron el snRNA U6 y rRNA 5S, siendo escogido el primero por su estabilidad.

Los datos fueron presentados en *folds* o veces de inducción, utilizando el método de segunda derivada aplicando la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, siempre que se cumplieran las condiciones de aplicación: existencia de un grupo control y que los *primers* utilizados para la reacción presentaran una eficiencia de 2 en la amplificación del producto.

Estudio de la expresión de genes

A fin de obtener cDNA se realizó la retrotranscripción con un cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) partiendo del RNA total previamente extraído de cada muestra y siguiendo las instrucciones del fabricante. Del cDNA obtenido, se utilizó como molde 1 μ l para la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) con SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics). En este caso se utilizó el gen ribosomal 28S como *housekeeping* o

control interno a fin de normalizar los datos obtenidos, que están analizados y expresados nuevamente en *fold*s mediante el método de la segunda derivada: $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Se estudiaron los niveles de expresión de 2 genes como son VEGF y BNIP-3, por ser ambos marcadores de hipoxia celular por ser dianas de HIF, y claves por su función de homeostasis vascular y antiapoptótica, respectivamente.

4.4.6 Estudio de dianas predichas y validadas de miRNAs

Se analizó la implicación funcional de los miRNAs identificados a lo largo del trabajo, documentando sus dianas predichas o validadas a partir de las bases de datos Targetscan Human 5.2 (http://www.targetscan.org/vert_50/) y miRDB (<http://mirdb.org>). El listado de genes diana e implicaciones funcionales fue obtenido mediante la *Bioinformatic Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp>).

4.4.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos procedentes del modelo animal han sido expresados como media \pm desviación estándar (SD). Las comparaciones realizadas entre los diferentes grupos experimentales fueron realizadas mediante análisis de la varianza (ANOVA) en caso de distribución normal o con el test de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney de lo contrario. En el análisis de expresión de miRNAs en sobrenadantes, los resultados fueron expresados en ΔC_T por carecer de *housekeeping* con estabilidad. En las comparaciones entre grupos experimentales se tomó como referencia el grupo control (normoxia + nutrientes). Se estableció un punto de corte de 0,05 para la significación estadística en las comparaciones entre grupos experimentales. Los datos fueron analizados con el programa SPSS, versión 26.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Estados Unidos).

4.5 Modulación de miRNAs *in vitro*

Utilizando el modelo *in vitro* descrito anteriormente, se modularon los 2 miRNAs más relevantes a lo largo del proyecto: miR-210-3p y miR-23a-3p. Se realizó transfección de pre-miRNAs (sobreexpresión) y anti-miRNAs (inhibición) en cardiomiocitos, que fueron posteriormente sometidos a procesos de hipoxia y privación de nutrientes.

El objetivo fue analizar si la sobreexpresión o inhibición artificial de estos miRNAs en cardiomiocitos tenía algún efecto regulador sobre la expresión de genes que se conocen por ser clave en la supervivencia celular ante una agresión de tipo isquémico y en el desarrollo de remodelado ventricular adverso.

Para ello, se cultivaron células H9c2 (ATCC, VA, EEUU) en un medio DMEM suplementado con FBS 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml (Invitrogen, MA, EEUU), en una atmósfera humedecida con CO₂ 5% y 37 °C de temperatura. Una vez completado el procedimiento de transfección, las células fueron sometidas al proceso de privación de oxígeno y nutrientes en el que se siguió la misma técnica que se ha descrito en el apartado 4.4.2. También se dispuso de un grupo control (normoxia y aporte de nutrientes) a fin de servir como referencia y normalización para los niveles de expresión de los genes a estudio (Figura 4.10).

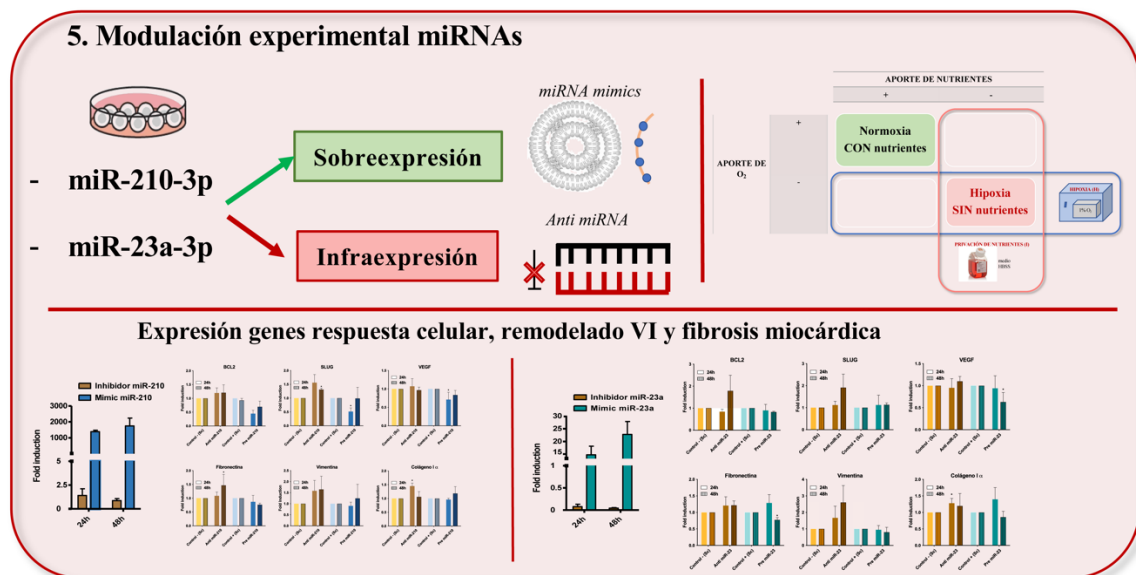


Figura 4.10. Estudios de sobreexpresión e inhibición de miR-210-3p y miR-23a-3p *in vitro*. Se utilizaron cardiomiocitos H9c2, induciendo sobreexpresión o inhibición con un miRNA mimic y un Power Inhibitor, respectivamente. Se compararon los resultados de las células a privación de oxígeno y nutrientes, disponiendo de un grupo control, analizando los niveles de expresión intracelular de los miRNAs y genes a estudio por ser potenciales dianas.

Tanto tras los procedimientos de inhibición como de sobreexpresión, se realizó extracción de muestras a las 24 y 48 horas del inicio de la hipoxia y privación de nutrientes. Las células fueron retiradas de su medio, lavadas con PBS frío, y posteriormente congeladas en sus placas a -80°C . Los sobrenadantes también fueron recogidos y almacenados a -80°C . Se obtuvieron células y sobrenadantes. Todos los experimentos *in vitro* fueron repetidos un total de 3 veces.

4.5.1 Inhibición in vitro de miR-210-3p y miR-23a-3p mediante transfección

A fin de silenciar transitoriamente la expresión de miR-210-3p y miR-23a-3p, se cultivaron células H9c2 en placas P60 hasta alcanzar el 70-80% de confluencia, siendo transfectadas con 50nM de miRCURY LNA Power Inhibitor para miR-210-3p (PER-YCI0202833-EDA, BioNova, España) o miR-23a-3p (PER-YCI0202786-EDA, BioNova, España), respectivamente, o con un control negativo miRCURY LNA Power Inhibitor (PER-YCI0202035-EDB), usando como reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen, MA, EEUU) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. A las 48 horas de la transfección, las células fueron sometidas al protocolo de isquemia consistente en privación de oxígeno y nutrientes, tal y como se ha descrito en el apartado 4.4.2, realizándose determinaciones a las 24 y 48 horas.

4.5.2 Sobreexpresión in vitro de miR-210-3p y miR-23a-3p mediante transfección

Se utilizaron miméticos (miRNA *mimics*) para inducir la sobreexpresión de los 2 miRNAs de interés. Para ello, se cultivaron las células H9c2 hasta alcanzar el 70-80% de confluencia, realizándose la transfección con 10 nM de miRCURY LNA miRNA Mimic para miR-210-3p o miR-23a-3p (YM00470861-ADA; YM00470983-ADA; BioNova, España), respectivamente, y un control negativo con miRCURY LNA miRNA Mimic (YM00479902-ADB). Al igual que en el caso anterior, se utilizó Lipofectamine 200 (Invitrogen, MA, EEUU) como reactivo de transfección de los mimic-miR y mimic-miR-*scrambled*. Pasadas 48 horas de la transfección y siguiendo el protocolo del fabricante, las células fueron sometidas al protocolo de hipoxia y privación de nutrientes.

4.5.3 Estudio de la expresión de genes

La metodología empleada para la extracción y procesado de las muestras fue idéntica a la realizada en el modelo *in vitro*. A fin de profundizar en el estudio del efecto de la modulación de ambos miRNAs, se amplió el número de genes analizado:

- BCL2: diana de HIF y función antiapoptótica. Este gen codifica una familia de proteínas reguladoras de procesos de permeabilidad mitocondrial, constituyendo un regulador clave de la vía intrínseca de apoptosis celular.
- VEGF: diana de HIF y función de homeostasis y proliferación vascular. Este gen codifica una familia de factores de crecimiento del mismo nombre, siendo promotor de proliferación y migración de células endoteliales vasculares, estando vinculado a inflamación y angiogénesis en el contexto del IAM.
- SLUG: también conocido como SNAI2, codifica un factor de transcripción promotor de la migración y diferenciación celular, inhibiendo la E-cadherina. Es una proteína implicada en la transición epitelio-mesénquima y con actividad antiapoptótica.
- Fibronectina (FN1): marcador de fibrosis miocárdica. Codifica una glucoproteína depositada en la matriz extracelular como parte del desarrollo de tejido de granulación y remodelado tisular, permitiendo la adhesión de fibroblastos y depósito de colágeno.
- Vimentina (VIM): marcador celular de transición epitelio-mesénquima, de miocito a miofibroblasto. Codifica una proteína constituyente de los filamentos intermedios del citoesqueleto celular y en las uniones desmosómicas intercelulares.
- Colágeno tipo I α : marcador de fibrosis miocárdica. Este gen codifica el colágeno producido por los fibroblastos y que constituye la matriz extracelular anómala, clave en el remodelado tisular tras isquemia.

Tabla 4.3. Secuencias de primers utilizados en los estudios de expresión de genes.

| Gen | Especie | Forward sequence | Reverse sequence |
|------------------------|--|-----------------------|--------------------------|
| 28S | <i>Homo sapiens</i> , <i>rattus norvegicus</i> | CAGTACGAATACAGACCG | GGCAACAACACATCATCAG |
| BCL-2 | <i>Rattus norvegicus</i> | GTATGATAACCGGGAGATCG | AGCCAGGAGAAATCAAACAG |
| SLUG | <i>Rattus norvegicus</i> | AGACTCCAGCCCAAGCTTTC | GCTTTTCCCCAGTGTGTGTTT |
| VEGF | <i>Rattus norvegicus</i> | TGCCAAGTGGTCCCAG | CGCACACCGCATTAGG |
| Fibronectina (FN1) | <i>Rattus norvegicus</i> | GCCCTTACAGTTCCAAGTTCC | GCCTACAGTAACAACCTCTTCTC |
| Vimentina (VIM) | <i>Rattus norvegicus</i> | CTTCGCCAACTACATCGACA | CTGCAGCTCCTGGATCTCTT |
| Colágeno I α | <i>Rattus norvegicus</i> | GTGGAAACCTGATGTATGCT | TGGTGATACATATTCTTCTGGG |
| HIF-1 α | <i>Homo sapiens</i> , <i>rattus norvegicus</i> , <i>mus musculus</i> | AGTGTACCCTAACTAGCCG | TTCACAAATCAGCACCAGC |
| BNIP-3 | <i>Rattus norvegicus</i> , <i>mus musculus</i> | GGCGTCTGACAACCTTCC | ACCGCATTTACAGAACAAATTAAC |

5. RESULTADOS

5.1 Riesgo genético poligénico en la predicción de eventos recurrentes en pacientes jóvenes con IAM

5.1.1 Características basales de la población

Del total de 553 pacientes ingresados por IAM en la Unidad de Cuidados Agudos Cardiológicos del Hospital Universitario Ramón y Cajal de agosto de 2013 a diciembre de 2014 fueron incluidos un total de 81 pacientes consecutivos que cumplían las características de selección del subestudio 1 (edad <55 años y no diabetes mellitus) (Figura 5.1).

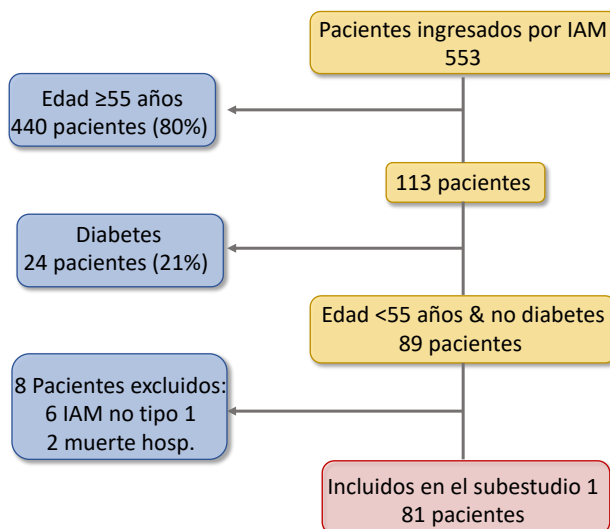


Figura 5.1. Selección de pacientes en subestudio 1 destinado a evaluar el riesgo genético poligénico. Se reclutaron pacientes jóvenes (<55 años) no diabéticos ingresados por IAM. IAM, infarto agudo de miocardio.

La edad media de los pacientes fue de 48 ± 6 años, siendo mayoritario el sexo masculino (89%). Se muestran las características clínicas en detalle en la Tabla 5.1

segregadas en función de su tercil de riesgo genético. El factor de riesgo más frecuente fue el tabaquismo (65%), seguido de la hipertensión arterial y la dislipemia, con un 38% y un 33%, respectivamente. Uno de cada cuatro pacientes presentaba un IMC en el rango de obesidad, y un 29% declararon tener antecedentes familiares de EAC prematura (definida como IAM en familiares de primer grado varones <55 años o mujeres <65 años), destacando su ausencia de correlación con el tercil de riesgo genético poligénico (GRS) analizado.

Tabla 5.1. Características basales de los pacientes de acuerdo a su puntuación de riesgo genético (GRS). N = 81.

| | Cohorte total | GRS riesgo bajo | GRS riesgo intermedio | GRS riesgo alto | <i>p</i> |
|--|---------------|-----------------|-----------------------|-----------------|----------|
| <i>Evento índice</i> | | | | | |
| GRS | 7,2±1,7 | 5,5±0,8 | 7,4±0,6 | 9,5±0,7 | |
| Edad, años | 4,8±6 | 49±6 | 47±7 | 48±6 | 0,50 |
| Sexo masculino | 71 (89) | 27 (90) | 28 (90) | 16 (84) | 0,77 |
| IMC, kg/m ² | 28,6±5,3 | 30,4± 6,7 | 28,0±4,1 | 26,8±3,4 | 0,15 |
| EAC previa | 6 (7) | 2 (7) | 3 (10) | 1 (5) | 0,82 |
| Hipertensión | 30 (38) | 14 (47) | 10 (32) | 6 (32) | 0,42 |
| Dislipemia | 27 (33) | 14 (47) | 5 (16) | 8 (42) | 0,03 |
| Tabaquismo activo | 53 (65) | 18 (60) | 22 (71) | 13 (68) | 0,64 |
| Antecedentes familiares de EAC prematura | 23 (29) | 10 (33) | 11 (36) | 2 (11) | 0,15 |
| <i>Datos del IAM inicial</i> | | | | | |
| IAM con elevación ST | 57 (71) | 22 (73) | 21 (68) | 12 (74) | 0,85 |
| Frecuencia cardíaca, lpm | 78±19 | 77±19 | 81±19 | 76±18 | 0,68 |
| Revascularización exitosa | 76 (95) | 29 (97) | 28 (90) | 19 (100) | 0,27 |
| Clase de Killip ≥ II | 11 (14) | 2 (7) | 5 (16) | 4 (21) | 0,32 |
| Score de riesgo GRACE | 117±27 | 115±23 | 118±30 | 119±24 | 0,83 |
| <i>Parámetros de laboratorio</i> | | | | | |
| Hemoglobina, g/l | 15,1±1,6 | 15,2±1,8 | 15,0±1,4 | 14,9±1,5 | 0,78 |
| FG, ml/min/1,73 m ² | 97±24 | 94±25 | 98±25 | 103±20 | 0,40 |
| Troponina I máxima, ng/ml | 48±68 | 46±83 | 51±58 | 45±61 | 0,95 |
| Colesterol total, mg/dl | 188±45 | 194±45 | 178±45 | 197±44 | 0,27 |

| | Cohorte total | GRS riesgo bajo | GRS riesgo intermedio | GRS riesgo alto | <i>p</i> |
|------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------------|-----------------|----------|
| C-LDL, mg/dl | 119±41 | 126±40 | 116±44 | 113±34 | 0,45 |
| C-HDL, mg/dl | 38±11 | 39±10 | 37±9 | 38±12 | 0,79 |
| Triglicéridos, mg/dl | 145±96 | 144±78 | 134±67 | 173±155 | 0,45 |
| MMP-1 | 97±12 | 94±12 | 99±12 | 99±11 | 0,22 |
| MMP-2 | 12±8 | 12±8 | 11±9 | 14±9 | 0,43 |
| MMP-7 | 27±3 | 28±3 | 27±3 | 27±2 | 0,69 |
| MMP-9 | 184±77 | 181±69 | 183±84 | 191±81 | 0,91 |
| MMP-10 | 552±431 | 594±590 | 568±358 | 450±158 | 0,55 |
| TIMP-1 | 190±120 | 183±108 | 197±131 | 187±123 | 0,90 |
| <i>TC cardiaca (n = 50)</i> | | | | | |
| Puntuación CAC | 117±27 | 162±232 | 417±881 | 178±276 | 0,40 |
| Percentil CAC >90 ¹³¹ | 40 | 40 | 38 | 42 | 0,97 |
| Número de placas coronarias | 5,5±4,9 | 4,7±4,6 | 6,6±5,5 | 5,3±4,6 | 0,55 |
| Enfermedad multivaso | 71 | 71 | 69 | 75 | 0,93 |
| <i>Hallazgos ecocardiográficos</i> | | | | | |
| FEVI en el momento del alta, | 57±11 | 58±11 | 55±10 | 58±11 | 0,59 |
| <i>Strain</i> longitudinal, % | 13,0±3,4 | 11,2±3,5 | 14,1±2,7 | 14,2±3,8 | 0,06 |
| <i>Strain</i> radial, % | 27,7±9,6 | 26,1±7,1 | 28,4±10,3 | 25,9±11,1 | 0,77 |
| <i>Strain</i> circunferencial, % | 26,7±6,1 | 26,2±6,5 | 26,3±6,0 | 29,4±6,4 | 0,58 |
| <i>Medicación al alta</i> | | | | | |
| β-bloqueantes | 69 (86) | 28 (93) | 27 (87) | 14 (74) | 0,14 |
| IECA/ARA-II | 60 (75) | 22 (73) | 26 (84) | 12 (63) | 0,25 |
| Diurético | 8 (10) | 2 (7) | 3 (10) | 3 (16) | 0,58 |
| Estatinas de alta potencia | 76 (95) | 28 (93) | 31 (100) | 17 (90) | 0,22 |

El riesgo genético, cuantificado como puntuación de riesgo genético (GRS) se muestra en terciles. Los valores de las variables cuantitativas se muestran como media ± desviación estándar (SD) para las variables continuas y como % para las categóricas. IMC, índice de masa corporal; EAC, enfermedad arterial coronaria; IAM, infarto agudo de miocardio; ICP, intervencionismo coronario percutáneo; CAC, calcio arterial coronario; FG, filtrado glomerular; C-LDL, colesterol-LDL; C-HDL, colesterol HDL; MMP, metaloproteinasa; TIMP-1, inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1; TC, tomografía computarizada; FEVI, fracción de eyección de ventrículo izquierdo; IECA, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; y ARA-II, antagonista de los receptores de angiotensina II.

El IAM con elevación del segmento ST (IAMCEST) fue la forma de presentación más habitual, en un 72% de los casos. La mediana de tiempo de hospitalización fue de 2,5 días [rango intercuartílico 2-4] y el 32% de los pacientes presentaron estenosis significativas en arterias no responsables del SCA, determinado por angiografía invasiva, así como un 4% de enfermedad coronaria de los 3 vasos principales. El tratamiento al alta se adhirió en un alto grado a las recomendaciones vigentes de acuerdo a guías de práctica clínica.

Ninguno de los pacientes había sido previamente diagnosticado de Hipercolesterolemia Familiar (HF) según los criterios de la *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN). Se llevó a cabo una evaluación exhaustiva de la puntuación en la escala DLCN, que incluyó la ampliación del estudio genético con análisis de exoma aplicando un panel genético dirigido al estudio de dislipemia familiar a los 8 pacientes que presentaron puntuación ≥ 4 (Hipercolesterolemia Familiar posible). Esto se llevó a cabo debido al interés en dirigir el estudio a evaluar el riesgo genético poligénico, identificando potenciales pacientes que pudiesen actuar como factor confusor al presentar una enfermedad de carácter hereditario, pero de carácter monogénico y autosómico dominante como es la Hipercolesterolemia Familiar. Sin embargo, ninguno de los pacientes incluido alcanzó la puntuación requerida para su diagnóstico, ni antes ni después del estudio genético (Tabla 5.2). A nivel étnico, todos los pacientes declararon origen étnico con ascendencia europea.

Tras una mediana de seguimiento de 4,1 [3,5 - 4,4] años se produjeron un total de 24 eventos (30%) para el *endpoint* primario combinado de este subestudio, denominado como evento recurrente. La morbilidad y mortalidad objetivada entre los pacientes de este subestudio fue cardíaca casi en su totalidad. Se completó seguimiento clínico de al menos 3 años en todos los pacientes participantes. En aquellos pacientes que presentaron eventos recurrentes, el tiempo promedio hasta la aparición del objetivo primario fue de $1,1 \pm 0,8$ años.

Tabla 5.2 Estudio genético para Hipercolesterolemia Familiar (HF) entre los pacientes con “HF posible” de acuerdo a los criterios de la Dutch Lipid Clinic Network.

| ID | Estudio genético HF | | | | SNPs relacionados con dislipemia | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---------------------|------|------------|--------------|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|--------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|-----------|--|
| | Resultado | Gen | Nucleótido | Proteína | rs11220462 | rs1367117 | rs1564348 | rs1800562 | rs2479409 | rs3757354 | rs429358 | rs4299376 | rs629301 | rs6511720 | rs7412 | rs8017377 | rs10455872 | rs3798220 | rs17244841 | rs2032582 | rs4149056 | |
| | | | | | ST3GAL4 | APOB | SLC22A1 | HFE | PCSK9 | MYLIP | APOE | ABCG5-G8 | CELSR2 | LDLR | APOE | NYNRIN | LPA | LPA | HMGCR | ABCB1 | SLCO1B1 | |
| 1 | negativo | NA | NA | NA | GG | GG | CT | GG | AG | CC | CT | GT | TT | GG | CC | GG | AA | TT | AA | AC | TT | |
| 2 | VUS | APOB | c.13621A>C | p.Lys4541Gln | GG | GG | TT | GG | AA | CC | TT | TT | TT | GG | CC | GG | AA | TT | AA | CC | CT | |
| 3 | negativo | NA | NA | NA | GG | AG | TT | GG | AG | CC | TT | TT | TT | GG | CC | GG | AA | TT | AA | AA | TT | |
| 4 | negativo | NA | NA | NA | GG | AG | TT | GG | AA | CC | CT | GT | TT | GG | CC | AG | AA | TT | AA | AC | TT | |
| 5 | negativo | NA | NA | NA | GG | GG | CT | GG | AA | CC | TT | TT | TT | GG | CC | AG | AA | TT | AA | AC | TT | |
| 6 | VUS | LDLR | c.2282C>T | p.Thr761Met | GG | AG | TT | GG | AG | CC | TT | GT | GT | GG | CC | GG | AA | TT | AA | CC | TT | |
| 7 | negativo | NA | NA | NA | GG | AG | TT | GG | GG | CC | CT | GG | TT | GG | CC | GG | AG | CT | AA | AA | TT | |
| 8 | negativo | NA | NA | NA | GG | GG | CT | GG | AG | CC | TT | TT | TT | GG | CC | GG | AA | TT | AA | AA | TT | |

**El estudio genético se limitó a pacientes con ≥ 4 puntos, sin que ninguno de los pacientes alcanzara la puntuación requerida para la confirmación de HF antes o después de este estudio. VUS, variante de significado incierto; HF, hipercolesterolemia familiar; SNPs, polimorfismos de nucleótido único.*

En el análisis univariado, la existencia de antecedentes personales de cardiopatía isquémica (*hazard ratio* [HR] = 3,4; intervalo de confianza del 95% [IC 95%] 1,2 – 9,9; $p = 0,02$), la dislipemia (HR 5,0; IC 95% 1,8 – 14,2; $p = 0,001$) y los antecedentes de abuso de cocaína (HR = 5,1; IC95% 1,7 - 15,1; $p = 0,001$) se relacionaron significativamente con el *endpoint* primario combinado. Dentro de los parámetros del ingreso inicial por IAM que se relacionaron con aparición de recurrencias en el seguimiento se objetivó la clase Killip (HR = 2,3 por cada aumento de 1 punto; IC95%, 1,4-3,7; $p < 0,001$), una revascularización no óptima definida como un flujo TIMI final < 3 (HR = 8,9; IC 95%, 2,9 - 26,9; $p = 0,01$), hemoglobina baja inicial (HR = 1,4 por cada descenso de 1 g/l; IC95%, 1,2-1,7; $p < 0,001$) y la administración de diurético durante el ingreso (HR = 4,2; IC95%, 1,5-11,3; $p < 0,002$).

Finalmente, se construyó un modelo clínico multivariado en el que se comprobaron todas las variables significativas identificadas en el análisis univariante. Únicamente la escala de riesgo GRACE y el colesterol LDL mantuvieron su capacidad predictiva en este modelo clínico final, que alcanzó un área bajo la curva ROC de 0,78 para la predicción del *endpoint* primario combinado a 3 años (Figura 5.5-A modelo clínico multivariante).

5.1.2 Prevalencia de SNPs, riesgo genético poligénico (GRS) y predicción de eventos recurrentes

Se evaluó la presencia de cada uno de los polimorfismos genéticos (SNPs) que formaban parte del panel que se escogió para elaborar la puntuación de riesgo genético – *genetic risk score* (GRS). La prevalencia de los SNPs fue comparada con las secuencias de exomas procedentes de una cohorte de más de 15.400 personas no emparentadas y de origen europeo no finlandés incluidas en la base de datos de genómica humana GnomAD (*Genome Aggregation Database*). En nuestra población de pacientes se observaba una prevalencia claramente mayor en 9 de los 11 alelos de riesgo analizados (Figura 5.2).

Se realizó análisis univariado para determinar el grado de asociación de cada uno de los 8 SNPs y 3 haplotipos analizados, objetivándose como ninguno de ellos, analizado individualmente, llegaba a asociarse de forma estadísticamente significativa con la aparición del *endpoint* primario (SCA de repetición, muerte CV o reingreso CV) una vez aplicada la estrategia de corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Análisis univariado entre cada SNP y el riesgo de recurrencias

| Variante genética | Gen próximo | HR | IC 95% | p |
|-------------------|--------------------------|------|-----------|------|
| rs17465637 | <i>MIA3</i> | 2,2 | 0,3-16,4 | 0,48 |
| rs6725887 | <i>WDR12</i> | 1,4 | 0,6-3,2 | 0,39 |
| rs9818870 | <i>MRAS</i> | 1,1 | 0,4-2,7 | 0,84 |
| rs10455872 | <i>SLC22A3-LPAL2-LPA</i> | 1,0 | 0,4-3,0 | 0,50 |
| rs12526453 | <i>PHACTR1</i> | 2,2 | 0,3-16,3 | 0,37 |
| rs1333049 | <i>CDKN2B-AS1</i> | 1,1 | 0,3-3,7 | 0,52 |
| rs501120 | <i>CXCL12</i> | 1,6 | 0,2-11,8 | 0,89 |
| rs9982601 | <i>KCNE2-SCL5A3</i> | 4,5 | 1,03-19,6 | 0,04 |
| rs10507391 | | 1,1 | 0,5-2,5 | 0,54 |
| rs17222842 | <i>ALOX5AP</i> | 21,0 | 0->1000 | 0,79 |
| rs9315051 | (Haplotipo) | 1,1 | 0,3-3,5 | 0,84 |

Análisis de Cox univariado para el estudio entre cada variante de riesgo alélico y el riesgo de eventos recurrentes. p < 0,0045 para significación estadística.

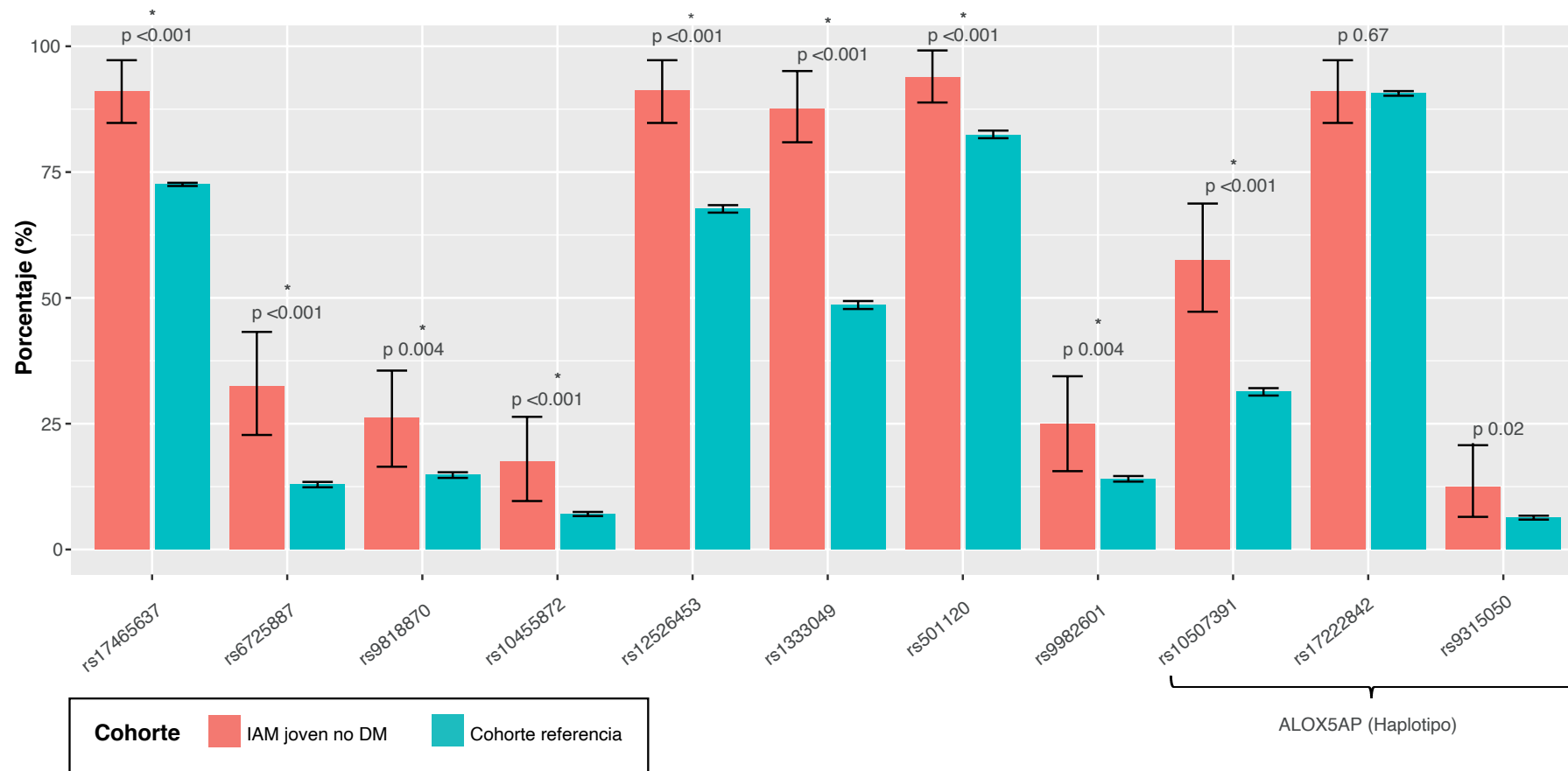


Figura 5.2 Prevalencia de alelos de riesgo en nuestro estudio y en una población de referencia. En rojo, nuestra cohorte de pacientes no diabéticos <55 años con IAM (n= 81); en azul, prevalencia de > 15.00 personas de origen europeo (no finlandés) incluidas en la base GnomAD (*Genome Aggregation Database*). $p < 0,0045$ para la significación estadística.

La puntuación de GRS obtenida por nuestra población fue de $7,2 \pm 1,7$. Al dividir la muestra en función de terciles de riesgo genético GRS, no se objetivaron diferencias entre grupos en la distribución de antecedentes o características clínicas del evento inicial (Tabla 5.1). Tal y como era esperable por el diseño del panel (selección de SNPs de la plataforma Gen inCode), el GRS no se relacionó con los factores de riesgo cardiovascular clásicos ni tampoco con la presencia de antecedentes de EAC precoz. El *score* de riesgo GRACE o la clase Killip determinados a la llegada del paciente tampoco fueron estadísticamente diferentes en función del tercil de riesgo genético.

En la Tabla 5.4 se muestra la constatación de la existencia de una relación significativa entre el GRS y la aparición de eventos cardiovasculares recurrentes en el modelo de regresión multivariado (en el que se incluyeron como variables la escala GRACE y el C-LDL).

Tabla 5.4 Análisis de regresión de Cox entre los terciles de riesgo genético GRS y el riesgo de eventos recurrentes

| Riesgo genético (GRS) | Análisis univariante | | Análisis multivariante | |
|--------------------------|----------------------|----------|------------------------|---|
| | HR (IC 95%) | <i>p</i> | | HR (IC 95%) <i>p</i> * |
| Bajo | 1 | | | 1 |
| Intermedio | 2,0 (0,7 – 5,8) | 0,21 | C-LDL ≤110 mg/dL | 1,0 (0,3 – 4,0) |
| | | | >110 mg/dL | 10,2 (1,1 – 100,3) 0,04 |
| Alto | 3,0 (1,0 - 9,2) | 0,05 | C-LDL ≤110 mg/dL | 0,3 (0,1 – 1,9) |
| | | | >110 mg/dL | 20,7 (2,4 – 181,0) 0,006 |

* En el modelo multivariante, además del GRS se incluyeron como covariables el *score* de riesgo GRACE, el C-LDL, así como la interacción entre los terciles de GRS y el C-LDL debido a la constatación de una fuerte interacción entre ambos ($p < 0,01$ para la interacción). C-LDL, colesterol LDL; GRACE, Global Registry of Acute Coronary Events; GRS, puntuación de riesgo genético; HR: hazard ratio; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

Las curvas de Kaplan-Meier mostraron una clara tendencia hacia una mayor presencia de eventos recurrentes en pacientes que presentaban un riesgo genético (GRS) intermedio o alto (Figura 5.3). Adicionalmente, se objetivó una fuerte interacción entre los valores de C-LDL y el tercil de GRS, de tal forma que aquellos pacientes con riesgo genético alto que presentaban valores elevados de C-LDL vieron multiplicado su riesgo de eventos recurrentes (Figura 5.4). Entre los pacientes con niveles de C-LDL basal ≥ 110 mg/dl ($\geq 2,8$ mmol/l), el HR de recurrencias fue de 10,2 (IC 95%, 1,1 - 100,3; $p=0,04$) para el grupo de riesgo intermedio y 20,7 (2,4 - 181,0; $p = 0,006$) para el grupo de alto riesgo, tomando como referencia al tercil de riesgo genético bajo. En contraste, el grupo de riesgo genético no aportó un valor predictivo relevante cuando los niveles de C-LDL fueron < 110 mg/dl ($< 2,8$ mmol/l). El grupo de riesgo genético tampoco fue predictor de respuesta a largo plazo al tratamiento hipolipemiante instaurado, sin que se objetivaran diferencias significativas en la reducción absoluta o relativa de C-LDL en la comparación entre grupos de GRS (Tabla 5.5).

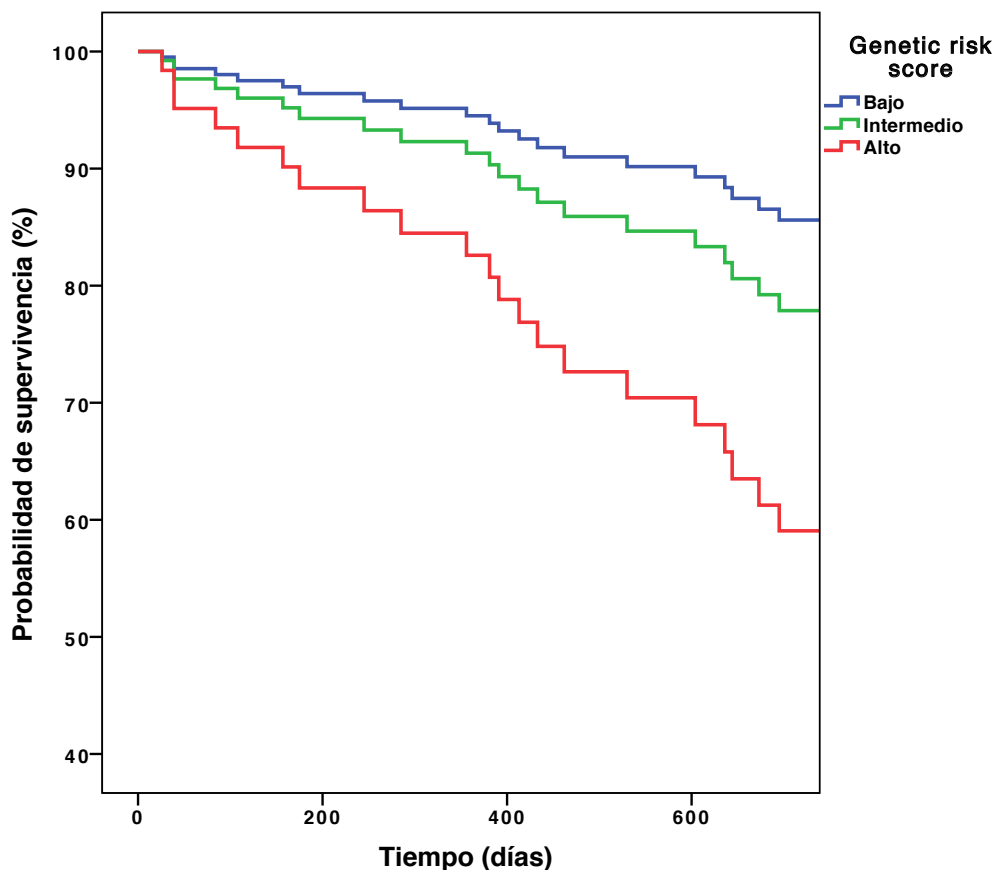


Figura 5.3 Eventos recurrentes en pacientes con IAM en función del riesgo genético. *Evaluación de la incidencia de eventos recurrentes en el seguimiento con el método de Kaplan-Meier en función del tercil de riesgo genético poligénico (GRS) dividido en terciles de riesgo bajo, intermedio y alto.*

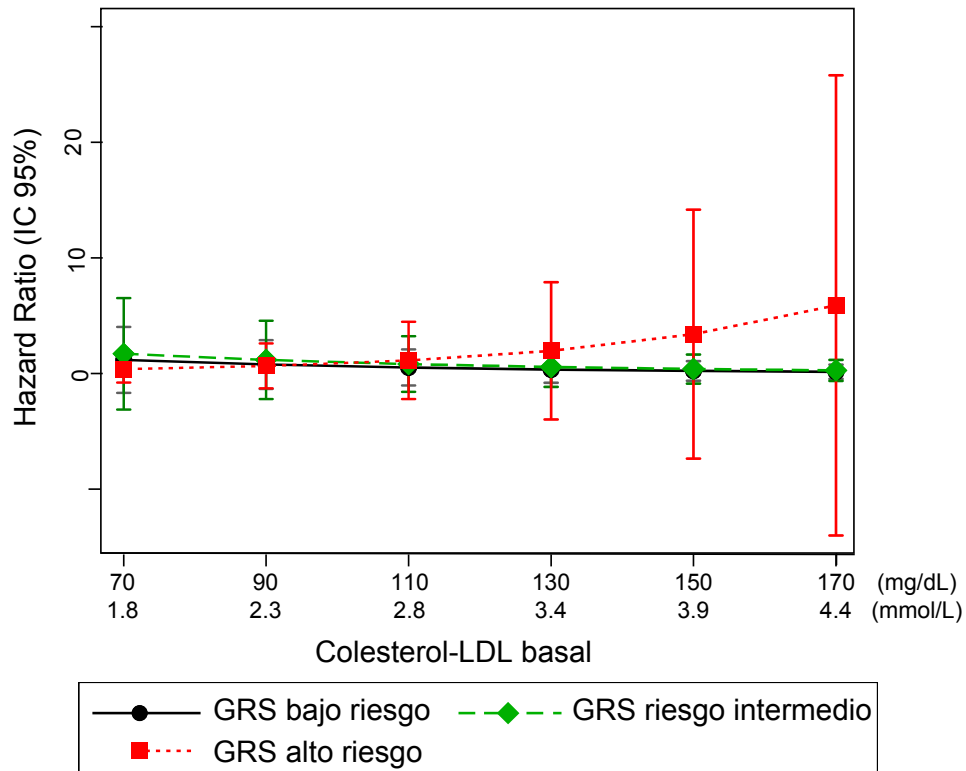


Figura 5.4 Análisis de interacción entre C-LDL y el GRS. Representación gráfica del análisis de interacción entre los niveles de colesterol LDL y el tercil de riesgo genético poligénico (GRS) objetivado en el análisis multivariante. Se indican las curvas estimadas de interacción de riesgo:

Para la categoría de riesgo GRS elevado:

$$HR_{(GRS\ alto)} = e^{(-4.493 + (0.027 * C-LDL))}$$

Para la categoría de riesgo GRS intermedio:

$$HR_{(GRS\ intermedio)} = e^{(0.226 - (0.019 * C-LDL))}$$

Tabla 5.5 Análisis del GRS en la evolución de los niveles de colesterol LDL a los 6 meses del IAM.

| Riesgo genético (GRS) | C-LDL basal (mg/dl) | p* | C-LDL 6 meses (mg/dl) | Cambio (mg/dl) | Cambio (%) | p† |
|-----------------------|---------------------|------|-----------------------|----------------|------------|------|
| Bajo | 126 ± 40 | 0.32 | 73 ± 19 | -56 ± 42 | -36±29% | 0.37 |
| Intermedio | 116 ± 44 | | 67 ± 20 | -48 ± 35 | -35±28% | |
| Alto | 113 ± 34 | | 69 ± 20 | -45 ± 41 | -32±30% | |

* Modelo de regresión ajustado por edad, sexo e IMC. Modelo de regresión ajustado por edad, sexo, IMC y C-LDL basal.

Un aspecto relevante fue que al incorporar el riesgo genético poligénico al mejor modelo multivariante obtenido con variables clínicas se objetivó una mejoría clara en el área bajo la curva (0,83 vs 0,78) (Figura 5.5-A). Este modelo clínico que se había obtenido previamente por regresión de Cox multivariante incluía el *score* GRACE y el C-LDL. El estadístico C del modelo clínico multivariante fue de 0,710, mientras que la incorporación del GRS lo aumentó a 0,796, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($\Delta C = 0,086$; IC 95%, 0,006 - 0,187). El *continuous Net Reclassification Index* - cNRI evaluado a los 3 años fue del 30% (IC 95%, 0 - 52%, $p = 0,05$) mientras que el *Integrated Discrimination Index* – IDI mostró un incremento de la capacidad predictiva (0,05) al añadir el GRS al modelo clínico multivariante (Figura 5.5-B y Tabla 5.6).

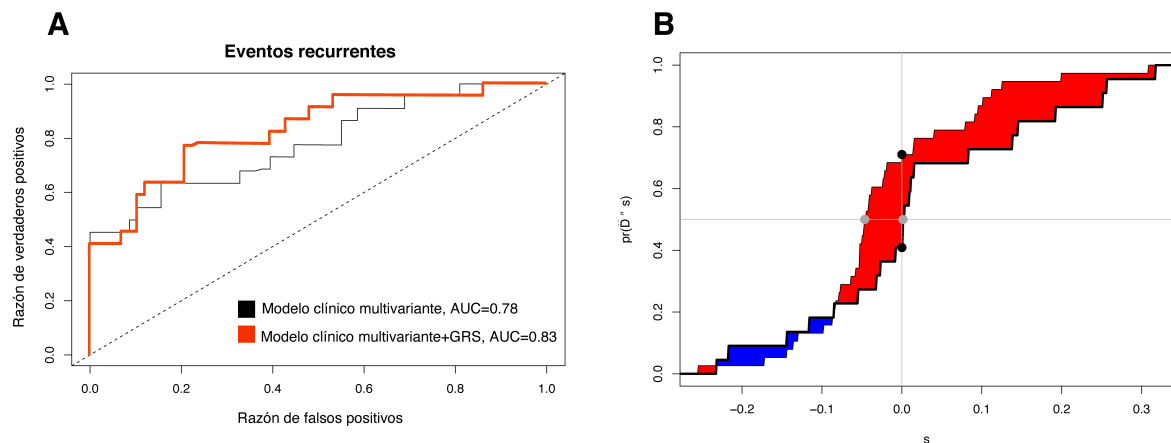


Figura 5.5 Mejoría de la capacidad predictiva del modelo al incorporar el riesgo genético GRS. **A:** Curvas ROC - receiver operating characteristic – para el modelo de regresión de Cox multivariante (en el que se incluye el score de riesgo GRACE y el C-LDL) en negro y para el mismo modelo multivariante con la incorporación del GRS en rojo. **B:** función de la distribución empírica de \hat{D} para $T^0 \leq t_0$ (línea fina sólida) para evaluar el cNRI y el IDI, tal y como fue descrito por Uno et al.¹³⁵ T^0 denota el momento de aparición del evento, mientras que t_0 refleja un momento concreto particular. Los pacientes que presentan un evento en t_0 se definen como casos (ej. $T^0 \leq t_0$) y aquellos que no lo presentan como controles (ej. $T^0 > t_0$). \hat{D} corresponde al cambio entre los 2 modelos y permite evaluar visualmente la mejora entre los 2 modelos predictivos (ver sección de métodos). AUC, área bajo la curva; C-LDL, colesterol LDL; cNRI, continuous net reclassification index o índice de reclasificación neta continua; IDI, integrated discrimination index o índice de mejora de la discriminación integrada.

Tabla 5.6. Valor incremental del GRS al añadirse al modelo multivariado

| | Estimación | IC 95% | <i>p</i> |
|---|------------|-------------|----------|
| Estadístico C - modelo de regresión de Cox multivariante | 0.710 | 0.62 – 0.79 | - |
| Estadístico C - modelo de regresión de Cox multivariante con GRS | 0.796 | 0.70 – 0.89 | - |
| Δ estadístico C | 0.086 | 0.01 – 0.19 | 0.04 |
| cNRI (%) | 30% | 0% - 52% | 0.05 |
| Índice IDI | 0.05 | 0.00– 0.16 | 0.049 |

La tabla muestra el estadístico C y los índices cNRI e IDI para comparar los 2 modelos de regresión de Cox multivariantes con vs sin GRS con datos de supervivencia censurados. cNRI, continuous net reclassification index o índice de reclasificación neto continuo; IDI, integrated discrimination improvement index o índice de mejora de la discriminación integrada; GRS, genetic risk score o puntuación riesgo genético.

Finalmente, las características basales de los pacientes fueron también analizadas de acuerdo a la aparición del *endpoint* primario (evento recurrente) en el seguimiento (Tabla 5.7), destacando de nuevo la ausencia de asociación *a priori* entre una historia familiar de EAC prematura y el riesgo de eventos en el seguimiento.

Tabla 5.7 Características basales de la población estudiada de acuerdo a la aparición del *endpoint* combinado primario (evento recurrente) en el seguimiento.

| | Total | No recurrencia | Recurrencia | <i>p</i> (χ^2 t-St) | <i>p</i> (Cox) | HR | IC 95% |
|---|------------|----------------|-------------|---------------------------|----------------|-------|-------------|
| <i>Características</i> | | | | | | | |
| N | 81 | 57 | 24 | | | | |
| GRS | 7.2 ± 1.7 | 7.1 ± 1.8 | 7.5 ± 1.7 | | | | |
| Edad, años | 48 ± 6 | 48 ± 6 | 48 ± 6 | 0.99 | 0.94 | 1.002 | 0.94-1.07 |
| Sexo masculino | 72 (89%) | 51 (90%) | 21 (88%) | 0.79 | 0.70 | 0.8 | 0.2-2.6 |
| IMC, kg/m ² | 28.6 ± 5.3 | 27.9 ± 5.2 | 30.2 ± 5.2 | 0.08 | 0.06 | 1.06 | 0.99-1.13 |
| IAM previo | 6 (7%) | 2 (4%) | 4 (17%) | 0.06 | 0.02 | 3.3 | 1.1-9.9 |
| Hipertensión | 31 (38%) | 21 (37%) | 10 (42%) | 0.68 | 0.72 | 1.2 | 0.5-2.6 |
| Dislipemia | 27 (33%) | 19 (33%) | 8 (33%) | 1.00 | 0.76 | 0.9 | 0.4-2.0 |
| Tabaquismo activo | 53 (65%) | 40 (70%) | 13 (54%) | 0.16 | 0.20 | 0.6 | 0.3-1.3 |
| Tóxicos (cocaína) | 5 (6%) | 1 (2%) | 4 (17%) | 0.03 | 0.001 | 5.1 | 1.7-15.1 |
| Antecedentes familiares EAC prematura | 23 (29%) | 18 (32%) | 5 (21%) | 0.30 | 0.31 | 0.6 | 0.2-1.6 |
| <i>Parámetros de laboratorio</i> | | | | | | | |
| Hemoglobina, g/l | 151 ± 16 | 155 ± 13 | 142 ± 19 | 0.001 | 0.001 | 0.7 | 0.6-0.9 |
| FG, ml/min/1.73 m ² . ^a | 97 ± 24 | 97 ± 19 | 99 ± 33 | 0.77 | 0.75 | 1.00 | 0.99-1.02 |
| Troponina I máxima, ng/ml | 48 ± 68 | 45 ± 72 | 55 ± 60 | 0.58 | 0.61 | 1.00 | 0.99-1.01 |
| Colesterol total, mg/dl | 188 ± 45 | 193 ± 39 | 175 ± 56 | 0.11 | 0.08 | 0.991 | 0.982-1.001 |
| C-LDL, mg/dl | 119 ± 41 | 124 ± 39 | 105 ± 43 | 0.05 | 0.03 | 0.989 | 0.978-0.999 |
| C-LDL ≥ 110 mg/dl | 43 (54%) | 34 (60%) | 9 (39%) | 0.10 | 0.08 | 0.47 | 0.2 – 1.1 |
| C-HDL, mg/dl | 38 ± 11 | 38 ± 9 | 40 ± 13 | 0.34 | 0.31 | 1.022 | 0.980-1.066 |
| Triglicéridos, mg/dl | 145 ± 96 | 142 ± 78 | 154 ± 130 | 0.61 | 0.54 | 1.00 | 0.997-1.005 |
| MMP-1 | 97 ± 12 | 96 ± 19 | 101 ± 9 | 0.10 | 0.09 | 1.036 | 0.994-1.080 |
| MMP-2 | 12 ± 8 | 11 ± 7 | 13 ± 11 | 0.41 | 0.24 | 1.031 | 0.980-1.085 |
| MMP-7 | 27 ± 3 | 27 ± 2 | 28 ± 4 | 0.18 | 0.04 | 1.149 | 1.001-1.319 |
| MMP-9 | 184 ± 77 | 182 ± 71 | 188 ± 91 | 0.76 | 0.69 | 1.001 | 0.996-1.007 |
| MMP-10 | 552 ± 431 | 500 ± 364 | 672 ± 548 | 0.11 | 0.03 | 1.001 | 1.000-1.001 |
| TIMP-1 | 190 ± 120 | 167 ± 75 | 241 ± 178 | 0.01 | 0.001 | 1.005 | 1.002-1.008 |
| <i>Datos del IAM inicial</i> | | | | | | | |
| IAM con elevación ST | 58 (72%) | 40 (70%) | 18 (75%) | 0.66 | 0.66 | 1.2 | 0.5-3.0 |
| Frecuencia cardíaca, lpm | 78 ± 19 | 77 ± 17 | 80 ± 23 | 0.47 | 0.34 | 1.011 | 0.988-1.034 |

| | Total | No recurrencia | Recurrencia | <i>p</i> (χ^2 t-St) | <i>p</i> (Cox) | HR | IC 95% |
|--|----------------|----------------|-----------------|---------------------------|----------------|-------|-------------|
| Revascularización exitosa ^b | 77 (95%) | 56 (98%) | 21 (88%) | 0.08 | 0.01 | 0.23 | 0.07-0.77 |
| Clase Killip \geq II | 11 (14%) | 5 (9%) | 6 (25%) | 0.05 | 0.01 | 3.1 | 1.2-7.9 |
| Puntuación de riesgo GRACE | 117 \pm 27 | 115 \pm 23 | 121 \pm 33 | 0.31 | 0.17 | 1.011 | 0.995-1.027 |
| <i>TC cardiaca (n =50)</i> | | | | | | | |
| Puntuación CAC | 117 \pm 27 | 286 \pm 660 | 198 \pm 253 | 0.65 | 0.70 | 1.000 | 0.998-1.001 |
| Percentil CAC > 90 ^c | 40% | 36% | 50% | 0.38 | 0.35 | 1.7 | 0.5-5.2 |
| Número de placas coronarias | 5.5 \pm 4.9 | 5.3 \pm 5.2 | 5.9 \pm 4.1 | 0.74 | 0.62 | 1.03 | 0.92-1.14 |
| Enfermedad multivaso ^d | 71% | 67% | 83% | 0.27 | 0.20 | 2.6 | 0.6-12.3 |
| <i>Hallazgos ecocardiográficos</i> | | | | | | | |
| FEVI en el momento del alta, | 57 \pm 11 | 58 \pm 11 | 55 \pm 12 | 0.29 | 0.20 | 0.978 | 0.944-1.013 |
| <i>Strain</i> longitudinal, % | 13.0 \pm 3.4 | 12.7 \pm 3.6 | 13.8 \pm 3.1 | 0.40 | 0.42 | 1.085 | 0.886-1.328 |
| <i>Strain</i> radial, % | 27.7 \pm 9.6 | 26.5 \pm 9.3 | 30.9 \pm 10.1 | 0.22 | 0.27 | 1.036 | 0.972-1.105 |
| <i>Strain</i> circunferencial, % | 26.7 \pm 6.1 | 25.8 \pm 6.3 | 28.8 \pm 5.1 | 0.19 | 0.26 | 1.064 | 0.953-1.189 |
| <i>Medicación en el momento del alta</i> | | | | | | | |
| β -bloqueantes | 70 (86%) | 51 (89%) | 19 (79%) | 0.21 | 0.08 | 0.4 | 0.2-1.1 |
| IECA/ARA-II | 61 (75%) | 45 (79%) | 16 (67%) | 0.24 | 0.21 | 0.6 | 0.3-1.3 |
| Diurético | 8 (10%) | 3 (5%) | 5 (21%) | 0.03 | 0.002 | 4.2 | 1.5-11.2 |
| Estatinas de alta potencia | 77 (95%) | 55 (97%) | 22 (92%) | 0.36 | 0.16 | 0.4 | 0.1-1.5 |

^a El filtrado glomerular fue estimado a partir de los valores de creatinina sérica según la ecuación de MDRD-4. ^b Se definió revascularización con éxito si se alcanzó un flujo TIMI 3 final. ^c El percentil de score de calcio para cada paciente se ajustó de acuerdo a su grupo étnico, edad, y sexo según lo descrito en el estudio MESA. ^d La enfermedad coronaria multivaso evaluada por TC fue determinada si se identificaba la presencia de estenosis >40% en una arteria adicional a la responsable del IAM. Los valores de las variables cuantitativas se muestran como media \pm desviación estándar (SD) para las variables continuas y como % para las categóricas. IMC, índice de masa corporal; EAC, enfermedad arterial coronaria; IAM, infarto agudo de miocardio; ICP, intervencionismo coronario percutáneo; CAC, calcio arterial coronario; FG, filtrado glomerular; C-LDL, colesterol-LDL; C-HDL, colesterol HDL; MMP, metaloproteinasa; TIMP-1, inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1; TC, tomografía computarizada; FEVI, fracción de eyección de ventrículo izquierdo; IECA, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; y ARA-II, antagonista de los receptores de angiotensina II.

Análisis del *endpoint* secundario en función del riesgo genético poligénico

Se completó un análisis exploratorio del *endpoint* secundario, definido como SCA recurrente o mortalidad CV. En el análisis univariado se objetivó que el antecedente personal de EAC (HR 6,0; IC 95% 1,9-18,9; $p = 0,002$) o de dislipemia (HR 2,5; IC 95% 1,0-6,4), $p = 0,049$) se asociaron de forma significativa con el *endpoint* secundario. De las variables clínicas presentes en el momento del evento índice también se asociaron con la aparición del *endpoint* secundario en el seguimiento la clase Killip (HR 2,1 por cada grado de incremento; IC 95% 1,2-3,6, $p = 0,009$), una revascularización no óptima definida como TIMI <3 (HR 8,5; IC95% 2,3-31,0; $p = 0,001$), la hemoglobina (HR 1,4 por cada descenso de 1g/l; IC95% 1,1-1,6; $p = 0,001$) o la necesidad de diuréticos durante el evento índice (HR 7,7; IC95% 2,6-22,8; $p = 0,002$).

Finalmente, se llevó a cabo un análisis multivariante siguiendo la misma metodología empleada con el objetivo primario (Tabla 5.8). De forma similar, se pudo objetivar cómo el riesgo de eventos se multiplicaba en los pacientes con riesgo genético alto y colesterol-LDL elevado. Al igual que en lo observado en el análisis principal, se mantuvo la fuerte interacción entre el tercil de riesgo genético GRS y los niveles de colesterol LDL.

Tabla 5.8 Análisis univariante y multivariante para el objetivo secundario utilizando regresión de Cox

| Riesgo genético (GRS) | Análisis univariante | | Análisis multivariante | | |
|-----------------------|----------------------|----------|------------------------|---------------------------|--------------|
| | HR (IC 95%) | <i>p</i> | | HR (IC 95%) | <i>p</i> * |
| Bajo | 1 | | | 1 | |
| Intermedio | 1,2 (0,3 – 4,5) | 0,7 | C-LDL ≤110 mg/dL | 0,7 (0,1 – 3,8) | |
| | | | >110 mg/dL | 4,2 (0,3 – 57,6) | 0,28 |
| Alto | 2,1 (0,6 – 8,0) | 0,2 | C-LDL ≤110 mg/dL | 0,2 (0,1 – 2,4) | |
| | | | >110 mg/dL | 12,3 (1,3 – 117,3) | 0,029 |

* En el modelo multivariante además del GRS se incluyeron como covariables el score de riesgo GRACE, el C-LDL, así como la interacción entre los terciles de GRS y el C-LDL. Se documentó interacción entre GRS y los niveles de colesterol LDL ($p < 0,01$). Se definió el *endpoint* secundario como SCA recurrente o muerte CV. C-LDL, colesterol LDL; GRACE, Global Registry of Acute Coronary Events; GRS, puntuación de riesgo genético; HR: hazard ratio; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

5.1.3 Tomografía computarizada cardiaca y riesgo de recurrencias

Se realizó TC de arterias coronarias a 50 de los pacientes incluidos (62%), excluyéndose aquellos con contraindicaciones absolutas o relativas según se ha indicado. La puntuación de calcio coronario (CAC) o *score* Agatston fue elevada (117 ± 27), con tan solo 30% de los pacientes libres de calcificaciones coronarias. Un 14% de los pacientes presentaron calcificación coronaria extensa, definida como puntuación CAC >400 . La calidad técnica de los estudios fue considerada como óptima y solo un 9% de las angiografías fueron etiquetadas como no diagnósticas en alguno de sus segmentos. Todas las lesiones que generaban estenosis $>25\%$ fueron cuantificadas, de lo que se derivó un total de 5,5 lesiones por paciente (mediana 4). En relación con las características de la placa, tan solo un 29% de ellas fueron consideradas como placas “blandas” o fibrosas/lipídicas, mientras que la mayoría de las lesiones presentaban cierto grado de calcificación, incluyendo tanto placas mixtas (26%) como puramente calcificadas o placas “duras” (45%).

No detectamos la existencia de asociación entre el perfil de riesgo genético GRS y la puntuación de *score* CAC, el número de placas identificadas por TC o la existencia de enfermedad multivaso definida por cateterismo.

Se objetivó una tendencia interesante entre la enfermedad multivaso evaluada por TC y la aparición de eventos recurrentes (HR 2,1; IC95% 0,9-4,8; p 0,07), sin que se detectara con otras variables como el *score* CAC por TC o la enfermedad multivaso por evaluación invasiva.

5.1.4 Biomarcadores de remodelado de la matriz extracelular

El estudio de marcadores pronósticos fue completado con el análisis de los niveles de metaloproteasas (MMPs) como marcadores proteolíticos de matriz extracelular. Se analizaron los niveles de MMPs en nuestra población de pacientes jóvenes con IAM, estudiando la aparición de eventuales diferencias en función del nivel de riesgo genético poligénico, la presencia de factores de riesgo cardiovascular, mayor daño ventricular o la extensión de la afectación coronaria aterosclerótica.

Los pacientes con un IAM más grave, determinado como una clase Killip-Kimbal \geq I, mostraron valores más elevados de MMP-7 y de TIMP-1 en la fase aguda del IAM frente a aquellos con IAM Killip I ($30,1 \pm 5,1$ vs $26,6 \pm 1,9$; p 0,04 y 322 ± 221 vs 166

± 72 ; $p 0,04$, respectivamente) (Tabla 5.9). Adicionalmente, hubo una correlación negativa significativa entre la fracción de eyección de VI y los niveles de MMP-7, MMP-10 y TIMP-1 (Figura 5.6). Sin embargo, no encontramos asociación entre los niveles de MMPs y otras variables clínicas, una mayor afectación aterosclerótica objetivada por TC (enfermedad multivaso o *score* CAC) o con el nivel de riesgo genético poligénico por GRS. En el modelo de regresión de Cox multivariante ninguna de las MMPs analizadas demostraron ser predictores de eventos recurrentes en el seguimiento.

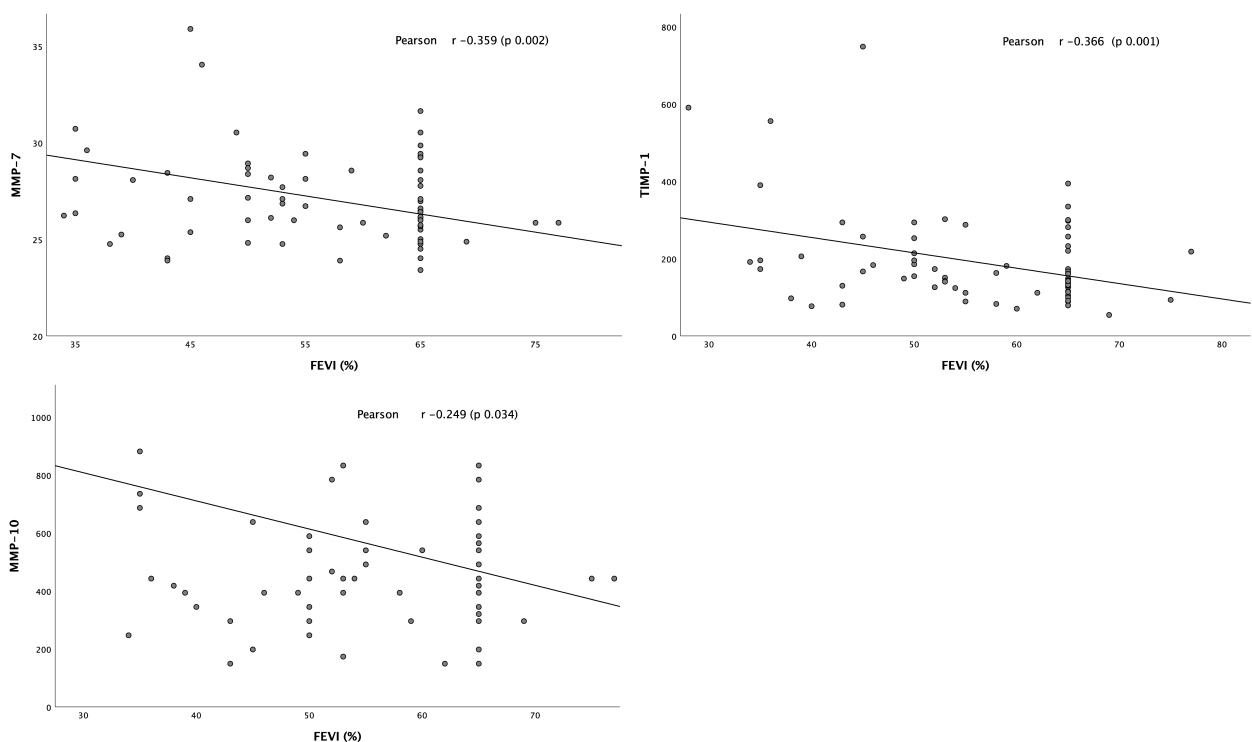


Figura 5.6. Correlación entre niveles de metaloproteinasas y fracción de eyección de VI.

Representación gráfica de los valores de MMP-7, MMP-10 y TIMP-1 y el valor de la FEVI determinada al alta hospitalaria en los 81 pacientes no diabéticos <55 años con IAM de nuestra cohorte. Se objetivó una correlación lineal negativa débil pero estadísticamente significativa entre cada una de las metaloproteinasas y la FEVI. MMP, metaloproteinasas de la matriz extracelular; TIMP-1, Inhibidor tisular de la metaloproteasa 1 de la matriz; FEVI, fracción de eyección de ventrículo izquierdo.

Tabla 5.9. Niveles de metaloproteinasas en pacientes jóvenes con IAM en función de características clínicas. N = 81.

| | MMP-1 (ng/ml) | | MMP-2 (ng/ml) | | MMP-7 (ng/ml) | | MMP-9 (ng/ml) | | MMP-10 (pg/ml) | | TIMP-1 (ng/ml) | | | | | | | |
|----------------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|-------------------|----------|-------------------|---------|-----------|-----------|----|-----------|-----------|------|
| | P | | P | | P | | P | | P | | P | | | | | | | |
| | Varones | Mujeres | Varones | Mujeres | Varones | Mujeres | Varones | Mujeres | Varones | Mujeres | Varones | Mujeres | | | | | | |
| Sexo | 98 ± 12 | 93 ± 13 | NS | 12 ± 9 | 12 ± 6 | NS | 27 ± 2 | 29 ± 6 | NS | 182 ± 76 | 201 ± 89 | NS | 525 ± 378 | 773 ± 734 | NS | 184 ± 114 | 238 ± 165 | NS |
| Tabaquismo | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | |
| | 97 ± 13 | 98 ± 9 | NS | 12 ± 8 | 11 ± 9 | NS | 27 ± 2 | 28 ± 4 | NS | 182 ± 76 | 188 ± 81 | NS | 556 ± 424 | 542 ± 456 | NS | 176 ± 110 | 219 ± 138 | NS |
| Hipertensión | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | |
| | 97 ± 11 | 98 ± 12 | NS | 12 ± 10 | 11 ± 7 | NS | 28 ± 3 | 27 ± 3 | NS | 180 ± 79 | 187 ± 76 | NS | 500 ± 258 | 584 ± 510 | NS | 212 ± 150 | 176 ± 96 | NS |
| Antecedente de EAC | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | |
| | 106 ± 11 | 97 ± 12 | NS | 14 ± 13 | 12 ± 8 | NS | 27 ± 3 | 27 ± 3 | NS | 257 ± 58 | 179 ± 68 | NS | 638 ± 137 | 546 ± 445 | NS | 164 ± 64 | 192 ± 123 | NS |
| Tipo IAM | SCACEST | SCASEST | | SCACEST | SCASEST | | SCACEST | SCASEST | | SCACEST | SCASEST | | SCACEST | SCASEST | | SCACEST | SCASEST | |
| | 97 ± 12 | 99 ± 11 | NS | 13 ± 9 | 10 ± 8 | NS | 27 ± 3 | 27 ± 3 | NS | 188 ± 69 | 174 ± 95 | NS | 569 ± 494 | 511 ± 213 | NS | 197 ± 131 | 172 ± 88 | NS |
| Clase Killip | ≥ II | I | | ≥ II | I | | ≥ II | I | | ≥ II | I | | ≥ II | I | | ≥ II | I | |
| | 101 ± 11 | 97 ± 12 | NS | 16 ± 12 | 11 ± 7 | NS | 30 ± 5 | 27 ± 2 | 0,04 | 176 ± 44 | 186 ± 82 | NS | 731 ± 676 | 520 ± 371 | NS | 322 ± 221 | 166 ± 72 | 0,04 |
| IAM evolucionado | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | |
| | 101 ± 12 | 97 ± 12 | NS | 16 ± 13 | 11 ± 7 | NS | 30 ± 6 | 27 ± 2 | NS | 154 ± 60 | 186 ± 78 | NS | 898 ± 678 | 501 ± 371 | NS | 311 ± 253 | 174 ± 78 | NS |
| Enfermedad multivaso | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | | Sí | No | |
| | 100 ± 9 | 96 ± 13 | NS | 10 ± 9 | 13 ± 8 | NS | 28 ± 3 | 27 ± 3 | NS | 187 ± 94 | 183 ± 69 | NS | 527 ± 238 | 563 ± 493 | NS | 206 ± 154 | 183 ± 103 | NS |
| Riesgo genético | Alto | Bajo | | Alto | Bajo | | Alto | Bajo | | Alto | Bajo | | Alto | Bajo | | Alto | Bajo | |
| GRS | 99 ± 11 | 94 ± 12 | NS | 14 ± 9 | 12 ± 8 | NS | 27 ± 2 | 28 ± 3 | NS | 191 ± 81 | 181 ± 69 | NS | 450 ± 158 | 595 ± 590 | NS | 188 ± 123 | 183 ± 108 | NS |

MMP, metaloproteinasas de la matriz; EAC, enfermedad arterial coronaria; IAM, infarto agudo de miocardio; GRS, genetic risk score o puntuación de riesgo genético.

Niveles de MMPs en IAM frente a otras cohortes

Se analizaron los valores de MMPs en nuestra población de pacientes <55 años no diabéticos frente a una cohorte de 400 pacientes sin enfermedad cardiovascular establecida, estudiados por presentar factores de riesgo cardiovascular. Así, de los 4 parámetros analizados en esta población en prevención primaria se objetivaron diferencias significativas en todos ellos. Sorprendentemente, los valores de MMP-10 y de TIMP-1 objetivados en la población de pacientes con IAM fue inferior a la determinada en la cohorte en prevención primaria (Tabla 5.10).

Tabla 5.10 Análisis comparativo entre pacientes con IAM y pacientes sin enfermedad CV

| | Cohorte IAM <55 años no DM (n = 81) | Grupo control (n = 400) | p |
|---------------------------------|---|------------------------------------|----------|
| <i>Características clínicas</i> | | | |
| Edad (años) | 47,6 ± 6,0 | 54,3 ± 11,4 | <0,001 |
| Sexo masculino, n (%) | 72 (88,9) | 311 (77,8) | 0,02 |
| Tabaquismo, n (%) | 53 (65,4) | 118 (29,5) | <0,001 |
| IMC (kg/m ²) | 28,6 ± 5,3 | 27,9 ± 4,3 | NS |
| Hipertensión, n (%) | 31 (38,3) | 203 (50,7) | 0,04 |
| PAS (mmHg) | 137,4 ± 29,9 | 130,2 ± 21,0 | 0,01 |
| Dislipemia, n (%) | 27 (33,3) | 324 (81) | <0,001 |
| Colesterol total (mg/dl) | 188,1 ± 45,1 | 222 ± 41,5 | <0,001 |
| C-LDL (mg/dl) | 118,6 ± 40,6 | 149,5 ± 38,1 | <0,001 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 145,5 ± 95,6 | 102,7 ± 67,6 | <0,001 |
| <i>Metaloproteinasas</i> | | | |
| MMP-1 (ng/ml) | 97,4 ± 11,8 | 4,2 ± 0,7 | <0,001 |
| MMP-9 (ng/ml) | 184,1 ± 77,0 | 17,4 ± 19,3 | <0,001 |
| MMP-10 (pg/ml) | 552,2 ± 431,0 | 694,8 ± 335,7 | <0,001 |
| TIMP-1 (ng/ml) | 189,8 ± 120,0 | 390,0 ± 50,3 | <0,001 |

IMC, índice de masa corporal; PAS, presión arterial sistólica; C-LDL, colesterol LDL; MMP, metaloproteinasa de la matriz; TIMP-1, inhibidor tisular de la metaloproteinasa de la matriz tipo 1.

Se realizó un análisis comparativo frente a una cohorte de 187 pacientes con enfermedad arterial periférica analizados en las mismas condiciones e instalaciones del CIMA, y en la que se había documentado la presencia de niveles más elevados de MMP-10 y menores de TIMP-1.¹³³ En la Tabla 5.11 se muestran las características clínicas de ambos grupos, destacando una edad más avanzada y mayor prevalencia de factores de riesgo cardiovascular clásico en la cohorte de pacientes con enfermedad arterial periférica que en la de pacientes jóvenes no diabéticos con IAM. Los pacientes con arteriopatía periférica mostraron niveles más elevados de MMP-10 y de la ratio MMP-10/TIMP-1, aunque no de los valores de TIMP-1, principal inhibidor de MMP-10.

Tabla 5.11 Análisis comparativo entre pacientes con IAM y con enfermedad arterial periférica.

| | IAM jóvenes (n = 81) | EAP (n = 187) | P |
|---------------------------------|-------------------------|------------------|--------|
| <i>Características clínicas</i> | | | |
| Edad (años) | 47.6 ± 6.0 | 71 ± 11 | <0,001 |
| Sexo masculino, n (%) | 72 (88,9) | 165 (88) | NS |
| Tabaquismo, n (%) | 53 (65,4) | 150 (80) | 0.01 |
| Diabetes, n (%) | 0 (0) | 86 (46) | <0,001 |
| Hipertensión, n (%) | 31 (38,3) | 135 (72) | <0,001 |
| Dislipemia, n (%) | 27 (33,3) | 99 (53) | <0,01 |
| c-LDL (mg/dl) | 118,6 ± 40,6 | 100 ± 37 | <0,001 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 145,5 ± 95,6 | 142 ± 83 | NS |
| <i>Metaloproteinasas</i> | | | |
| MMP-10 (pg/ml) | 552 ± 431 | 946 ± 478 | <0,01 |
| TIMP-1 (ng/ml) | 190 ± 120 | 235 ± 110 | <0,01 |

EAP, enfermedad arterial periférica; IAM, infarto agudo de miocardio; C-LDL, colesterol LDL; MMP, metaloproteinasa de la matriz; TIMP-1; inhibidor tisular de la metaloproteinasa de la matriz tipo 1.

También se analizaron los valores de nuestra población frente a una cohorte de 50 pacientes con ictus isquémico grave (NIHSS ≥ 16) por oclusión de la arteria cerebral media y de los que se disponían los valores de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1. La distribución muestral de las principales variables del grupo de pacientes con ictus isquémico no siguió una distribución normal, por lo que se ha utilizado la mediana y rango intercuartílico para su descripción, y el test de Wilcoxon-Mann-Whitney para comparaciones entre grupos. En la tabla 5.12 podemos observar cómo los pacientes jóvenes con IAM presentaron valores de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1 significativamente inferiores a los que presentaron aquellos pacientes con ictus.

Tabla 5.12. Comparación de metaloproteinasas IAM frente a ictus isquémico

| | IAM jóvenes (n = 81) | Ictus (n= 50) | <i>p</i> |
|------------------------------------|-------------------------|------------------|----------|
| Edad (años) – mediana (p 25-75) | 49 (44-52) | 60 (51–69) | < 0,001 |
| Sexo masculino, n (%) | 72 (89 %) | 33 (66 %) | 0,001 |
| MMP-9 (ng/ml) - mediana (p 25-75) | 182 (136-241) | 749 (488–1200) | < 0,001 |
| MMP-10 (pg/ml) - mediana (p 25-75) | 443 (345-614) | 1027 (556–1409) | < 0,001 |
| TIMP-1 (ng/ml) - mediana (p 25-75) | 161 (115-219) | 261 (199–387) | < 0,001 |

IAM, infarto agudo de miocardio; MMP, metaloproteinasa de la matriz; TIMP-1, inhibidor tisular de la metaloproteinasa de la matriz tipo 1.

5.2 miRNAs como biomarcadores pronósticos en pacientes con IAM

5.2.1 Características basales de la población

Se reclutaron 311 pacientes consecutivos hospitalizados por IAM tipo 1 en el marco del subestudio 2. En la Tabla 5.13 se detallan las principales características clínicas. La mediana de edad fue de 55 años, el 81% fueron varones y la forma de presentación predominante fue el IAMCEST en el 65% de los pacientes. Se logró revascularización exitosa (TIMI 3 final) en un 94% de los casos, alcanzándose seguimiento a 1 año en el 90% de los pacientes.

Durante un seguimiento medio de 2,1 años, 43 pacientes (13,8%) presentaron el *endpoint* primario del subestudio, incluyendo 24 pacientes (7,7%) con hospitalizaciones por insuficiencia cardiaca y 25 (8,0%) muertes de causa cardiovascular. El tiempo medio hasta el primer evento primario fue de 6 meses. En el momento del último seguimiento un 25% de los pacientes presentaban una clase funcional NHYA grado II o superior.

5.2.2 miRNAs séricos con expresión diferencial en pacientes con IAM

Se realizó un estudio de rastreo inicial de 752 miRNAs en un grupo acotado de muestras de pacientes con IAM y controles sanos, según se detalla en la sección de Métodos. De este análisis se obtuvieron una serie de 49 miRNAs que presentaron un patrón de expresión diferencial IAM vs controles.

A partir de este punto se siguió una aproximación secuencial para seleccionar los miRNAs con mayor grado de diferenciación y potencial regulador específico. De forma progresiva se analizaron:

- 1) el C_t alcanzado y el grado de significación estadística en el C_t de la comparación entre grupos
- 2) análisis de su función biológica determinada con herramientas bioinformáticas.

El resultado de esta selección fueron 14 miRNAs candidatos para su validación posterior en la cohorte global de 311 pacientes con IAM y 30 controles sanos ajustados por edad y sexo.

Tabla 5.13 Características clínicas de la cohorte global de pacientes con IAM (n= 311) en función de la aparición del evento primario en el seguimiento.

| | Total (n=311) | No evento (n=268) | Evento (n=43) | P |
|--|------------------|----------------------|------------------|--------|
| <i>Evento índice</i> | | | | |
| Edad (años) ^a | 55 (48, 71) | 54 (47, 68) | 77 (55, 85) | <0,001 |
| Sexo masculino (%) | 81 | 82 | 79 | 0,382 |
| Hipertensión (%) | 57 | 55 | 72 | 0,018 |
| Diabetes (%) | 26 | 23 | 42 | 0,005 |
| Dislipemia (%) | 51 | 50 | 58 | 0,458 |
| Tabaquismo activo (%) | 40 | 43 | 26 | 0,390 |
| IMC, (kg/m ²) ^a | 27,3 (25, 30) | 27,5 (25, 30) | 26,7 (24, 29) | 0,540 |
| IAM con elevación segmento ST | 65 | 66 | 61 | 0,908 |
| Revascularización exitosa (%) | 94 | 95 | 84 | 0,002 |
| Clase Killip ≥ II (%) | 23 | 15 | 67 | <0,001 |
| Score riesgo GRACE ^a | 133 (114, 171) | 129 (111, 159) | 196 (144, 238) | <0,001 |
| Índice comorbilidad de Charlson ^a | 4 (2, 5) | 3 (2, 5) | 6 (5, 7) | <0,001 |
| <i>Parámetros de laboratorio</i> | | | | |
| NT-proBNP (pg/ml) ^a | 903 (363, 2415) | 617 (215, | 5701 (2115, | <0,001 |
| Troponina-I (a las 24h, en ng/ml) ^a | 8,8 (1, 38) | 6,9 (1, 32) | 29,1 (6, 88) | <0,001 |
| FG, (ml/min/1,73 m ²) ^a | 91 (73, 103) | 93 (78, 104) | 52 (33, 78) | <0,001 |
| Colesterol total (mg/dl) ^a | 177 (147, 206) | 179 (148, 209) | 158 (137, 192) | 0,028 |
| Triglicéridos (mg/dl) ^a | 122 (88, 169) | 122 (88, 169) | 123 (89, 169) | 0,999 |
| <i>Hallazgos ecocardiográficos</i> | | | | |
| FEVI al alta (%) ^a | 57 (46, 65) | 58 (48, 65) | 43 (36, 58) | <0,001 |
| FEVI <50% (%) | 33 | 27 | 67 | <0,001 |
| <i>Medicación al alta hospitalaria</i> | | | | |
| β-bloqueantes (%) | 83 | 83 | 78 | 0,556 |
| IECAs o ARA-II (%) | 82 | 82 | 83 | 0,967 |
| ARM (%) | 37 | 10 | 33 | <0,001 |
| Estatina de alta intensidad (%) | 97 | 97 | 92 | 0,025 |

^a mediana (rango intercuartílico). IMC, índice de masa corporal; FG, filtrado glomerular; FEVI, fracción de eyección de ventrículo izquierdo; IECAs, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA-II, antagonistas receptores angiotensina II; ARM, antagonistas receptores de mineralocorticoides.

El estudio de validación en la cohorte global confirmó que 11 de los 14 miRNAs presentaron niveles de expresión diferencial en pacientes con IAM frente a población general (Tabla 5.14). Estos miRNAs alcanzaron la significación estadística en la comparación entre grupos, indicativa de que los valores obtenidos en los 311 pacientes con IAM difieren de los 30 controles sanos analizados, respaldando la adecuación del proceso inicial de selección de miRNAs de interés.

Tabla 5.14. Niveles de expresión de los miRNAs en el estudio de validación. Panel con los 14 miRNAs seleccionados y sus niveles de expresión en 311 pacientes con IAM y 30 controles sanos pareados.

| ID miRNA ID | Número referencia | Pacientes IAM (n = 311) | Controles sanos (n = 30) | p |
|------------------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------|--------|
| hsa-miR-20a-5p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000075 | -1.69 (-2.31; -1.14) | -1.23 (-1.64; -0.62) | 0.004 |
| hsa-miR-21-5p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000076 | -2.35 (-3.12; -1.77) | -1.58 (-1.99; -1.18) | <0.001 |
| hsa-miR-23a-3p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000078 | -2.32 (-2.92; -1.69) | -1.07 (-1.56; -0.86) | <0.001 |
| hsa-miR-27b-3p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000419 | 0.24 (-0.51; 1.48) | 0.96 (0.55; 1.10) | <0.001 |
| hsa-miR-30b-5p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000420 | 1.87 (1.36; 2.23) | 1.76 (1.64; 1.88) | 0.013 |
| hsa-miR-93-5p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000093 | -0.60 (-1.22; 0.03) | -0.35 (-0.70; 0.37) | 0.173 |
| hsa-miR-106b-5p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000680 | 0.69 (0.16; 1.22) | 1.18 (0.93; 1.89) | 0.001 |
| hsa-miR-107 ΔC_T (IQR) | MIMAT0000104 | 2.66 (1.77; 3.44) | 2.46 (2.32; 2.59) | 0.004 |
| hsa-miR-122-5p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000421 | 2.52 (1.08; 4.07) | 3.69 (3.08; 4.83) | 0.001 |
| hsa-miR-144-3p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000436 | -0.23 (-1.31; 0.47) | -0.60 (-0.90; 0.26) | 0.087 |
| hsa-miR-148b-3p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000759 | 1.85 (0.92; 3.30) | 2.69 (2.40; 2.95) | <0.001 |
| hsa-miR-210-3p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000267 | 4.1 (3.39; 4.78) | 5.51 (4.94; 5.85) | <0.001 |
| hsa-miR-221-3p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000278 | 0.63 (-0.02; 1.30) | 1.92 (1.71; 2.24) | <0.001 |
| hsa-let-7a-5p ΔC_T (IQR) | MIMAT0000062 | 2.1 (1.58; 2.70) | 2.40 (2.05; 2.48) | 0.081 |

Se muestran los valores como datos normalizados con los valores absolutos de la tasa de cambio (log of fold change). IAM, infarto agudo de miocardio; IQR, rango intercuartílico.

Se vio una clara asociación entre la gravedad del IAM y los niveles de expresión de la mayor parte de los 14 miRNAs seleccionados (Figura 5.7). Así, los niveles de expresión de miR-20a-5p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-27b-3p, miR-30b-5p, miR-106b-5p, miR-107, miR-148b-3p, miR-210-3p y miR-221-3p se incrementaron significativamente en aquellos pacientes con que presentaban una clase Killip superior, un mayor *score* de riesgo GRACE, niveles de troponina I o NT-proBNP más elevados o una peor fracción de eyección de VI.

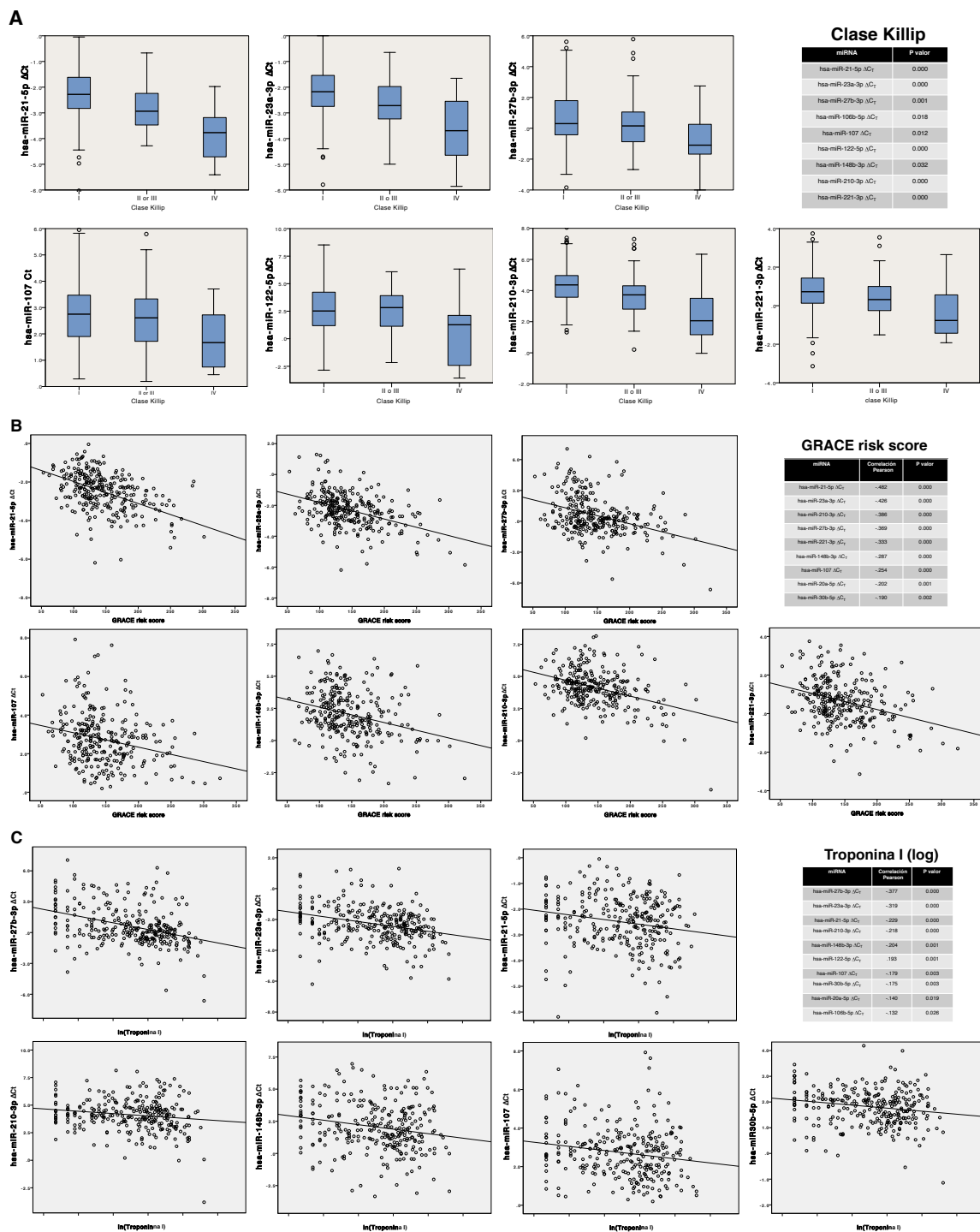


Figura 5.7. Correlación entre miRNAs y gravedad del IAM. Análisis estadístico en la cohorte de validación global de 311 pacientes con IAM relacionando los niveles de expresión de los miRNAs más representativos con: a) clase Killip-Kimbal; b) score de riesgo GRACE determinado al ingreso; c) Troponina-I a las 24h del ingreso (logaritmo). Los miRNAs aparecen expresados como ΔC_T (el intervalo del punto de corte). Solo se muestran aquellos miRNAs con nivel de asociación estadísticamente significativo.

También se detectó una asociación significativa entre los niveles de expresión de varios de estos miRNAs y parámetros subrogados de insuficiencia cardiaca como se puede observar en la Figura 5.8, destacando particularmente miR-210-3p, miR-23a-3p y miR-21-5p por la intensidad y número de asociaciones en las que fueron detectados. 7 de los 14 miRNAs mostraron correlación estadísticamente significativa con los valores de BNP (miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-27b-3p, miR-107, miR-148b-3p y miR-210-3p), mientras que los 11 miRNAs que se expresaron de forma diferencial en IAM presentaron diferentes grados de correlación con la FEVI, alcanzando la significación estadística.

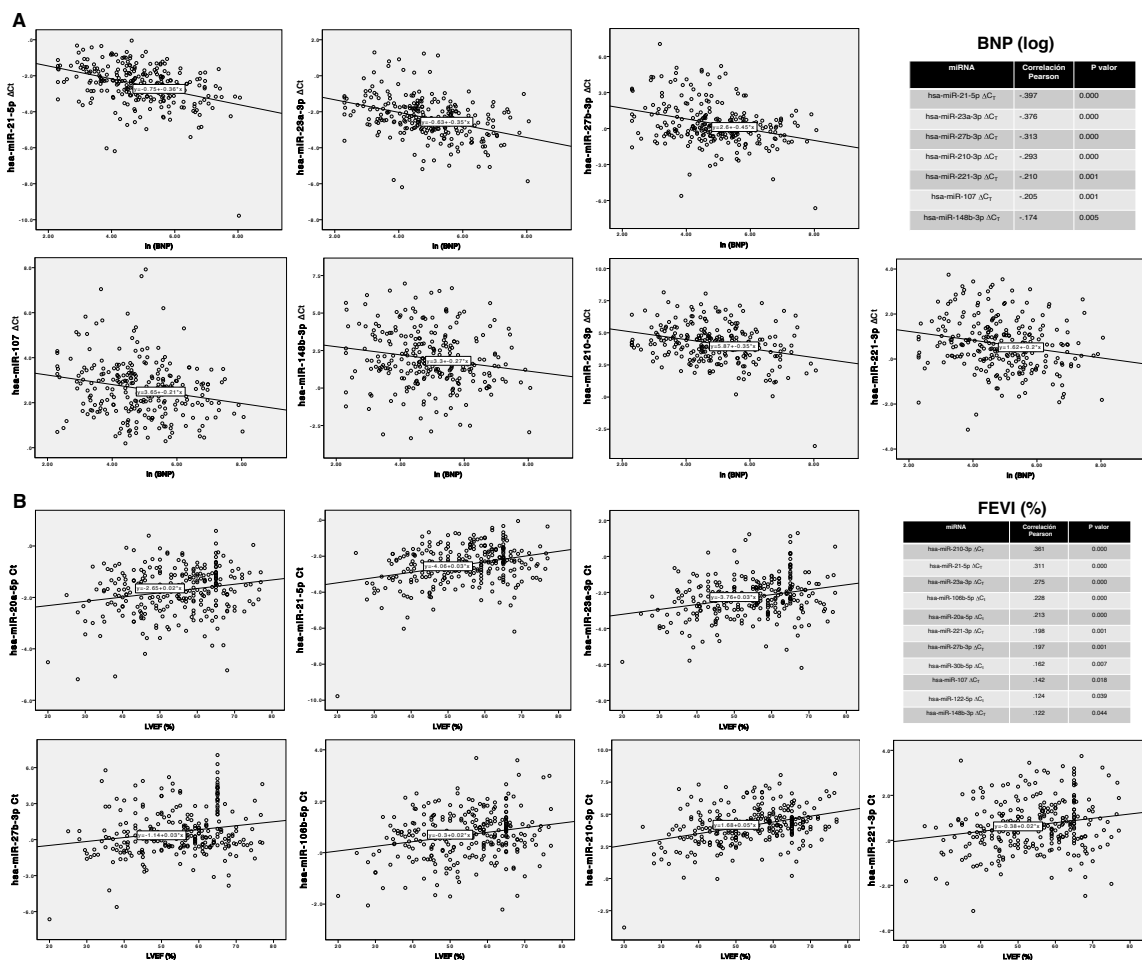


Figura 5.8 Correlación entre miRNAs y parámetros subrogados de insuficiencia cardiaca. *Análisis estadístico en la cohorte de validación global de 311 pacientes con IAM relacionando los niveles de expresión de los miRNAs más representativos con: a) niveles de BNP (logaritmo); b) FEVI al alta hospitalaria. FEVI, fracción de eyección de ventrículo izquierdo.*

Se realizó un análisis específico para evaluar la posible redundancia en la información proporcionada por algunos de los miRNAs seleccionados. Para ello, se calcularon los coeficientes de correlación parcial de Spearman para rangos – *partial Spearman rank correlation coefficients* – (R) para todas las combinaciones posibles de los 14 miRNAs en estudio una vez normalizados (Tabla 5.15). Los resultados que se muestran presentan un bajo nivel de correlación entre la mayor parte de las parejas de miRNAs, lo que indica un bajo nivel de colinearidad entre estos miRNAs o lo que es lo mismo, que cada uno de ellos aporta información específica e independiente de otros.

Tabla 5.15. Coeficientes de correlación parcial de Spearman para rangos de los 14 miRNAs estudiados

| | miR-20a-5p ΔCt | miR-21-5p ΔCt | miR-23a-3p ΔCt | miR-27b-3p ΔCt | miR-30b-5p ΔCt | miR-93-5p ΔCt | miR-106b- 5p ΔCt | miR-107 ΔCt | miR-122-5p ΔCt | miR-144-3p ΔCt | miR-148b- 3p ΔCt | miR-210-3p ΔCt | miR-221-3p ΔCt | let-7a-5p ΔCt |
|------------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------|----------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| miR-20a-5p ΔCt | - | 0.31** | -0.18** | 0.03** | 0.20** | 0.51** | 0.54** | -0.32** | -0.12 | 0.08** | -0.10** | -0.01** | 0.01** | -0.03** |
| miR-21-5p ΔCt | | - | 0.46** | -0.20** | -0.24** | 0.06** | -0.28** | 0.20** | 0.32** | 0.12** | 0.31** | 0.21** | 0.00** | 0.26** |
| miR-23a-3p ΔCt | | | - | 0.59** | 0.18** | 0.22** | 0.28** | -0.42** | -0.15 | -0.26** | -0.25** | -0.04** | 0.36** | -0.16** |
| miR-27b-3p ΔCt | | | | - | 0.10** | 0.11** | -0.23** | 0.43** | 0.06** | 0.30** | 0.23** | -0.20** | 0.14** | -0.01** |
| miR-30b-5p ΔCt | | | | | - | -0.08** | -0.06** | 0.17** | 0.07 | -0.01** | 0.34** | -0.10** | -0.04** | 0.37** |
| miR-93-5p ΔCt | | | | | | - | 0.01** | 0.15** | 0.10 | 0.17** | 0.23** | -0.12** | -0.23** | -0.22** |
| miR-106b-5p ΔCt | | | | | | | - | 0.41** | 0.15 | 0.10** | 0.15** | 0.27** | -0.09** | 0.14** |
| miR-107 ΔCt | | | | | | | | - | -0.19** | 0.02** | -0.09** | 0.13** | 0.08** | -0.01 |
| miR-122-5p ΔCt | | | | | | | | | - | -0.20** | -0.49** | 0.24** | 0.03** | 0.15 |
| miR-144-3p ΔCt | | | | | | | | | | - | -0.11** | 0.18** | -0.08 | -0.01 |
| miR-148b-3p ΔCt | | | | | | | | | | | - | 0.19** | 0.07** | 0.11** |
| miR-210-3p ΔCt | | | | | | | | | | | | - | 0.37** | -0.20** |
| miR-221-3p ΔCt | | | | | | | | | | | | | - | 0.38** |
| let-7a-5p ΔCt | | | | | | | | | | | | | | - |

** *p* valor < 0,001. La correlación es débil para la mayor parte de las parejas de miRNAs analizadas, reflejando un bajo nivel de colinearidad. Las únicas parejas con correlaciones >0,5 fueron entre miR-23 & miR-27, miR-20 & miR-106 y miR-20 & miR-93.

5.2.3 Valor pronóstico de los miRNAs – análisis del objetivo primario

6 miRNAs fueron capaces de predecir de forma fiable la aparición del *endpoint* primario del subestudio incluso tras aplicar exigentes modelos de ajuste: miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-27b-3p, miR-122-5p, miR-210-3p y miR-221-3p (Figura 5.9-A, Tabla 5.16 y Figura 5.10). Los análisis de regresión de Cox realizados ajustados por edad y sexo destacaron en particular a miR-210-3p (HR 2.65 por cada incremento en 1 SD, $P < 0.001$), miR-23a-3p (HR 2.11 por cada incremento en 1 SD, $P < 0.001$), miR-221-3p (HR 2.03 por cada incremento en 1 SD, $P < 0.001$) y miR-21-5p (HR 2.0 por cada incremento en 1 SD, $P < 0.001$) por su mayor precisión en el diagnóstico del *endpoint* combinado de hospitalización por IC o muerte CV.

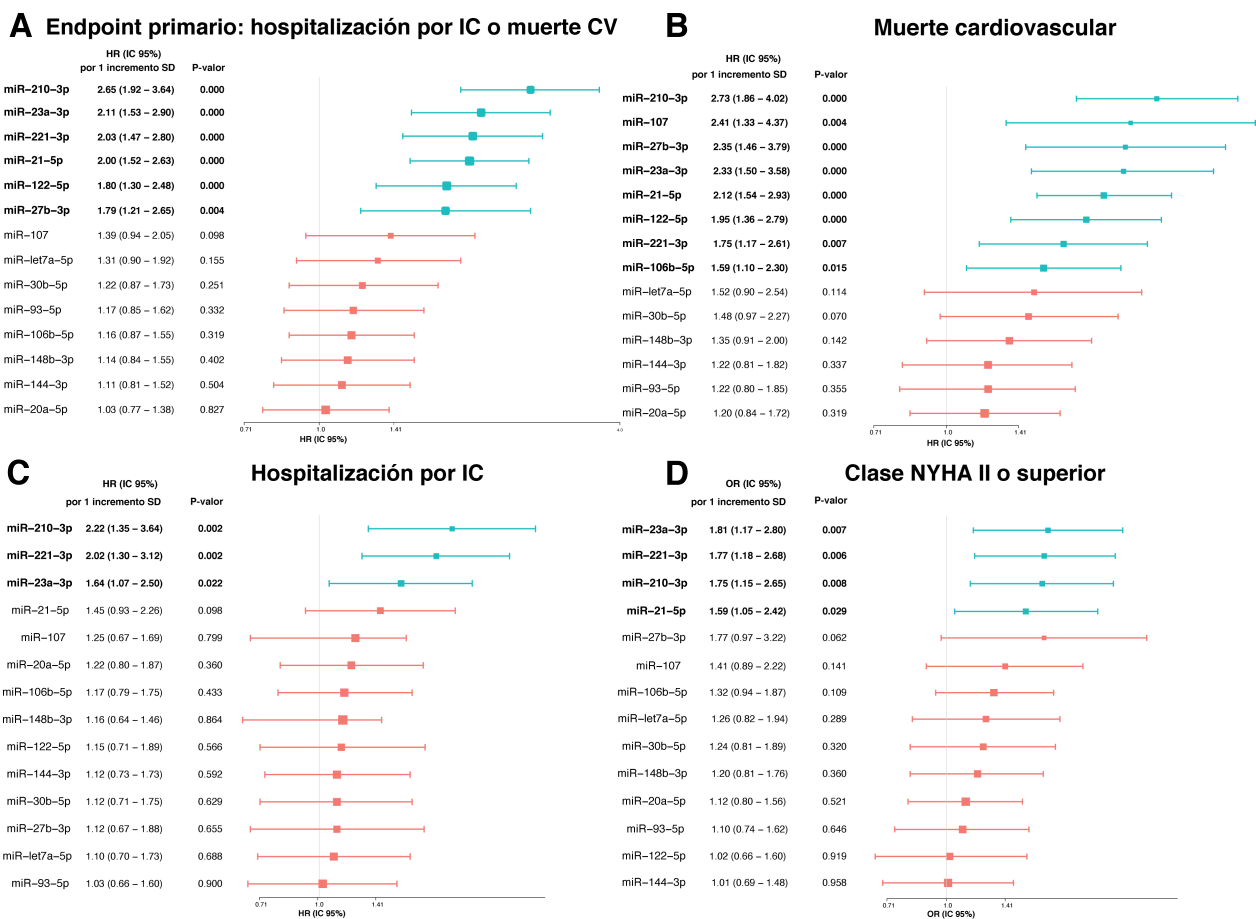


Figura 5.9. Resumen del valor pronóstico de los miRNAs para los objetivos primario y secundarios. Datos procedentes del análisis de supervivencia mediante regresión de Cox multivariante, ajustado por edad y sexo. Las cajas indican el Hazard ratio (HR) y las líneas el intervalo de confianza al 95% (IC 95%).

Tabla 5.16 Análisis del objetivo primario: asociación de miRNAs con la aparición del *endpoint* primario en el seguimiento (hospitalización por IC o muerte CV).

| | HR por incremento 1 SD (IC 95%) | <i>p</i> | Estadístico C (IC 95%) | Incremento estadístico C (IC 95%) |
|--------------------------------|------------------------------------|----------|---------------------------|--------------------------------------|
| miR-20a-5p^a | 1.03 (0.77 - 1.38) | 0.827 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.07 (0.80 - 1.43) | 0.656 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.04 (0.77 - 1.40) | 0.815 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.26 (0.94 - 1.70) | 0.117 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.01 (0.78 - 1.32) | 0.920 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.01 (0.77 - 1.33) | 0.933 | n/a | n/a |
| miR-21-5p^a | 2.00 (1.52 - 2.63) | 0.000 | 0.7828 (0.7141 - 0.8517) | 0.0517 (0.0011 - 0.1024) |
| Modelo 2 | 2.07 (1.56 - 2.74) | 0.000 | 0.7928 (0.7147 - 0.8709) | 0.0565 (0.0022 - 0.1109) |
| Modelo 3 | 1.87 (1.41 - 2.48) | 0.000 | 0.7962 (0.7258 - 0.8666) | 0.0376 (0 - 0.0807) |
| Modelo 4 | 1.82 (1.36 - 2.46) | 0.000 | 0.8403 (0.7618 - 0.9188) | 0.0143 (0 - 0.0393) |
| Modelo 5 | 1.52 (1.13 - 2.04) | 0.005 | 0.8110 (0.7389 - 0.8830) | 0.0181 (0 - 0.0458) |
| Modelo 6 | 1.42 (1.05 - 1.93) | 0.022 | 0.8316 (0.7677 - 0.8954) | 0.0104 (0 - 0.0296) |
| miR-23a-3p^a | 2.11 (1.53 - 2.90) | 0.000 | 0.7909 (0.7246 - 0.8572) | 0.0598 (0.0135 - 0.1061) |
| Modelo 2 | 2.17 (1.56 - 3.01) | 0.000 | 0.7991 (0.7233 - 0.8749) | 0.0628 (0.0111 - 0.1145) |
| Modelo 3 | 2.00 (1.43 - 2.79) | 0.000 | 0.7969 (0.7323 - 0.8616) | 0.0383 (0 - 0.0827) |
| Modelo 4 | 1.89 (1.33 - 2.70) | 0.000 | 0.8529 (0.7934 - 0.9124) | 0.0270 (0 - 0.0584) |
| Modelo 5 | 1.59 (1.16 - 2.18) | 0.004 | 0.8233 (0.7619 - 0.8848) | 0.0305 (0 - 0.0653) |
| Modelo 6 | 1.50 (1.09 - 2.06) | 0.013 | 0.8410 (0.7842 - 0.8978) | 0.0198 (0 - 0.0501) |
| miR-27b-3p^a | 1.79 (1.21 - 2.65) | 0.004 | 0.7562 (0.6612 - 0.8512) | 0.0251 (0 - 0.0663) |
| Modelo 2 | 1.75 (1.18 - 2.59) | 0.005 | 0.7618 (0.6618 - 0.8618) | 0.0255 (0 - 0.0637) |
| Modelo 3 | 1.52 (1.01 - 2.28) | 0.043 | 0.7648 (0.6781 - 0.8514) | 0.0061 (0 - 0.0358) |
| Modelo 4 | 2.20 (1.39 - 3.48) | 0.001 | 0.8300 (0.7555 - 0.9044) | 0.0040 (0 - 0.0437) |
| Modelo 5 | 1.37 (0.97 - 1.95) | 0.075 | 0.8024 (0.7192 - 0.8857) | 0.0096 (0 - 0.0355) |
| Modelo 6 | 1.40 (0.99 - 2.00) | 0.059 | 0.8252 (0.7482 - 0.9021) | 0.0040 (0 - 0.0274) |
| miR-30b-5p^a | 1.22 (0.87 - 1.73) | 0.251 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.25 (0.87 - 1.77) | 0.226 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.18 (0.84 - 1.67) | 0.342 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.46 (1.00 - 2.15) | 0.051 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.16 (0.85 - 1.58) | 0.351 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.13 (0.81 - 1.57) | 0.471 | n/a | n/a |
| miR-106b-5p^a | 1.16 (0.87 - 1.55) | 0.319 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.19 (0.88 - 1.61) | 0.271 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.17 (0.87 - 1.56) | 0.294 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.39 (1.01 - 1.91) | 0.043 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.09 (0.85 - 1.41) | 0.491 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.06 (0.80 - 1.40) | 0.694 | n/a | n/a |

| | HR por incremento 1 SD (IC 95%) | <i>p</i> | Estadístico C (IC 95%) | Incremento estadístico C (IC 95%) |
|--------------------------------|------------------------------------|----------|---------------------------|--------------------------------------|
| miR-107^a | 1.39 (0.94 – 2.05) | 0.098 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.46 (0.97 – 2.18) | 0.067 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.45 (0.98 – 2.15) | 0.062 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.48 (0.93 – 2.37) | 0.097 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.42 (0.96 – 2.10) | 0.081 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.28 (0.87 – 1.90) | 0.213 | n/a | n/a |
| miR-122-5p^a | 1.80 (1.30 – 2.48) | 0.000 | 0.7427 (0.6528 - 0.8325) | 0.0115 (0 - 0.0579) |
| Modelo 2 | 1.81 (1.30 – 2.51) | 0.000 | 0.7589 (0.6655 - 0.8523) | 0.0226 (0 - 0.0722) |
| Modelo 3 | 1.70 (1.26 – 2.30) | 0.001 | 0.7747 (0.6888 - 0.8606) | 0.0161 (0 - 0.0544) |
| Modelo 4 | 1.64 (1.21 – 2.22) | 0.001 | 0.8236 (0.7474 - 0.8998) | 0.0024 (0 - 0.0186) |
| Modelo 5 | 1.31 (0.96 – 1.78) | 0.087 | 0.7880 (0.7096 - 0.8663) | 0.0049 (0 - 0.0105) |
| Modelo 6 | 1.30 (0.94 – 1.79) | 0.116 | 0.8181 (0.7437 - 0.8925) | 0.0031 (0 - 0.0107) |
| miR-148b-3p^a | 1.14 (0.84 – 1.55) | 0.402 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.15 (0.85 – 1.56) | 0.363 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.16 (0.85 – 1.57) | 0.345 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.42 (0.98 – 2.06) | 0.650 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.03 (0.77 – 1.38) | 0.845 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.15 (0.83 – 1.60) | 0.409 | n/a | n/a |
| miR-210-3p^a | 2.65 (1.92 – 3.64) | 0.000 | 0.8026 (0.7319 - 0.8732) | 0.0714 (0.0068 - 0.1360) |
| Modelo 2 | 2.70 (1.95 – 3.73) | 0.000 | 0.8050 (0.7194 - 0.8906) | 0.0687 (0 - 0.1420) |
| Modelo 3 | 2.42 (1.75 – 3.34) | 0.000 | 0.8079 (0.7322 - 0.8835) | 0.0492 (0 - 0.1074) |
| Modelo 4 | 2.21 (1.57 – 3.12) | 0.000 | 0.8443 (0.7742 - 0.9143) | 0.0183 (0 - 0.0511) |
| Modelo 5 | 1.88 (1.32 – 2.67) | 0.000 | 0.8257 (0.7579 - 0.8935) | 0.0329 (0 - 0.0793) |
| Modelo 6 | 1.84 (1.30 – 2.59) | 0.001 | 0.8432 (0.7743 - 0.9121) | 0.0220 (0 - 0.0562) |
| miR-221-3p^a | 2.03 (1.47 – 2.80) | 0.000 | 0.7809 (0.7091 - 0.8526) | 0.0497 (0 - 0.1039) |
| Modelo 2 | 2.04 (1.45 – 2.86) | 0.000 | 0.7864 (0.7046 - 0.8682) | 0.0501 (0 - 0.1115) |
| Modelo 3 | 1.92 (1.40 – 2.64) | 0.000 | 0.7991 (0.7227 - 0.8756) | 0.0405 (0 - 0.0879) |
| Modelo 4 | 2.13 (1.45 – 3.13) | 0.000 | 0.8663 (0.8107 - 0.9219) | 0.0403 (0 - 0.0852) |
| Modelo 5 | 1.70 (1.23 – 2.37) | 0.001 | 0.8231 (0.7598 - 0.8864) | 0.0303 (0 - 0.0683) |
| Modelo 6 | 1.58 (1.14 – 2.19) | 0.006 | 0.8498 (0.7896 - 0.9101) | 0.0286 (0 - 0.0632) |

Datos procedentes de la cohorte global de validación con 311 pacientes con IAM. El HR muestra el incremento del riesgo de desarrollar el endpoint primario en los distintos modelos de regresión de Cox multivariante planteados: ^a modelo basal) ajustado por edad y sexo; modelo 2) ajustado por edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, hábito tabáquico, diabetes, dislipemia y antecedentes previos de IAM); modelo 3) ajustado por edad, sexo y troponina I; modelo 4) ajustado por edad, sexo y NT-proBNP; modelo 5) ajustado por edad, sexo y el score de riesgo GRACE; modelo 6) ajustado por FEVI y clase Killip. HR, hazard ratio; SD, desviación estándar; IC, intervalo de confianza; n/a, no aplicable.

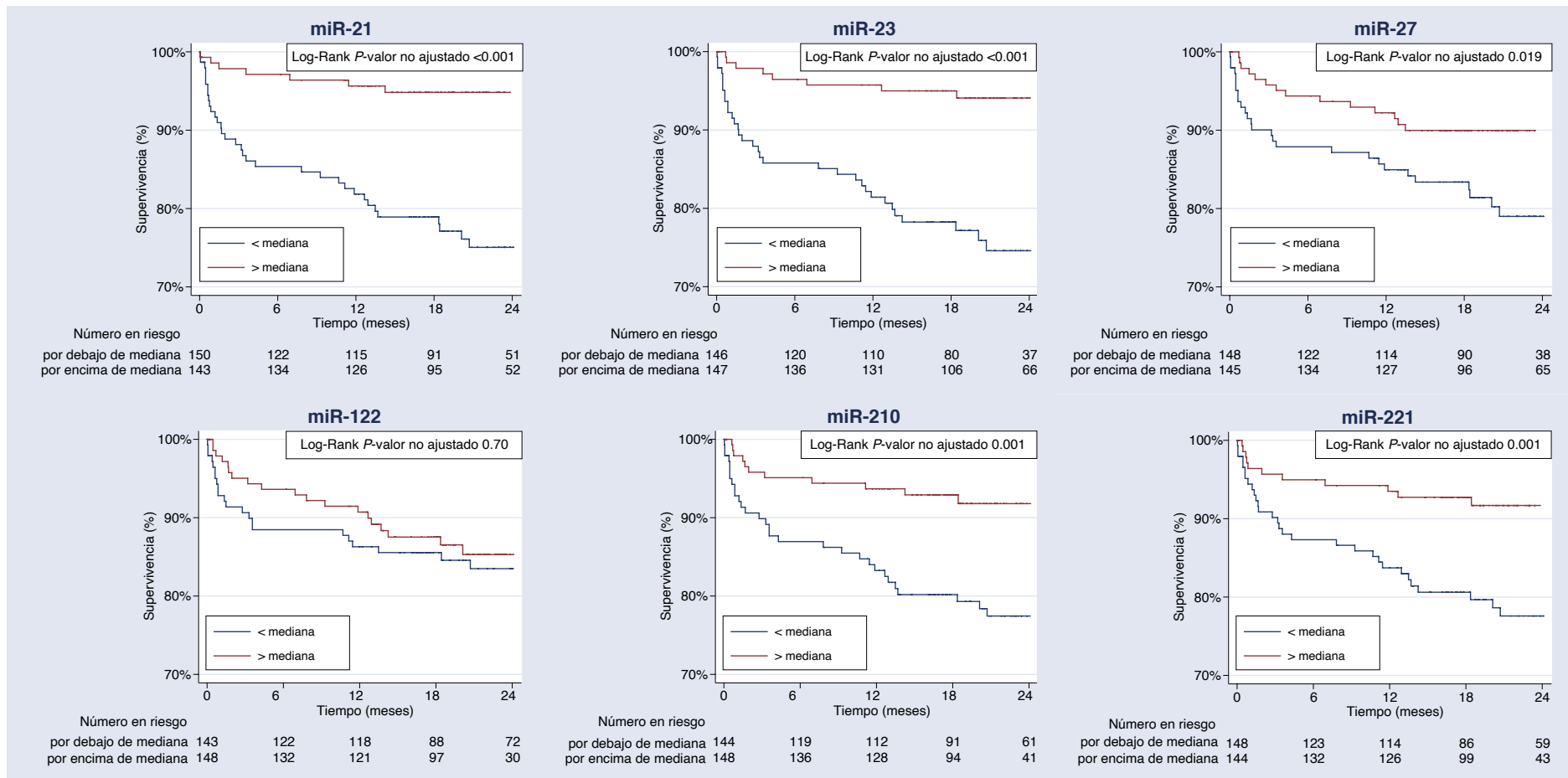


Figura 5.10 Incidencia del *endpoint* combinado de hospitalización por IC o muerte CV en función del valor de miRNAs. Se muestran las curvas de Kaplan-Meier para los grupos de pacientes separados por la mediana de los miRs-21, -23, -27, -122, -210 y -221.

Cuando los miRNAs con capacidad predictiva fueron evaluados individualmente, cada uno de ellos por separado fue capaz de alcanzar valores elevados del estadístico C, mostrándose en la Figura 5.11 su valor estudiado a los 2 años (media de seguimiento del estudio). En su análisis combinado, visualizado en la Figura 5.12, se objetivó cómo el valor pronóstico obtenido al incorporar la combinación de los 3 miRNAs más prominentes (miR-210-3p, miR-23a-3p y miR-221-3p) al modelo multivariante de Cox basal condujo a una mejoría franca en el área bajo la curva (AUC) obtenida en comparación con este mismo modelo sin los miRNAs: 0.86 vs. 0.77, $p < 0.001$.

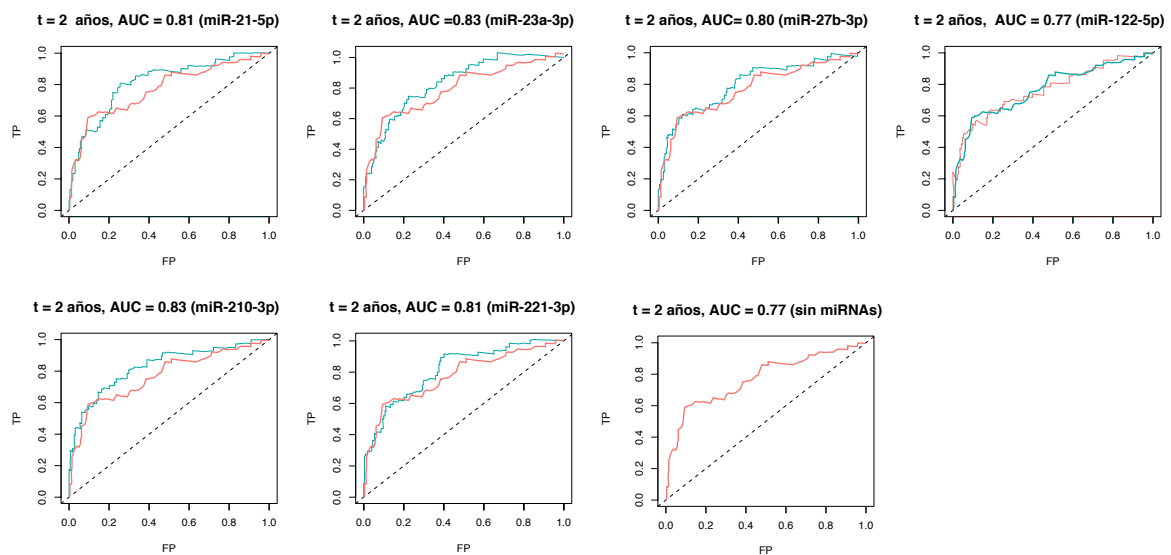


Figura 5.11. Curvas ROC para la predicción del evento primario a los 2 años. Se muestran las curvas receiver operating characteristic (ROC); en rojo del modelo multivariante basal ajustado por edad y sexo; en azul el obtenido al añadir cada uno de los miRNAs de forma individual. AUC, área bajo la curva.

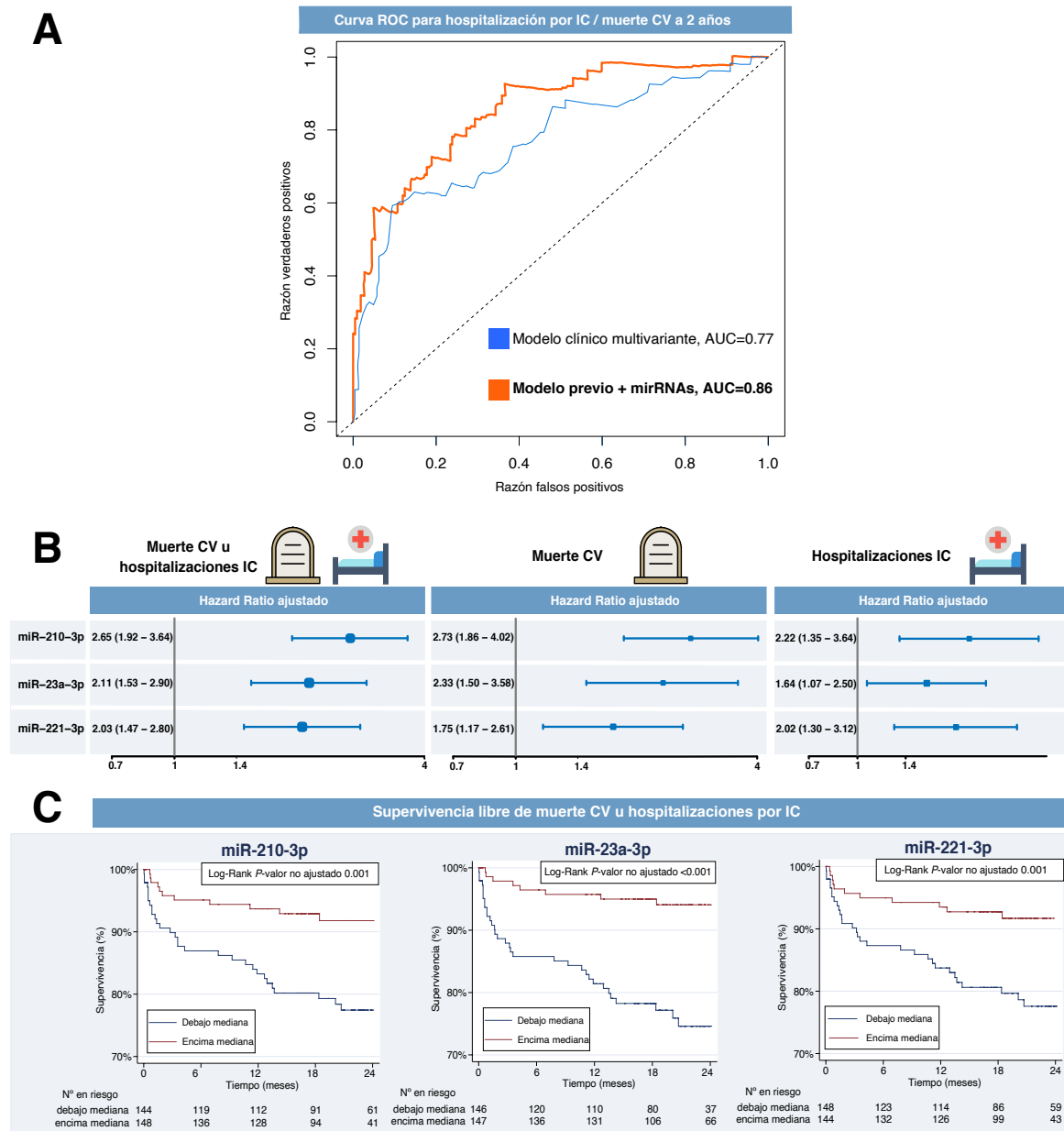


Figura 5.12. Reclasificación pronóstica obtenida al añadir miR-210-3p, miR-23a-3p y miR-221-3p para la predicción de hospitalización por IC o muerte CV en pacientes con IAM. A. Curva ROC para el modelo clínico multivariante sin miRNAs (azul) y con miRNAs - miR-210-3p, miR-23a-3p y miR-221-3p - (rojo), obtenido mediante regresión de Cox multivariante. B. Diagramas de Forest-Plot para los endpoints del estudio, procedentes del modelo multivariante ajustado por edad y sexo. C. Incidencia del endpoint combinado de muerte cardiovascular (CV) u hospitalización por insuficiencia cardiaca (IC), obtenido con el método de Kaplan-Meier.

Se finalizó el análisis del grado de mejora en el rendimiento de la evaluación pronóstica obtenida con los miRNAs mediante el cálculo del índice de reclasificación neta continua – cNRI –, que fue de 34.8% (95% CI, 5.8-57.4%, $p=0.015$). El índice de mejora de discriminación integrada – IDI– también mostró una mejoría sustancial ($P < 0.001$) de la capacidad predictiva cuando estos 3 miRNAs eran incorporados al modelo clínico multivariante (Figura 5.13).

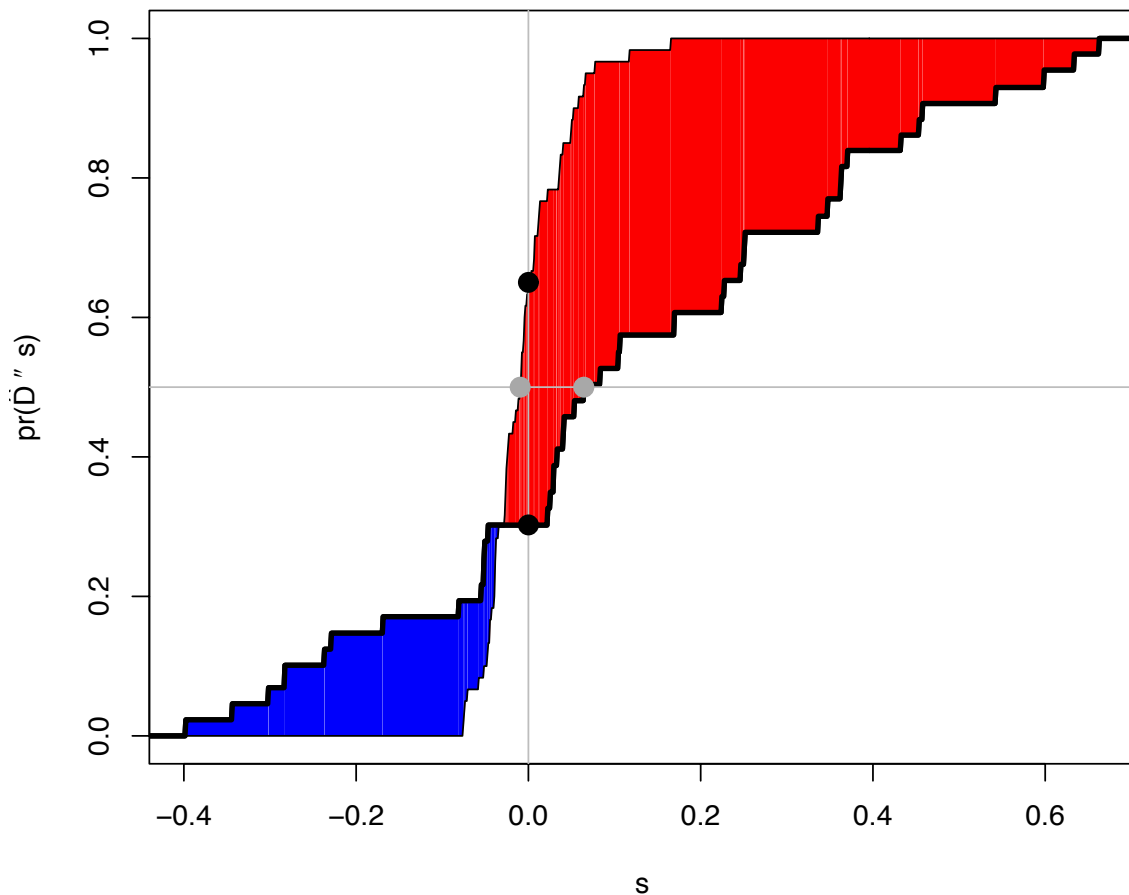


Figura 5.13. Evaluación de la mejoría predictiva con la incorporación de miR-210-3p, miR-23a-3p y miR-221-3p al modelo multivariante clínico. Evaluación del índice de mejora de la discriminación (IDI) y el índice de reclasificación neta continua (cNRI) para la predicción del endpoint combinado primario con la incorporación de los 3 miRNAs señalados frente al modelo clínico multivariante basal. Se muestra la función de la distribución empírica de \hat{D} para $T^0 \leq t_0$ (línea fina sólida) para evaluar el cNRI y el IDI, por el método de Uno et al.¹³⁵ T^0 denota el momento de aparición del evento, mientras que t_0 refleja un momento concreto particular. Los pacientes que presentan un evento en t_0 se definen como casos (ej. $T^0 \leq t_0$) y aquellos que no lo presentan como controles (ej. $T^0 > t_0$). \hat{D} corresponde al cambio entre los 2 modelos y permite evaluar visualmente la mejora entre los 2 modelos predictivos. cNRI, continuous net reclassification index o índice de reclasificación neta continua; IDI, integrated discrimination index o índice de mejora de la discriminación integrada.

Valor pronóstico de los miRNAs - Análisis de los *endpoints* secundarios

Se analizaron los *endpoints* secundarios establecidos en la metodología: 1) mortalidad cardiovascular; 2) hospitalización CV; 3) clase funcional NYHA al final del seguimiento.

En el estudio de la mortalidad cardiovascular, 8 de los 14 miRNAs estudiados demostraron ser predictores independientes: miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-27b-3p, miR-106b-5p, miR-107, miR-122-5p, miR-210-3p y miR-221-3p (Figura 5.9-B, Tabla 5.17 y Figura 5.14). Al analizar de forma aislada mortalidad CV, la capacidad predictiva de los miRNAs no se vio afectada respecto a los resultados obtenidos en el análisis primario, con independencia del ajuste realizado por las diferentes variables incluidas en los sucesivos modelos analizados.

Tres miRNAs fueron capaces de identificar a pacientes con más riesgo de ingresos futuros por insuficiencia cardiaca: miR-23a-3p, miR-210-3p y miR-221-3p (Figura 5.9-C y Tabla 5.18).

Finalmente, se identificaron 4 miRNAs con capacidad de identificar a aquellos pacientes con peor clase funcional NYHA en el seguimiento a largo plazo: miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-210-3p y miR-221-3p (Figura 5.9-D y Tabla 5.19).

Tabla 5.17. Asociación de miRNAs con el *endpoint* secundario mortalidad CV.

| | HR por incremento 1 SD (IC 95%) | <i>p</i> | Estadístico C (IC 95%) | Incremento estadístico C (IC 95%) |
|--------------------------------|------------------------------------|----------|---------------------------|--------------------------------------|
| miR-20a-5p^a | 1.20 (0.84 - 1.72) | 0.319 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 2.54 (0.85 - 1.69) | 0.296 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.16 (0.80 - 1.70) | 0.436 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.71 (1.16 - 2.53) | 0.007 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.10 (0.80 - 1.52) | 0.555 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.06 (0.73 - 1.54) | 0.773 | n/a | n/a |
| miR-21-5p^a | 2.12 (1.54 - 2.93) | 0.000 | 0.8544 (0.7886 - 0.9201) | 0.0394 (0 - 0.0839) |
| Modelo 2 | 2.12 (1.52 - 2.97) | 0.000 | 0.8749 (0.8039 - 0.9460) | 0.0389 (0 - 0.0798) |
| Modelo 3 | 1.92 (1.37 - 2.70) | 0.000 | 0.8621 (0.7962 - 0.9280) | 0.0374 (0 - 0.0802) |
| Modelo 4 | 1.93 (1.37 - 2.71) | 0.000 | 0.9301 (0.8871 - 0.9731) | 0.0136 (0 - 0.0296) |
| Modelo 5 | 1.34 (0.95 - 1.91) | 0.099 | 0.9112 (0.8574 - 0.9650) | 0.0051 (0 - 0.0183) |
| Modelo 6 | 1.36 (0.92 - 1.99) | 0.121 | 0.9001 (0.8311 - 0.9691) | 0.0039 (0 - 0.0202) |
| miR-23a-3p^a | 2.33 (1.50 - 3.58) | 0.000 | 0.8562 (0.7869 - 0.9255) | 0.0412 (0 - 0.0901) |
| Modelo 2 | 2.33 (1.52 - 3.56) | 0.000 | 0.8726 (0.8116 - 0.9337) | 0.0366 (0 - 0.0856) |
| Modelo 3 | 2.10 (1.32 - 3.32) | 0.002 | 0.8564 (0.7880 - 0.9248) | 0.0317 (0 - 0.0766) |
| Modelo 4 | 2.05 (1.26 - 3.32) | 0.004 | 0.9263 (0.8767 - 0.9760) | 0.0098 (0 - 0.0294) |
| Modelo 5 | 1.47 (0.97 - 2.23) | 0.068 | 0.9163 (0.8698 - 0.9627) | 0.0102 (0 - 0.0307) |
| Modelo 6 | 1.35 (0.85 - 2.15) | 0.204 | 0.9019 (0.8398 - 0.9641) | 0.0057 (0 - 0.0316) |
| miR-27b-3p^a | 2.35 (1.46 - 3.79) | 0.000 | 0.8378 (0.7515 - 0.9240) | 0.0228 (0 - 0.0653) |
| Modelo 2 | 2.42 (1.51 - 3.88) | 0.000 | 0.8628 (0.7893 - 0.9362) | 0.0268 (0 - 0.0656) |
| Modelo 3 | 2.00 (1.19 - 3.33) | 0.008 | 0.8405 (0.7603 - 0.9207) | 0.0157 (0 - 0.0517) |
| Modelo 4 | 3.38 (1.91 - 5.99) | 0.000 | 0.9288 (0.8804 - 0.9772) | 0.0123 (0 - 0.0342) |
| Modelo 5 | 1.47 (0.93 - 2.33) | 0.103 | 0.9156 (0.8635 - 0.9676) | 0.0094 (0 - 0.0295) |
| Modelo 6 | 1.53 (0.94 - 2.50) | 0.089 | 0.9037 (0.8477 - 0.9597) | 0.0074 (0 - 0.0333) |
| miR-30b-5p^a | 1.48 (0.97 - 2.27) | 0.070 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.56 (0.91 - 2.44) | 0.054 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.36 (0.90 - 2.06) | 0.144 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 2.00 (1.25 - 3.17) | 0.004 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.19 (0.83 - 1.73) | 0.345 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.05 (0.69 - 1.61) | 0.805 | n/a | n/a |
| miR-106b-5p^a | 1.59 (1.10 - 2.30) | 0.015 | 0.8337 (0.7558 - 0.9116) | 0.0187 (0 - 0.0558) |
| Modelo 2 | 1.57 (1.07 - 2.33) | 0.022 | 0.8538 (0.7721 - 0.9354) | 0.0178 (0 - 0.0577) |
| Modelo 3 | 1.55 (1.06 - 2.27) | 0.024 | 0.8385 (0.7618 - 0.9152) | 0.0138 (0 - 0.0466) |
| Modelo 4 | 2.24 (1.43 - 3.50) | 0.000 | 0.9289 (0.8837 - 0.9742) | 0.0124 (0 - 0.0329) |
| Modelo 5 | 1.30 (0.94 - 1.79) | 0.112 | 0.9080 (0.8593 - 0.9567) | 0.0019 (0 - 0.0161) |
| Modelo 6 | 1.29 (0.86 - 1.94) | 0.211 | 0.9033 (0.8384 - 0.9682) | 0.0071 (0 - 0.0272) |
| miR-107^a | 2.41 (1.33 - 4.37) | 0.004 | 0.8308 (0.7447 - 0.9169) | 0.0158 (0 - 0.0504) |

| | HR por incremento 1 SD (IC 95%) | p | Estadístico C (IC 95%) | Incremento estadístico C (IC 95%) |
|--------------------------------|------------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Modelo 2 | 2.51 (1.32 – 4.76) | 0.005 | 0.8542 (0.7664 - 0.9419) | 0.0182 (0 - 0.0591) |
| Modelo 3 | 2.29 (1.27 – 4.08) | 0.006 | 0.8350 (0.7635 - 0.9066) | 0.0103 (0 - 0.0421) |
| Modelo 4 | 2.88 (1.39 – 5.99) | 0.005 | 0.9279 (0.8768 - 0.9791) | 0.0114 (0 - 0.0342) |
| Modelo 5 | 1.96 (1.11 – 3.46) | 0.020 | 0.9076 (0.8525 - 0.9626) | 0.0015 (0 - 0.0204) |
| Modelo 6 | 1.52 (0.85 – 2.72) | 0.153 | 0.9078 (0.8411 - 0.9744) | 0.0115 (0 - 0.0376) |
| miR-122-5p^a | 1.95 (1.36 – 2.79) | 0.000 | 0.8196 (0.7264 - 0.9127) | 0.0046 (0 - 0.0524) |
| Modelo 2 | 1.97 (1.35 – 2.87) | 0.000 | 0.8432 (0.7623 - 0.9241) | 0.0072 (0 - 0.0412) |
| Modelo 3 | 1.79 (1.25 – 2.55) | 0.001 | 0.8447 (0.7664 - 0.9231) | 0.0200 (0 - 0.0559) |
| Modelo 4 | 1.83 (1.30 – 2.56) | 0.000 | 0.9141 (0.8621 - 0.9661) | 0.0024 (0 - 0.0171) |
| Modelo 5 | 1.18 (0.81 – 1.71) | 0.397 | 0.9056 (0.8478 - 0.9634) | 0.0005 (0 - 0.0095) |
| Modelo 6 | 1.29 (0.86 – 1.95) | 0.217 | 0.8957 (0.8173 - 0.9742) | 0.0005 (0 - 0.0129) |
| miR-148b-3p^a | 1.35 (0.91 – 2.00) | 0.142 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.41 (0.94 – 2.11) | 0.095 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.36 (0.91 – 2.03) | 0.135 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.83 (1.05 – 3.22) | 0.034 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.09 (0.75 – 1.60) | 0.646 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.23 (0.76 – 1.99) | 0.401 | n/a | n/a |
| miR-210-3p^a | 2.73 (1.86 – 4.02) | 0.000 | 0.8638 (0.7917 - 0.9358) | 0.0488 (0 - 0.1040) |
| Modelo 2 | 2.85 (1.91 – 4.26) | 0.000 | 0.8862 (0.8213 - 0.9511) | 0.0502 (0 - 0.1052) |
| Modelo 3 | 2.46 (1.64 – 3.68) | 0.000 | 0.8683 (0.7997 - 0.9369) | 0.0436 (0 - 0.0959) |
| Modelo 4 | 2.24 (1.49 – 3.36) | 0.000 | 0.9349 (0.8957 - 0.9741) | 0.0184 (0 - 0.0508) |
| Modelo 5 | 1.55 (1.02 – 2.34) | 0.038 | 0.9107 (0.8616 - 0.9599) | 0.0046 (0 - 0.0256) |
| Modelo 6 | 1.75 (1.11 – 2.74) | 0.015 | 0.9040 (0.8391 - 0.9689) | 0.0077 (0 - 0.0281) |
| miR-221-3p^a | 1.75 (1.17 - 2.61) | 0.007 | 0.8412 (0.7659 - 0.9166) | 0.0263 (0 - 0.0722) |
| Modelo 2 | 1.97 (1.25 – 3.11) | 0.003 | 0.864 (0.7855 - 0.9425) | 0.028 (0 - 0.0787) |
| Modelo 3 | 1.64 (1.10 – 2.45) | 0.016 | 0.8503 (0.7836 - 0.9170) | 0.0256 (0 - 0.0618) |
| Modelo 4 | 1.91 (1.18 – 3.10) | 0.009 | 0.9291 (0.8877 - 0.9705) | 0.0126 (0 - 0.0362) |
| Modelo 5 | 1.32 (0.88 – 1.99) | 0.176 | 0.9130 (0.8657 - 0.9602) | 0.0069 (0 - 0.0230) |
| Modelo 6 | 1.08 (0.71 – 1.64) | 0.723 | 0.8984 (0.8286 - 0.9682) | 0.0022 (0 - 0.0220) |

Análisis de la cohorte global de validación con 311 pacientes con IAM. El HR muestra el incremento del riesgo de desarrollar el endpoint secundario mortalidad cardiovascular en los distintos modelos de regresión de Cox multivariante planteados: ^a modelo basal) ajustado por edad y sexo; modelo 2) ajustado por edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, hábito tabáquico, diabetes, dislipemia y antecedentes previos de IAM); modelo 3) ajustado por edad, sexo y troponina I; modelo 4) ajustado por edad, sexo y NT-proBNP; modelo 5) ajustado por edad, sexo y el score de riesgo GRACE; modelo 6) ajustado por FEVI y clase Killip. HR, hazard ratio; SD, desviación estándar; IC, intervalo de confianza; n/a, no aplicable.

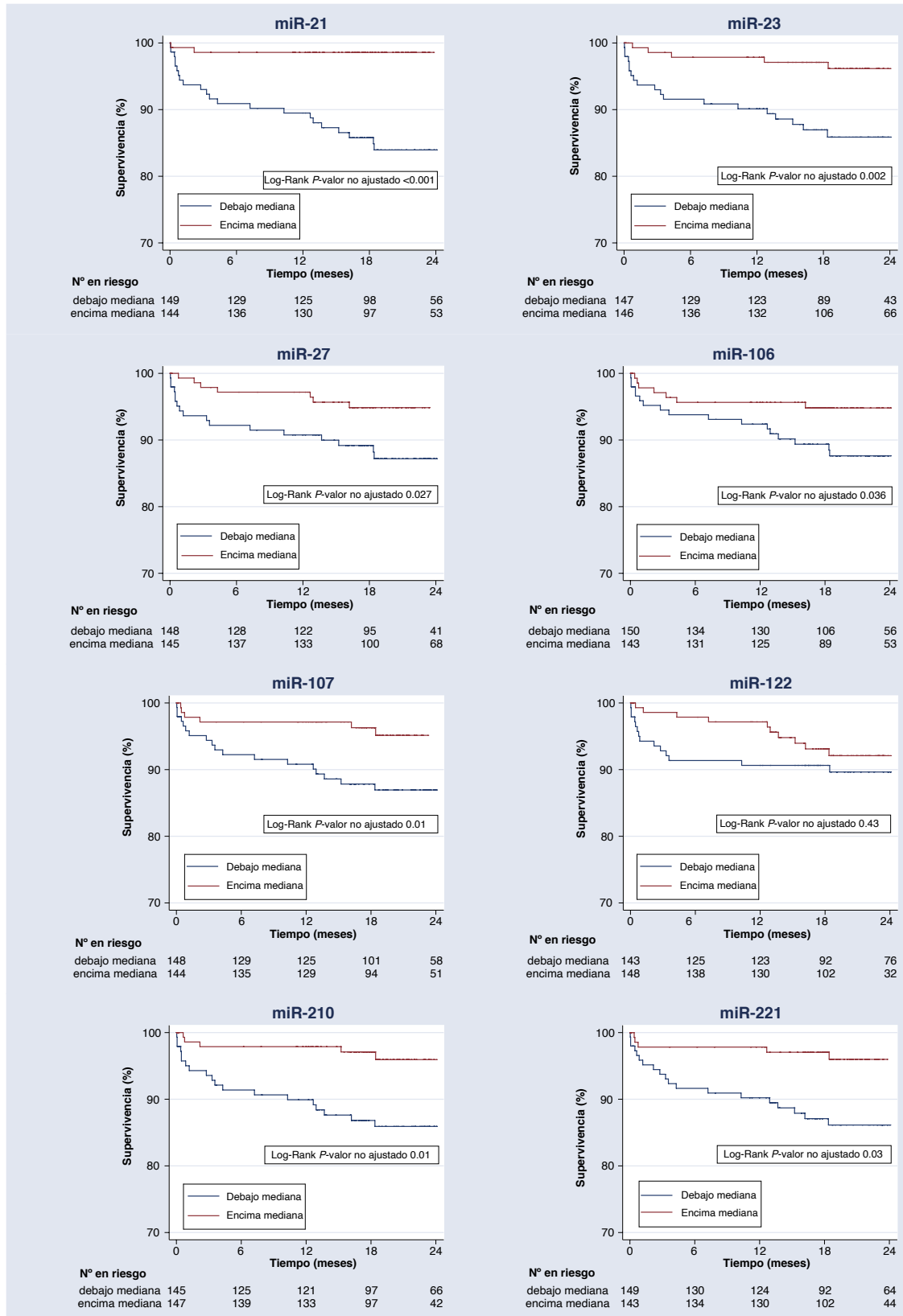


Figura 5.14 Incidencia del *endpoint* secundario muerte CV en función del valor de miRNAs. Se muestran las curvas de Kaplan-Meier para los grupos de pacientes separados por la mediana de miRs-21, -23, -27, -106, -107, -122, -210 y -221. Se muestran los miRNAs que habían demostrado asociación estadísticamente significativa en el análisis de supervivencia de Cox mostrado en la Tabla 5.17.

Tabla 5.18. Asociación de miRNAs con el *endpoint* secundario hospitalización por IC.

| | HR por incremento 1 SD (IC 95%) | <i>p</i> | Estadístico C (IC 95%) | Incremento estadístico C (IC 95%) |
|--------------------------------|------------------------------------|----------|---------------------------|--------------------------------------|
| miR-20a-5p^a | 1.22 (0.80 – 1.87) | 0.360 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.29 (0.84 – 2.01) | 0.248 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.26 (0.81 – 1.96) | 0.296 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.20 (0.78 – 1.84) | 0.411 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.24 (0.81 – 1.89) | 0.323 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.22 (0.81 – 1.83) | 0.349 | n/a | n/a |
| miR-21-5p^a | 1.45 (0.93 – 2.26) | 0.098 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.50 (0.96 – 2.35) | 0.073 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.40 (0.89 – 2.20) | 0.140 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.18 (0.72 – 1.95) | 0.515 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.40 (0.87 – 2.25) | 0.170 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.24 (0.78 – 1.99) | 0.366 | n/a | n/a |
| miR-23a-3p^a | 1.64 (1.07 – 2.50) | 0.022 | 0.7248 (0.6075 - 0.8422) | 0.0598 (0 - 0.1518) |
| Modelo 2 | 1.72 (1.09 – 2.71) | 0.020 | 0.8080 (0.6515 - 0.9645) | 0.0429 (0 - 0.0913) |
| Modelo 3 | 1.58 (1.02 – 2.46) | 0.041 | 0.7300 (0.6062 - 0.8538) | 0.0395 (0 - 0.1145) |
| Modelo 4 | 1.42 (0.90 – 2.24) | 0.127 | 0.7674 (0.6367 - 0.8982) | 0.0396 (0 - 0.0963) |
| Modelo 5 | 1.57 (0.99 – 2.49) | 0.056 | 0.7266 (0.6119 - 0.8412) | 0.0517 (0 - 0.1421) |
| Modelo 6 | 1.46 (0.94 – 2.27) | 0.089 | 0.7697 (0.6561 - 0.8833) | 0.0377 (0 - 0.1064) |
| miR-27b-3p^a | 1.12 (0.67 – 1.88) | 0.655 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.07 (0.63 – 1.81) | 0.815 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.03 (0.60 – 1.75) | 0.914 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.12 (0.63 – 2.02) | 0.698 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.08 (0.65 – 1.79) | 0.759 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.10 (0.68 – 1.78) | 0.707 | n/a | n/a |
| miR-30b-5p^a | 1.12 (0.71 – 1.75) | 0.629 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.17 (0.73 – 1.87) | 0.509 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.15 (0.73 – 1.79) | 0.553 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.02 (0.65 – 1.60) | 0.931 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.13 (0.73 – 1.75) | 0.578 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.06 (0.69 – 1.63) | 0.801 | n/a | n/a |
| miR-106b-5p^a | 1.17 (0.79 – 1.75) | 0.433 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.29 (0.84 – 1.96) | 0.243 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.20 (0.81 – 1.77) | 0.375 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.16 (0.76 – 1.79) | 0.486 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.20 (0.81 – 1.77) | 0.370 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.22 (0.81 – 1.84) | 0.344 | n/a | n/a |
| miR-107^a | 1.25 (0.67 – 1.69) | 0.799 | n/a | n/a |

| | HR por incremento 1 SD (IC 95%) | p | Estadístico C (IC 95%) | Incremento estadístico C (IC 95%) |
|--------------------------------|------------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Modelo 2 | 1.01 (0.62 – 1.62) | 0.984 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.04 (0.66 – 1.65) | 0.853 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.03 (0.62 – 1.70) | 0.919 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.05 (0.66 – 1.67) | 0.828 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.03 (0.64 – 1.66) | 0.894 | n/a | n/a |
| miR-122-5p^a | 1.15 (0.71 – 1.89) | 0.566 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.27 (0.79 – 2.06) | 0.325 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.21 (0.74 – 2.00) | 0.452 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.04 (0.63 – 1.71) | 0.893 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.10 (0.68 – 1.81) | 0.689 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.00 (0.61 – 1.66) | 0.994 | n/a | n/a |
| miR-148b-3p^a | 1.16 (0.64 – 1.46) | 0.864 | n/a | n/a |
| Modelo 2 | 1.11 (0.73 – 1.67) | 0.633 | n/a | n/a |
| Modelo 3 | 1.05 (0.69 – 1.59) | 0.819 | n/a | n/a |
| Modelo 4 | 1.09 (0.69 – 1.73) | 0.715 | n/a | n/a |
| Modelo 5 | 1.07 (0.71 – 1.62) | 0.757 | n/a | n/a |
| Modelo 6 | 1.01 (0.66 – 1.55) | 0.967 | n/a | n/a |
| miR-210-3p^a | 2.22 (1.35 – 3.64) | 0.002 | 0.7470 (0.6138 - 0.8801) | 0.0819 (0 - 0.2243) |
| Modelo 2 | 2.07 (1.27 - 3.37) | 0.004 | 0.8121 (0.6734 - 0.9509) | 0.0471 (0 - 0.1416) |
| Modelo 3 | 2.12 (1.29 - 3.50) | 0.003 | 0.7470 (0.6197 - 0.8742) | 0.0565 (0 - 0.1856) |
| Modelo 4 | 1.73 (1.04 - 2.88) | 0.035 | 0.7480 (0.6035 - 0.8924) | 0.0202 (0 - 0.0986) |
| Modelo 5 | 2.27 (1.31 - 3.94) | 0.003 | 0.7486 (0.6061 - 0.8911) | 0.0737 (0 - 0.2128) |
| Modelo 6 | 1.87 (1.11 - 3.15) | 0.019 | 0.7633 (0.6157 - 0.9109) | 0.0314 (0 - 0.1240) |
| miR-221-3p^a | 2.02 (1.30 – 3.12) | 0.002 | 0.7508 (0.6276 - 0.8740) | 0.0858 (0 - 0.2052) |
| Modelo 2 | 2.05 (1.30 - 3.22) | 0.002 | 0.8168 (0.6887 - 0.9449) | 0.0517 (0 - 0.1293) |
| Modelo 3 | 1.97 (1.28 - 3.05) | 0.002 | 0.7557 (0.6322 - 0.8792) | 0.0653 (0 - 0.1748) |
| Modelo 4 | 1.93 (1.19 - 3.12) | 0.007 | 0.8027 (0.6970 - 0.9083) | 0.0748 (0 - 0.1941) |
| Modelo 5 | 1.97 (1.26 - 3.09) | 0.003 | 0.7516 (0.6303 - 0.8729) | 0.0767 (0 - 0.1772) |
| Modelo 6 | 1.90 (1.22 - 2.98) | 0.004 | 0.7798 (0.6656 - 0.8941) | 0.0479 (0 - 0.1298) |

Análisis de la cohorte global de validación con 311 pacientes con IAM. El HR muestra el incremento del riesgo de desarrollar el endpoint secundario mortalidad cardiovascular en los distintos modelos de regresión de Cox multivariante planteados: ^a modelo basal) ajustado por edad y sexo; modelo 2) ajustado por edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, hábito tabáquico, diabetes, dislipemia y antecedentes previos de IAM); modelo 3) ajustado por edad, sexo y troponina I; modelo 4) ajustado por edad, sexo y NT-proBNP; modelo 5) ajustado por edad, sexo y el score de riesgo GRACE; modelo 6) ajustado por FEVI y clase Killip. HR, hazard ratio; SD, desviación estándar; IC, intervalo de confianza; n/a, no aplicable.

Tabla 5.19. Asociación de miRNAs con el *endpoint* secundario clase funcional NYHA \geq II

| miRNA | OR por incremento 1SD (95% CI) | P |
|------------------|-----------------------------------|-------|
| hsa-miR-20a-5p | 1.12 (0.80 – 1.56) | 0.521 |
| hsa-miR-21-5p | 1.59 (1.05 – 2.42) | 0.029 |
| hsa-miR-23a-3p | 1.81 (1.17 – 2.80) | 0.007 |
| hsa-miR-27b-3p | 1.77 (0.97 – 3.22) | 0.062 |
| hsa-miR-30b-5p | 1.24 (0.81 – 1.89) | 0.320 |
| hsa-miR-93-5p | 1.10 (0.74 - 1.62) | 0.646 |
| hsa-miR-106b-5p | 1.32 (0.94 – 1.87) | 0.109 |
| hsa-miR-107 | 1.41 (0.89 – 2.22) | 0.141 |
| hsa-miR-122-5p | 1.02 (0.66 – 1.60) | 0.919 |
| hsa-miR-144-3p | 1.01 (0.69 - 1.48) | 0.958 |
| hsa-miR-148b-3p | 1.20 (0.81 - 1.76) | 0.360 |
| hsa-miR-210-3p | 1.75 (1.15 – 2.65) | 0.008 |
| hsa-miR-221-3p | 1.77 (1.18 – 2.68) | 0.006 |
| hsa-miR-let7a-5p | 1.26 (0.82 - 1.94) | 0.289 |

Análisis de los 311 pacientes con IAM de la cohorte global. Análisis mediante regresión logística binaria, ajustada por edad y sexo.

5.2.4 Análisis de funcionalidad de los miRNAs

Se estudió la significación biológica de los 8 miRNAs circulantes que habían mostrado capacidades predictivas para los diferentes *endpoints* utilizando herramientas bioinformáticas. Se realizó una predicción de sus genes diana utilizando bases de datos adecuadas, seguido de un análisis por grupos agregados basado en la existencia de dianas comunes, tal y como se muestra en la Figuras 5.15 y 5.16. Se puede observar como todos los miRNAs con capacidad pronóstica comparten dianas comunes. Destacan en particular miR-21-5p, miR-122-5p, miR-106b-5p y miR-221-3p, que mostraron las relaciones de mayor intensidad a partir del número de dianas comunes, que incluían PKD2, RhoA, HMGB3, TSC1, FBNP1 y PKM.

Estos genes regulados por nuestro grupo de miRNAs con capacidad pronóstica son extremadamente relevantes para el mantenimiento de la funcionalidad cardíaca y el

remodelado ventricular adverso tras un evento isquémico. Así, el gen PKD2, codifica un canal intracelular de calcio expresado en los cardiomiocitos. Por su parte, RhoA es un gen clave para la dinámica del citoesqueleto, HMGB3 está involucrado en la regeneración muscular, TSC1 es un gen específico de los miocitos conectado con el daño arterial, FNBP1 está involucrado en procesos de degradación a través de la vía lisosomal y PKM codifica una enzima clave para el metabolismo celular, implicada en procesos de glicolisis anaerobia a través del efecto Warburg. La red de relación entre los miRNAs seleccionados por dianas comunes reguladas en nuestro modelo sugiere que todos ellos median de forma coordinada el proceso de recuperación cardiaca tras isquemia.

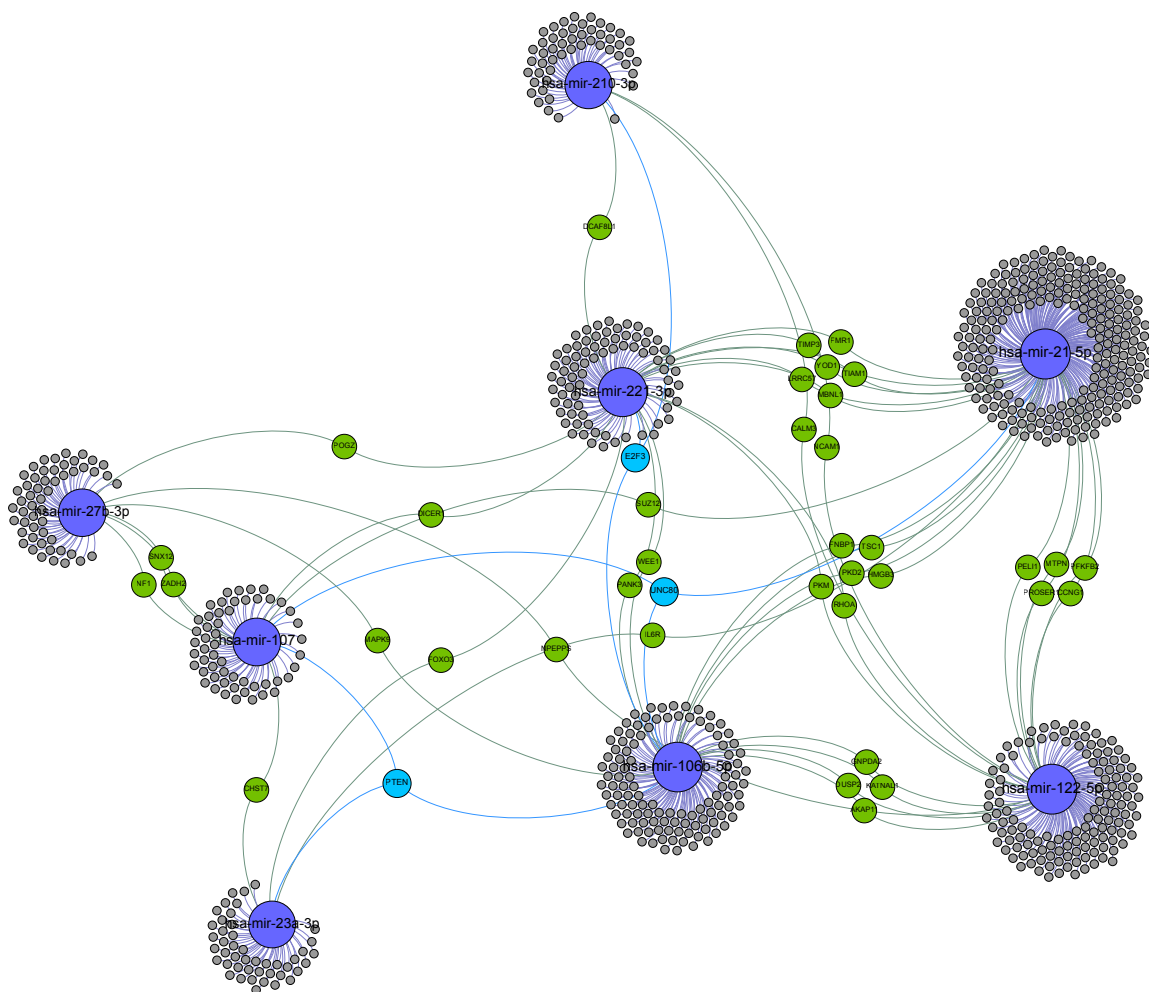


Figura 5.15. Redes de relación funcional entre los miRNAs con capacidad pronóstica: potenciales dianas de actuación terapéutica. Únicamente se muestran aquellos miRNAs que demostraron tener capacidad pronóstica en el análisis de supervivencia, marcados en azul. Los genes con al menos dos interacciones potenciales están marcados en verde, mientras que aquellos con solo una conexión no están señalados. Los nodos de color de los genes regulados son proporcionales al grado del nodo (su número de conexiones).

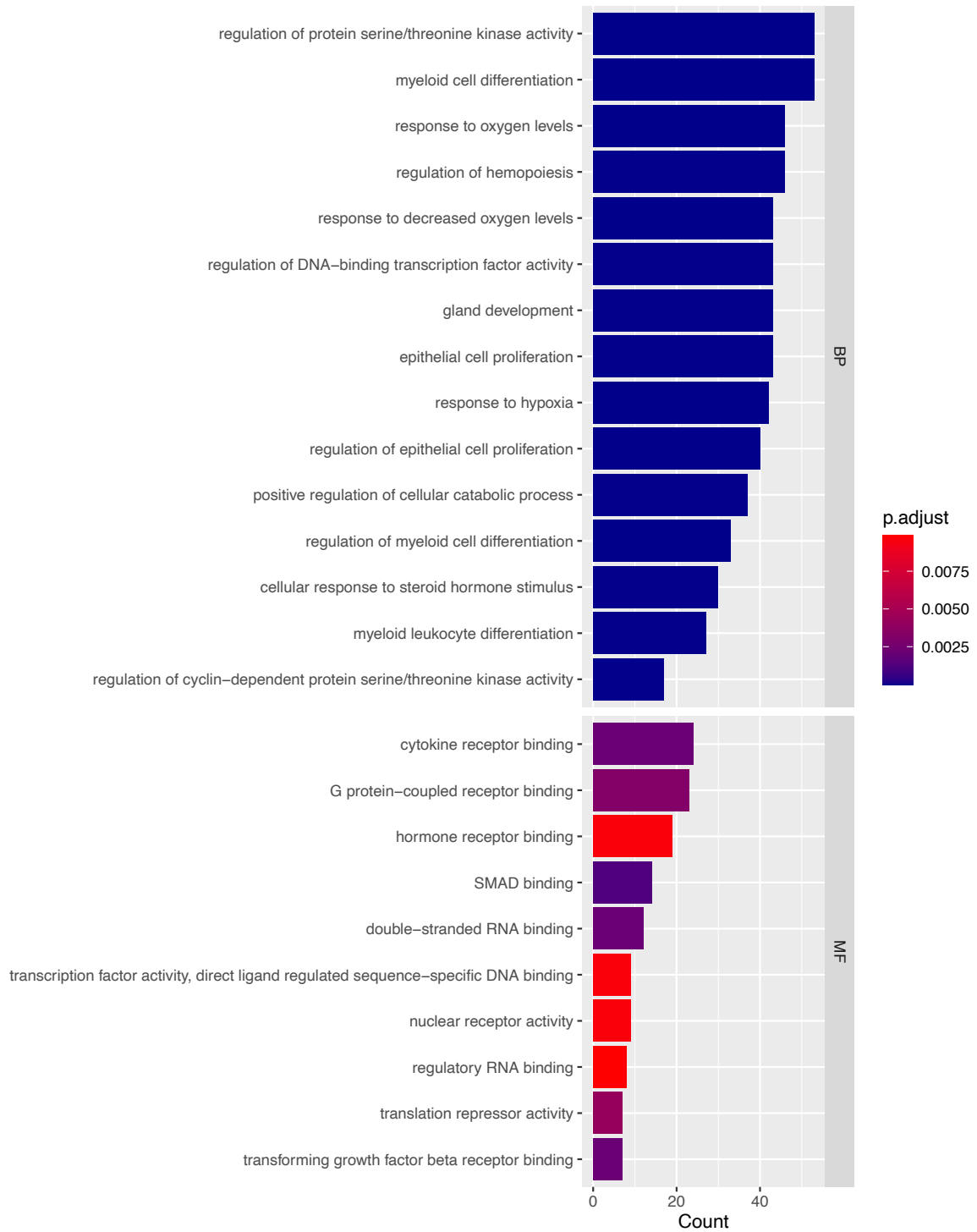


Figura 5.16. Análisis funcional enriquecido en procesos biológicos regulados por los miRNAs asociados a mortalidad CV u hospitalizaciones por IC. *Diagrama de barras de los términos GO estadísticamente significativos procedentes del análisis bioinformático. Las categorías GO están divididas en BP (procesos biológicos) y MF (función molecular).*

5.2.5 miRNAs como herramientas de reclasificación pronóstica

Una vez analizada la capacidad diagnóstica precisa para predecir muerte CV y hospitalizaciones por IC en nuestro estudio por un determinado perfil de miRNAs, exploramos su capacidad para reestratificar el riesgo individual de cada paciente. Se construyó un modelo de agrupamiento jerárquico con los 6 miRNAs asociados con el objetivo primario (Figura 5.17). Los pacientes que presentaron el evento primario tenían un patrón de expresión diferente para los miRNAs analizados en nuestro estudio, particularmente miR-21-5p and miR23a-3p. Además, este patrón de expresión diferencial que mostraron los miRNAs fue independiente de otras características clínicas, lo que revela que estos miRNAs ofrecen la posibilidad de obtener una información molecular inédita, que podría demostrarse como relevante y útil clínicamente.

También fue interesante identificar cómo dentro de los miRNAs analizados se observaron diferentes grados de relación entre ellos. Así, miR-21-5p y miR-23a-3p mostraron un mayor grado de relación, con tendencias similares en todos los pacientes en cuanto a la aparición de eventos, pero menor relación con el resto de miRNAs que se agrupaban en otro grupo, en el que miR-27b-3p y miR-221-3p se encontraban íntimamente relacionados.

Este modelo de agrupamiento jerárquico refleja que los miRNAs circulantes reclasifican el pronóstico de los pacientes con independencia de los datos clínicos basales, pero con mayor asociación a la aparición de eventos en el seguimiento, lo que potencia el atractivo de estos marcadores moleculares.

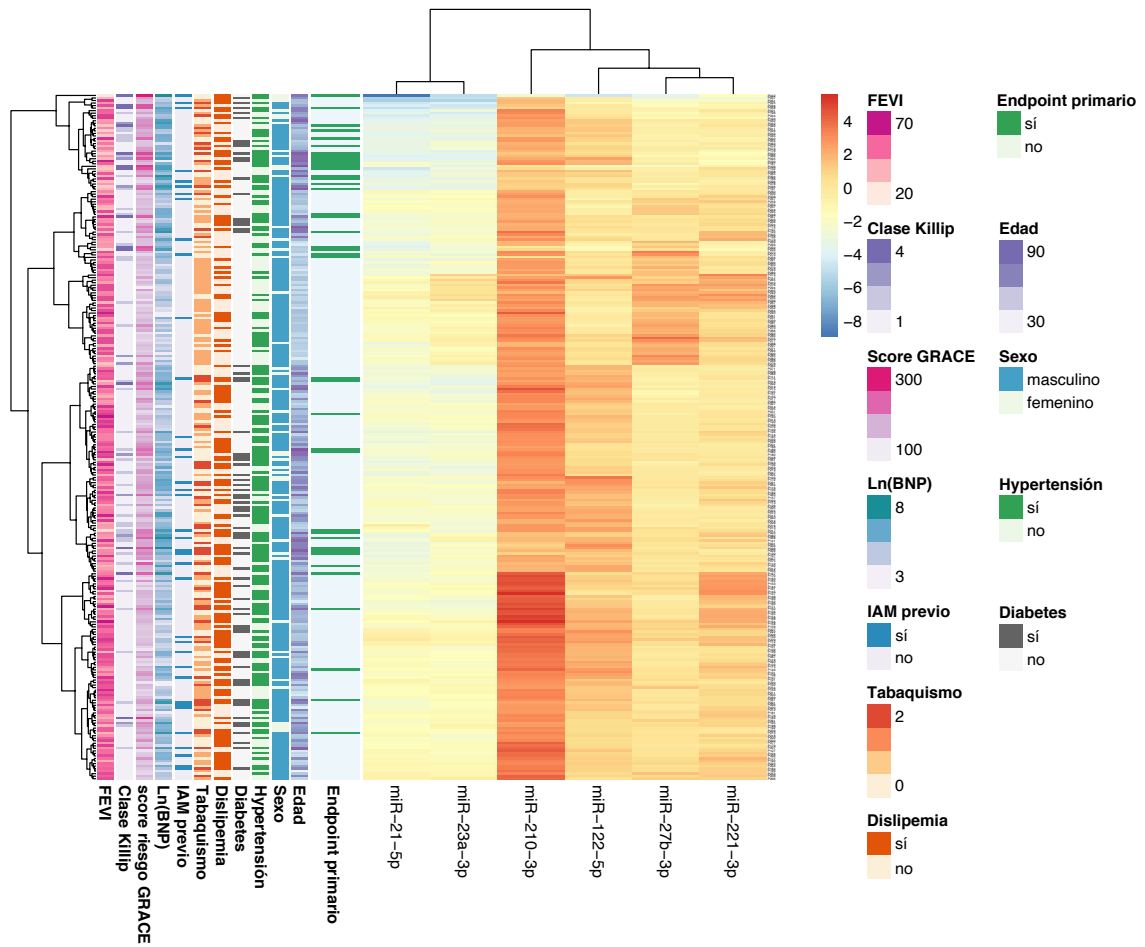


Figura 5.17. *Heat map* y modelo de agrupamiento jerárquico de los miRNAs más relevantes para reclasificar a los pacientes con IAM de acuerdo al riesgo de muerte CV/hospitalización por IC. Se incluyen los 6 principales miRNAs analizados por qRT-PCR en 311 pacientes con IAM de acuerdo a su riesgo, independientemente de características clínicas y basado en los patrones de expresión de miRNAs.

5.3 miRNAs en modelos experimentales

Una vez obtenidos los resultados del modelo clínico de validación de miRNAs en pacientes con IAM, nos planteamos la realización de estudios experimentales *in vivo* e *in vitro* que sirvieran para el estudio de los efectos de su modulación en este contexto patológico, y como exploración inicial de su potencialidad como dianas terapéuticas.

5.3.1 Expresión de miRNAs en los modelos experimentales *in vivo*

Los procedimientos experimentales *in vivo* están destinados a evaluar los niveles de expresión intra- y extracelular de los 14 miRNAs seleccionados, así como otros marcadores histológicos e inmunohistoquímicos relacionados con el daño y respuesta a la isquemia, en 2 situaciones análogas a las encontradas en práctica clínica (oclusión permanente e isquemia-reperfusión) y en diferentes momentos temporales (24h, 72h, 7d, 30d), dado el carácter dinámico de los miRNAs como reguladores.¹⁴⁵ El objetivo fue determinar qué miRNAs se expresan y modulan en una situación de isquemia miocárdica aguda, y su evolución en fase crónica tanto en tejido miocárdico como en suero, relacionándolo con la evolución hacia insuficiencia cardiaca. Esto permitirá utilizar estos modelos para la exploración de mecanismos y potenciales nuevas dianas terapéuticas.

En la puesta a punto de los modelos de IAM en rata por isquemia-reperfusión (I/R) y por oclusión permanente (OP) se confirmó la capacidad de inducir necrosis miocárdica en el territorio de la arteria descendente anterior, así como la reproducibilidad de la técnica quirúrgica para inducir un IAM de tamaño similar, tal y como se puede apreciar en las tinciones con Evans Blue, aislada o TTC de la Figura 5.18.

Una vez confirmada la reproducibilidad del modelo, se realizaron los procedimientos quirúrgicos de oclusión permanente (n = 30) y de isquemia reperusión (n = 30). Se cuantificó el daño miocárdico mediante la determinación de troponina I en los momentos previamente indicados (Figura 5.18), que tal y como era esperable mostró valores máximos a las 24 horas, siendo 5 veces superiores en el grupo de animales sometidos a oclusión permanente frente a aquellos en los que se había procedido a ligadura coronaria transitoria. Las tinciones de hematoxilina/eosina (H/E) en el grupo *sham* mostraron un tejido muscular estriado normal, con cardiomiocitos adecuadamente ordenados, mientras que en los grupos experimentales OP e I/R se objetivó una morfología celular irregular y desorganizada, con frecuente hiperplasia reactiva.

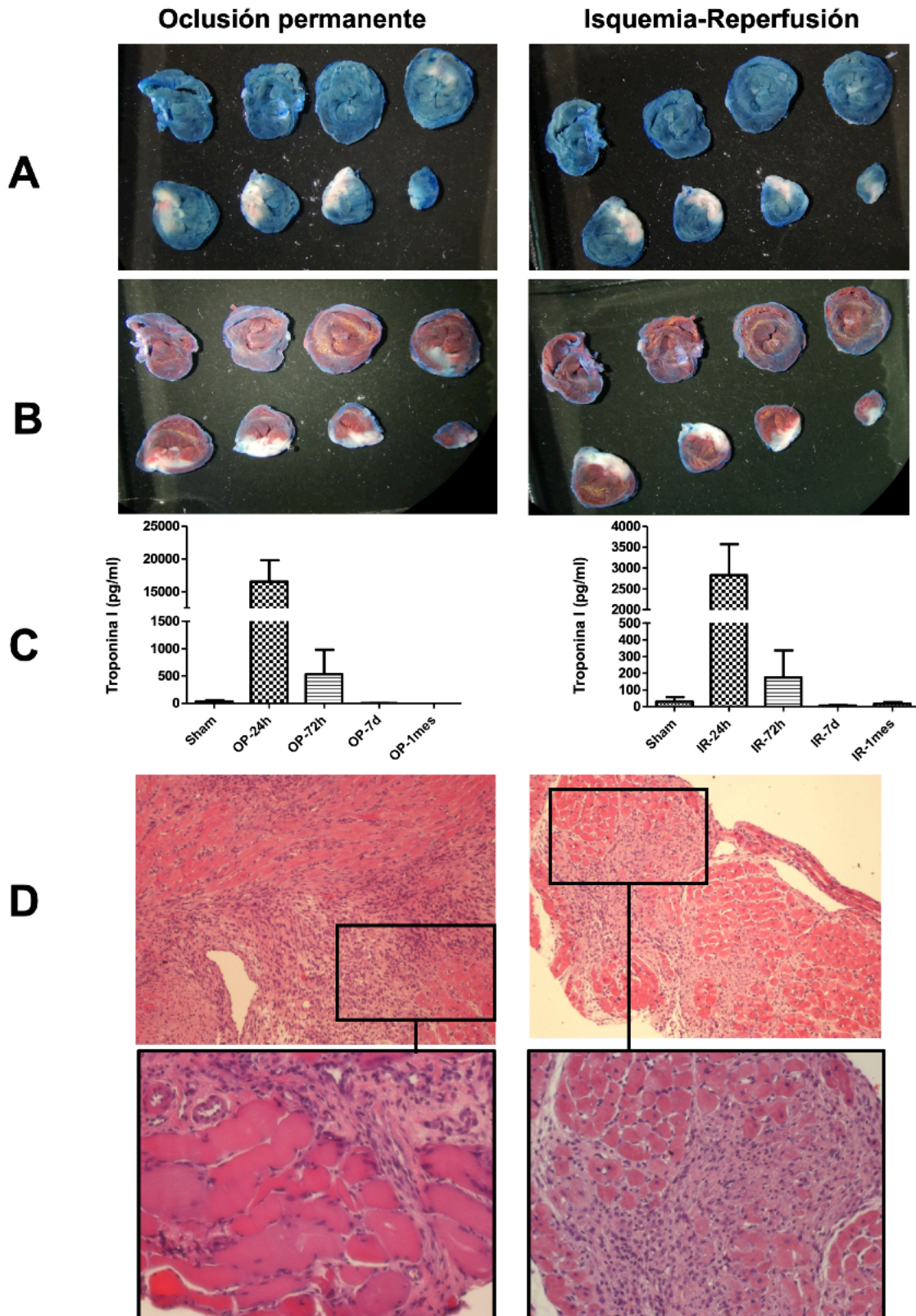


Figura 5.18. Evaluación del infarto de miocardio inducido en ratas sometidas a oclusión permanente e isquemia-reperfusión de la arteria descendente anterior. *Columna izquierda procedentes de animales sometidos a oclusión permanente (OP), a la derecha a isquemia/reperfusión (I/R). A. Tinción de Evans Blue en la que se muestra en color blanco la zona infartada, en rojo el área en riesgo y en azul la zona no*

infartada (lupa 40X). B. Tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) en la que se muestra en color blanco la zona infartada y en rojo la no infartada. C. Niveles de troponina I en función del grupo experimental y del momento de determinación. D. Tinción de Hematoxilina-Eosina (10X y ampliación 20X) a los 7 días de la cirugía, objetivándose el infiltrado celular reactivo y signos de muerte.

La infiltración inflamatoria aguda secundaria al daño miocárdico fue caracterizada mediante técnicas de inmunohistoquímica (Figura 5.19), objetivándose positividad a mieloperoxidasa (MPO), CD68, CD3 y CD163 desde las 24h del IAM, indicativo de la intensa respuesta inflamatoria celular inicial (neutrófilos, macrófagos y linfocitos), que fue resolviéndose progresivamente. El procedimiento de tinción tricrómica de Masson mostró una gran cantidad de áreas teñidas de verde indicativas de la presencia de fibras de colágeno a nivel intercelular. Estos cambios fueron más marcados en el grupo de OP y en tiempo de sacrificio más tardío, reflejando la progresión de la fibrosis perivascular e intersticial ventricular. También se visualizó la aparición de células de morfología fibroblástica, indicativo de transición epitelio-mesénquima (TEM), depósito de colágeno, fibrosis y signos de remodelado ventricular adverso a partir de los 7 días, mediante las tinciones inmunohistoquímicas realizadas con α -SMA. La tinción con HIF-1 α evidenció la aparición y mantenimiento de zonas hipóxicas.

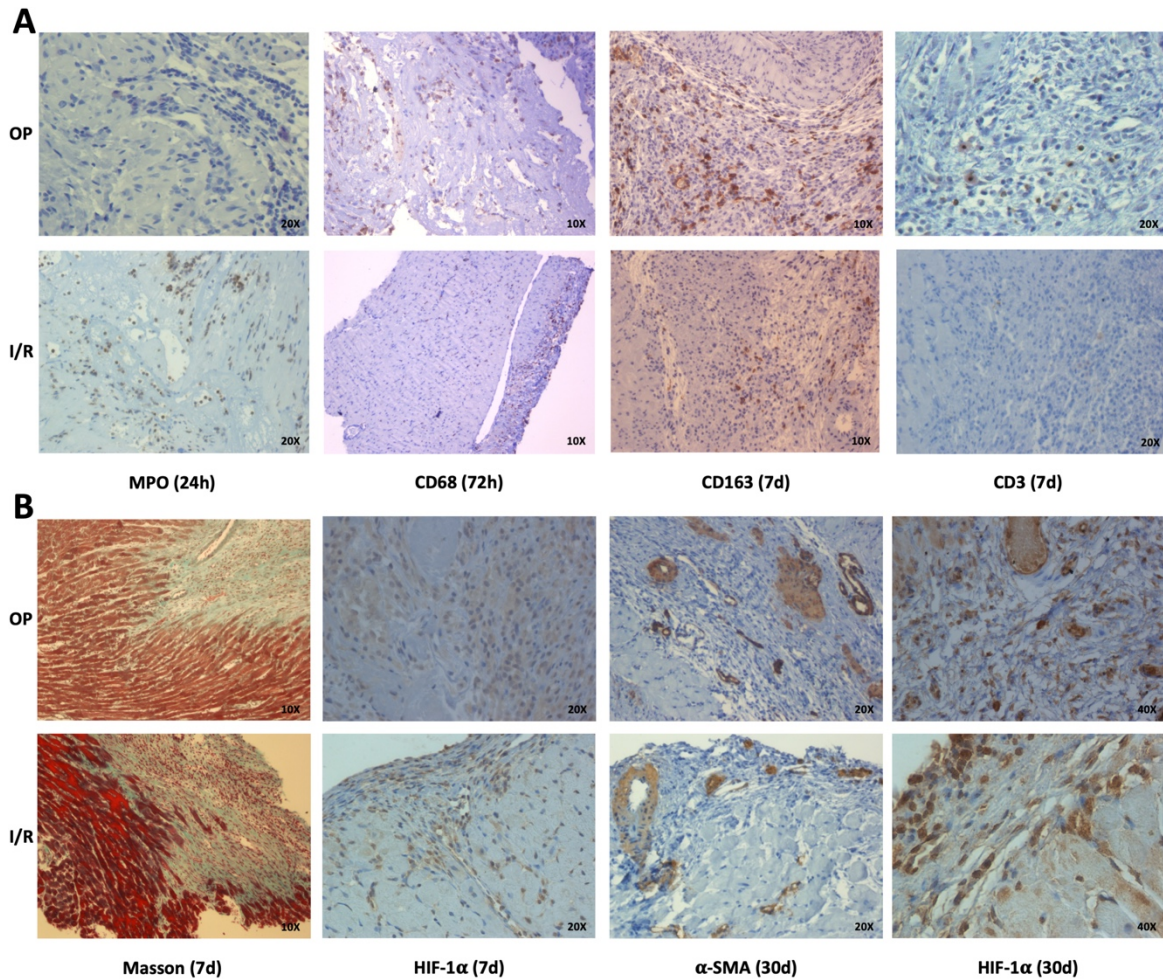


Figura 5.19. Caracterización de la respuesta inflamatoria y remodelado ventricular en cortes histológicos de ratas sometidas a infarto agudo de miocardio. Se muestran imágenes representativas de: **A.** Evaluación inmunohistoquímica del infiltrado inflamatorio mostrando positividad para mieloperoxidasa (MPO) en un gran número de células mononucleares, CD68 (marcador lisosomal presente en células mieloides y monocitos), CD163 (altamente específico para identificación de células del sistema monocito-macrófago) y CD3 (marcador de linfocitos T). **B.** Evaluación del remodelado ventricular e inducción de hipoxia tisular en regiones infartadas mediante tricrómico de Masson (marcador del colágeno intercelular como signo precursor de fibrosis ya a los 7 días del IAM), y tinciones inmunohistoquímicas con HIF-1 α (mediador de supervivencia celular en hipoxia tisular que muestra fuerte positividad) y α -SMA (distintivo de miofibroblastos maduros y marcador de escara y remodelado ventricular). OP, oclusión permanente; I/R, isquemia-reperfusión.

Los datos inmunohistoquímicos fueron correlacionados con los valores de expresión intracelular y extracelular de miRNAs en los experimentos *in vivo* de OP e I/R. Así, en las ratas sometidas a IAM por OP se determinaron en suero obtenido de sangre venosa periférica (Figura 5.20) y en los lisados celulares (Figura 5.21) se objetivaron

cambios temporales en la expresión de la mayor parte de miRNAs, reflejo de la modulación de los mismos a lo largo de las distintas fases de recuperación tras el infarto. Los niveles de expresión séricos disminuyeron inicialmente respecto al grupo control (*sham*), con nadir a las 24h en la mayor parte de los miRNAs estudiados: miR-20a-5p, -21-5p, -23a-3p, -27b-3p, -30b-5p, -106b-5p, -107, -148b-3p, -210-3p, -221-3p y let-7a-5p, para incrementarse en las determinaciones sucesivas hasta llegar a su máximo nivel de expresión a los 7 días. La cinética de expresión de miRNAs fue diferente a nivel intracelular (Figura 5.21), donde el comportamiento mayoritario fue un discreto incremento expresión a las 24h, alcanzándose valores máximos de expresión a las 72h del IAM. De forma esperable, los patrones de expresión de miRNAs intracelulares y secretados no fueron idénticos.

Entre los miRNAs que mayores diferencias presentaron en sangre periférica frente al grupo *sham* destacan miR-93-5p, -122-5p, -144-3p y -221-3p con incrementos entre x3-x7. También destacan miR-106b-5p, -107, 148b-3p 210-3p y let-7a-5p cuyos valores se duplicaron.

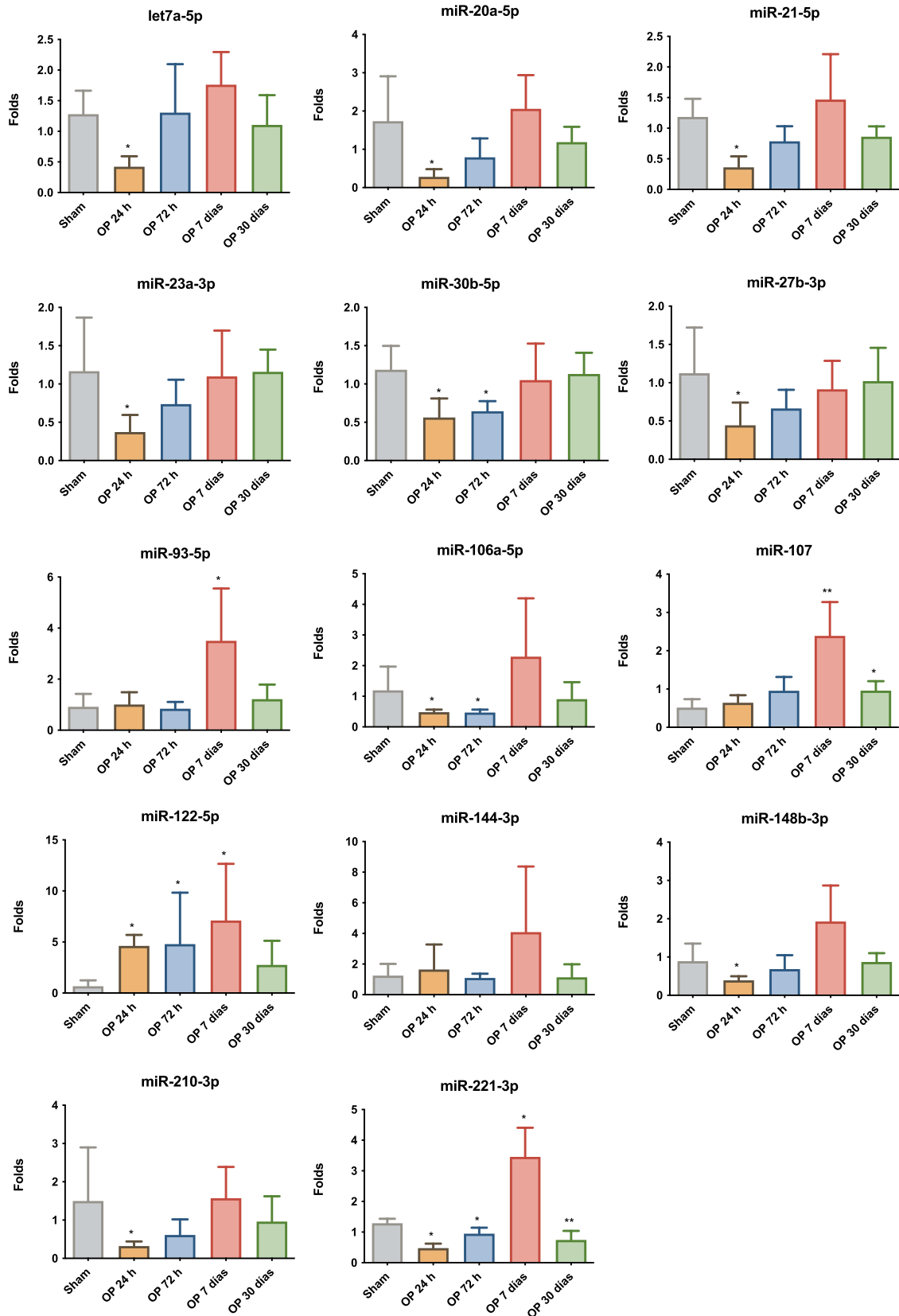


Figura 5.20. Expresión de miRNAs en sangre periférica de ratas sometidas a IAM por oclusión coronaria permanente (OP). Los niveles de expresión de miRNAs se muestran en folds, tomando como referencia para su normalización el nivel sérico previo a la cirugía experimental de estos animales. En la comparación entre grupos se considera estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (*) o < 0,01 (**).

En la correlación entre valores intra y extracelulares, fue destacable el comportamiento de miR-21-5p, que a pesar de ver multiplicados sus niveles intracelulares no se tradujo mayor expresión en sangre periférica. En contraposición, miR-122-5p, -144-3p, o -221-3p, que tuvieron incrementos intracelulares de magnitud similar o superior, sí se acompañaron de incrementos en sus niveles en suero. En el resto de miRNAs los niveles intracelulares se correlacionaron con los cambios observados a nivel extracelular, teniendo en cuenta las diferencias señaladas en la cinética de expresión.

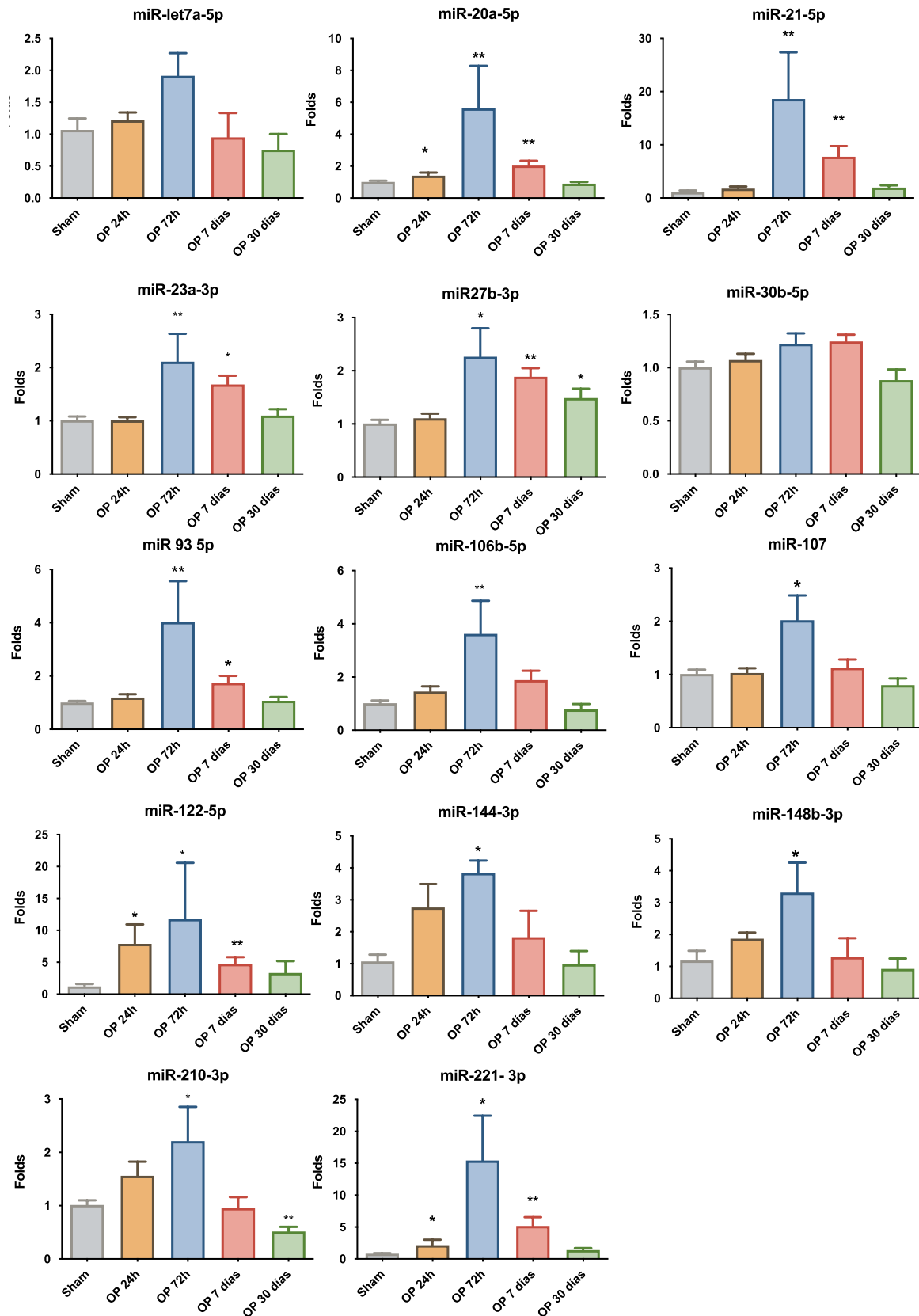


Figura 5.21. Expresión de miRNAs en tejido miocárdico de ratas sometidas a IAM por oclusión coronaria permanente (OP). Los niveles de expresión de miRNAs se muestran en folds, tomando como referencia el grupo sham. Se utilizó como housekeeping miR-30c. En la comparación entre grupos se considera estadísticamente significativo un p -valor $< 0,05$ (*) o $< 0,01$ (**).

Los resultados a nivel sérico obtenidos en el modelo de I/R (Figura 5.22) siguieron un patrón similar al observado en el de OP, con algunas diferencias reseñables:

- 1) los cambios de magnitud en la expresión de miRNAs fueron inferiores a los observados en el modelo de OP, probablemente como reflejo de la menor magnitud del daño miocárdico inducido;
- 2) se objetivó un menor número de miRNAs con infraexpresión sérica inicial con nadir a las 24h (miR-107, -210-3p), que en algunos casos se produjo, pero de forma más tardía pasadas las 72h (miR-20a-5p, -21-5p, -23a-3p, -27b-3p, -30b-5p, -106b-5p, -148b-3p, -221-3p), o no se produjo.
- 3) miR-122-5p mostró valores séricos prácticamente indetectables más allá de las primeras 24 horas en contraposición al patrón ascenso-descenso en los grupos del modelo OP.
- 4) Los miRNAs que mantuvieron elevadas diferencias frente al grupo *sham* se redujeron en número frente al modelo OP, manteniendo su relevancia miR-107, -122-5p, -23a-3p y -210-3p.

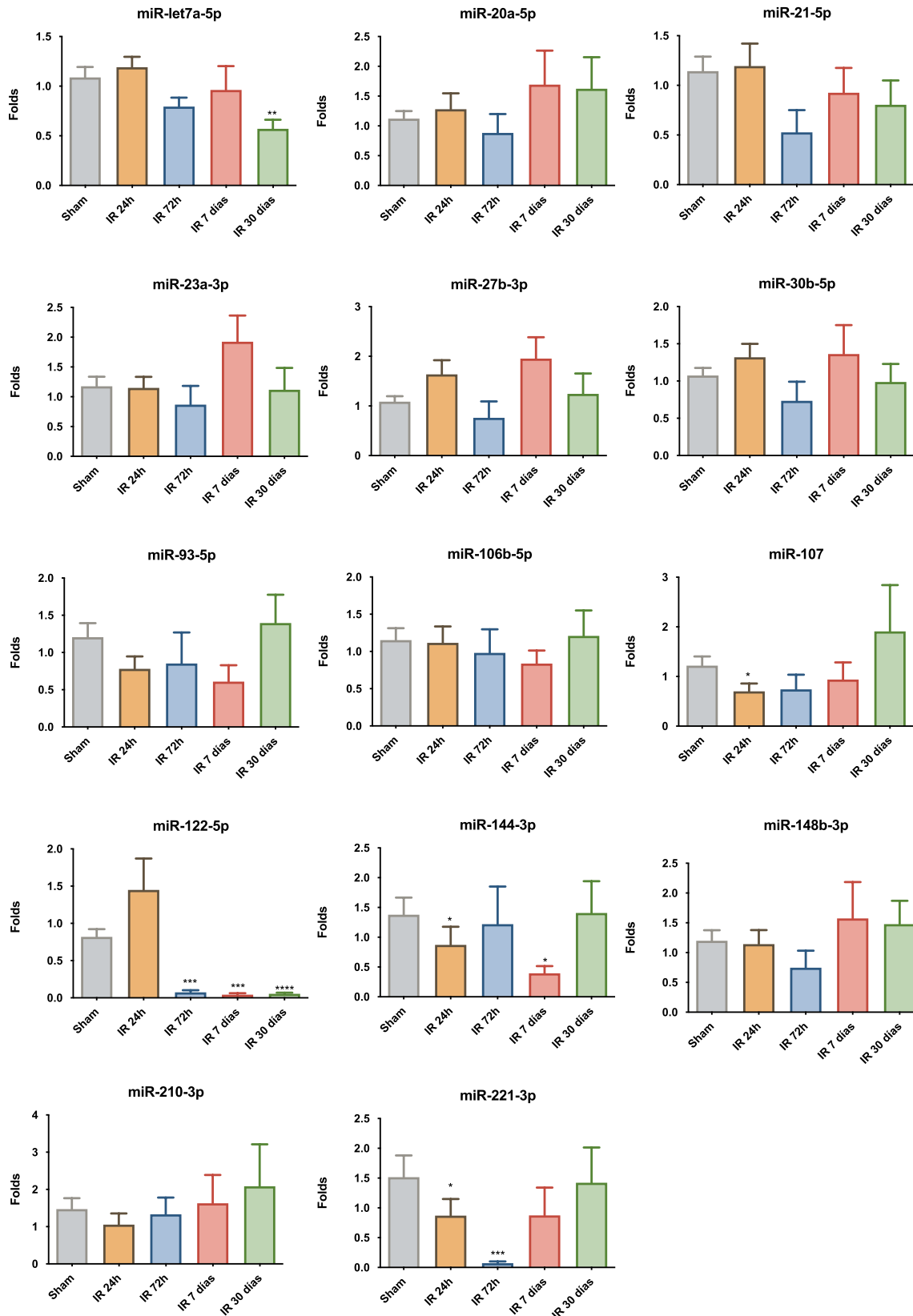


Figura 5.22. Expresión de miRNAs en sangre periférica de ratas sometidas a IAM por isquemia coronaria transitoria o isquemia-reperfusión (I/R). Los niveles de expresión de miRNAs se muestran en folds, tomando como referencia para su normalización el nivel sérico previo a la cirugía. En la comparación entre grupos se considera estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (*) o < 0,01 (**).

Finalmente, se estudiaron los niveles de expresión intracelular de miRNAs en los animales del modelo I/R (Figura 5.23). Del análisis de los datos se extraen las siguientes observaciones:

- 1) los cambios en los niveles de miRNAs en tejido y en suero fueron similares.
- 2) al igual que a nivel sérico, la magnitud de expresión intracelular de la mayoría de los miRNAs estudiados se redujo frente a los resultados obtenidos en OP.
- 3) el pico de expresión intracelular fue mayoritariamente a los 7 días, más tardío que lo apreciado intracelularmente en el grupo OP.
- 4) comportamiento diferencial de miR-122-5p, con valores de expresión intracelular muy elevados desde las 72 horas, coincidiendo con valores indetectables a nivel de suero.

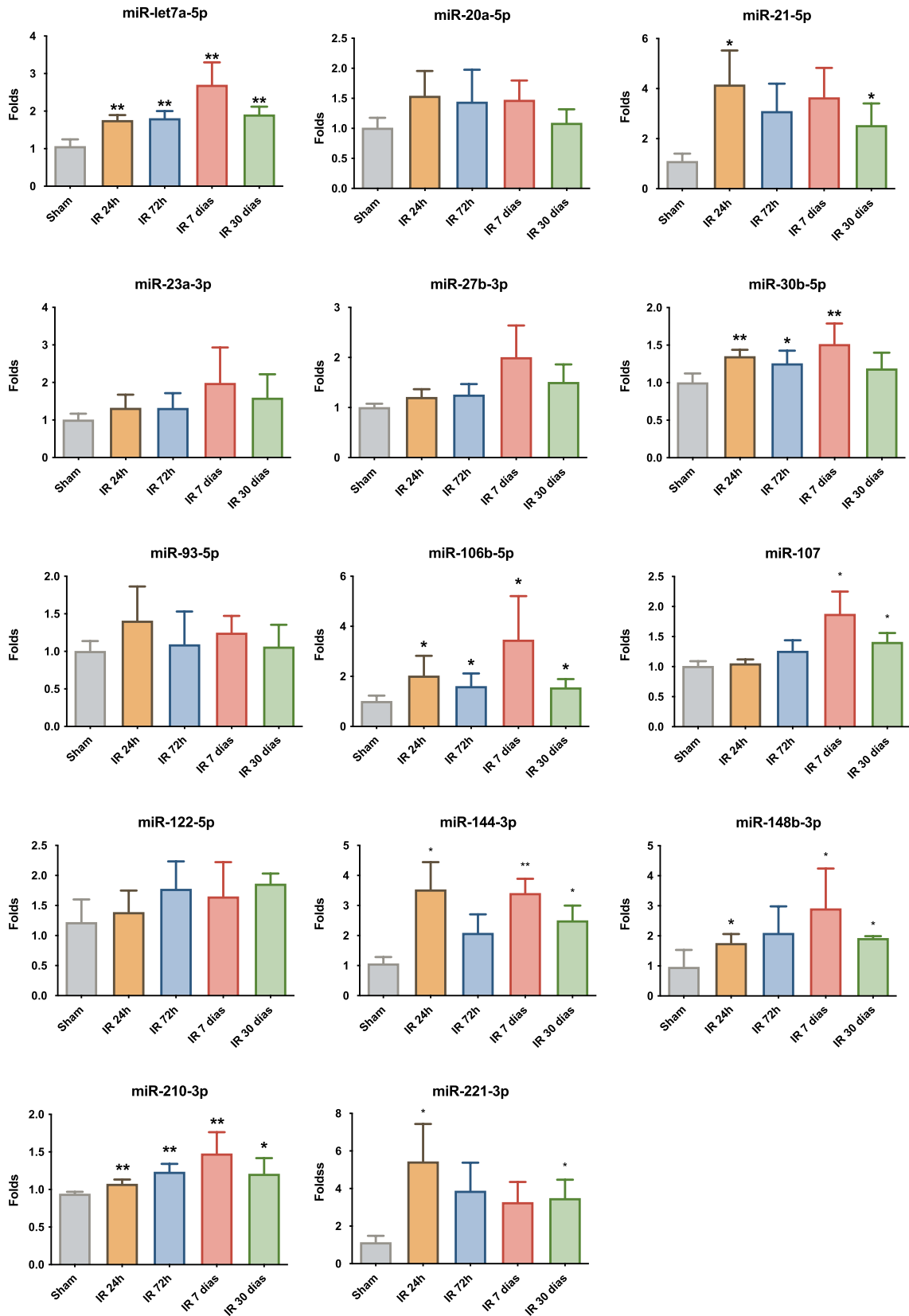


Figura 5.23. Expresión de miRNAs en tejido miocárdico procedentes de ratas sometidas a IAM por isquemia coronaria transitoria o isquemia-reperusión (I/R). Los niveles de expresión de miRNAs se muestran en folds, tomando como referencia el grupo sham. Se utilizó como housekeeping miR-30c. En la comparación entre grupos se considera estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (*) o < 0,01 (**).

5.3.2 Expresión de miRNAs en cardiomiocitos y sobrenadantes celulares

Se plantearon los estudios experimentales *in vitro* a fin de estudiar la expresión y el potencial mecanismo en el que están implicados los miRNAs y sus potenciales dianas, analizando exclusivamente cardiomiocitos. Utilizando como elemento de análisis el principal tipo celular constitutivo del tejido cardiaco, se pusieron en marcha distintos modelos celulares de privación de nutrientes y/o hipoxia en cardiomiocitos murinos H9c2, analizando en distintos tiempos (24h y 48h) los distintos miRNAs, genes y sus efectos.

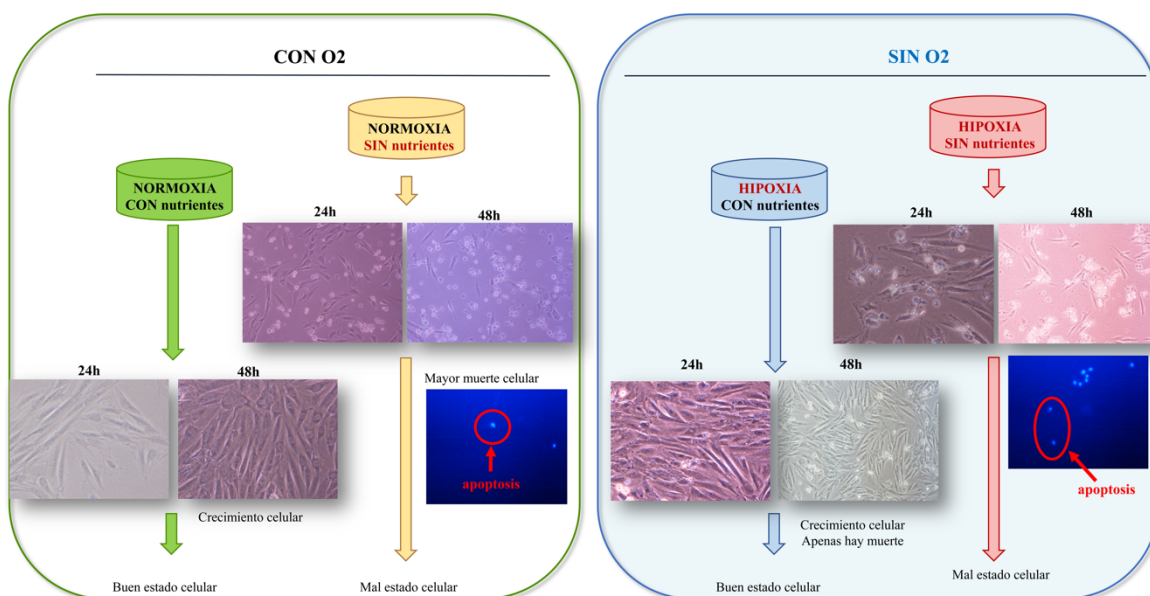


Figura 5.24. Microscopía óptica y tinción DAPI para la evaluación del cultivo celular, su morfología y viabilidad. Imágenes de microscopía óptica con 20 aumentos de las placas de cultivo a las 24 y 48 horas del inicio del modelo, así como tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) para tinción del DNA.

Como se muestra en las imágenes de microscopio de la Figura 5.24, el mayor grado de respuesta, tanto a 24 como a 48 horas, fue el objetivado en aquellos grupos celulares sometidos a privación de nutrientes en medio HBSS, con o sin hipoxia, que sufrieron mayor grado de muerte celular, incluyendo apoptosis, estimada tanto por estimación visual cualitativa como por cuantificación de rotura del DNA nuclear con tinción DAPI. Por el contrario, en los cultivos celulares en hipoxia en los que se mantuvo aporte de nutrientes con medio DMEM suplementado se mantuvo cierto grado de proliferación, con escaso número de células apoptóticas.

En estas condiciones, procedimos a analizar el nivel de expresión de los 14 miRNAs seleccionados en el sobrenadante celular (Figura 5.25), destinado a

- 1) servir como determinación *in vitro* de los valores obtenidos en suero procedente de sangre venosa, y así inferir los miRNAs de suero que proceden de la respuesta de los cardiomiocitos a la agresión,
- 2) determinar los cambios inducidos en los miRNAs en función del nivel de agresión celular y
- 3) estudiar el patrón temporal de expresión de los miRNAs. En la comparación entre grupos, constatamos cómo las mayores diferencias frente al grupo control se produjeron en los grupos experimentales sometidos a privación de nutrientes (con o sin hipoxia), mientras que el grupo hipoxia con aporte de nutrientes mostró valores similares al grupo de referencia en numerosos miRNAs: miR-let7a-5p, -20a-5p, -27b-3p, -30b-5p, -93-5p, -106-5p, -107, -122-5p, -144-5p, 148b-3p y -221-3p.

A nivel temporal, los resultados nos muestran el carácter evolutivo de gran parte de los miRNAs, con niveles de expresión en constante evolución a 24 y 48h. Se apreció la inducción (descenso en ΔC_T) de todos los miRNAs estudiados en respuesta a la agresión, a excepción de miR-122-5p y miR-144-5p, que se infraexpresaron en situaciones de privación de nutrientes.

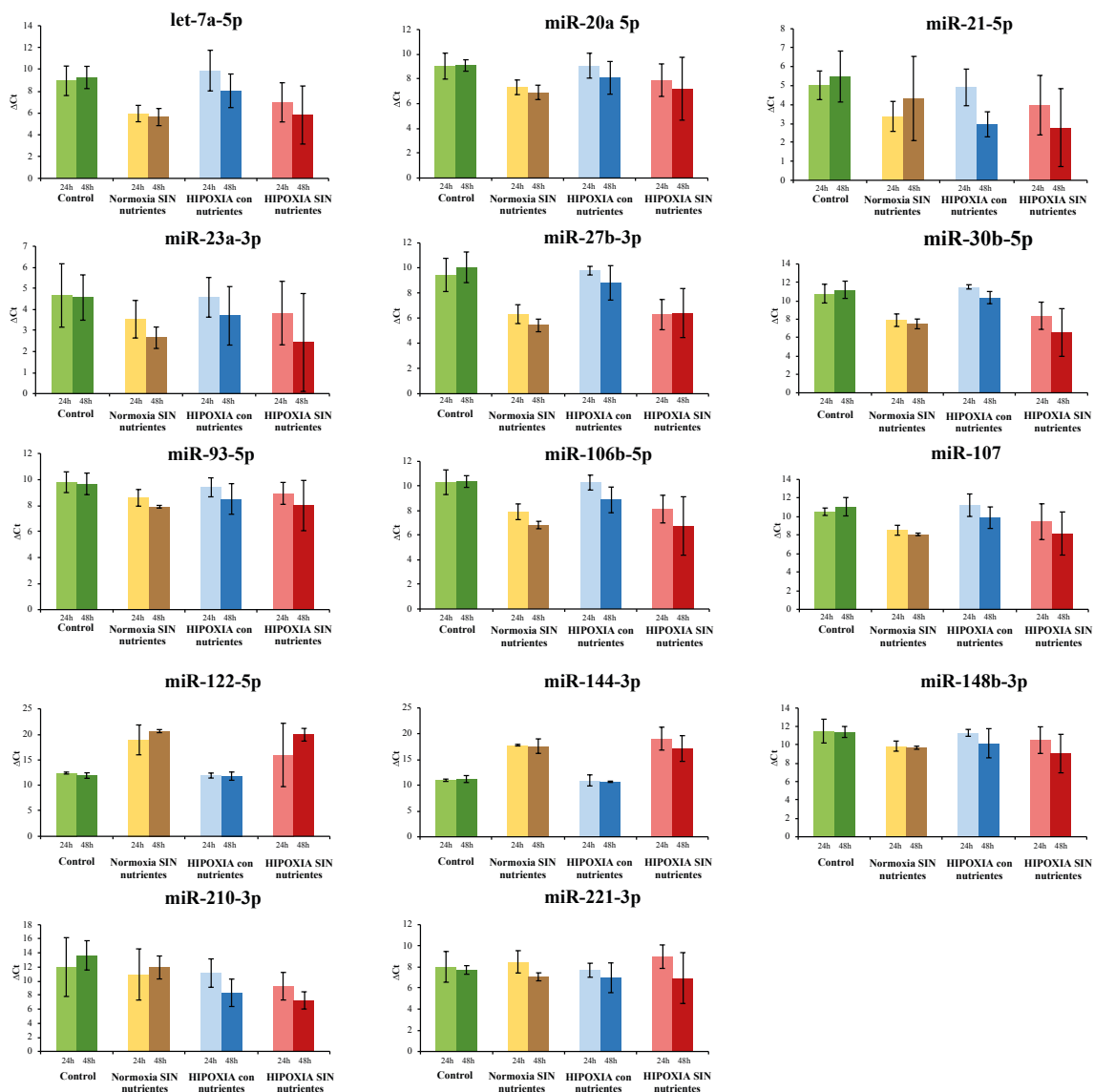


Figura 5.25. Expresión de miRNAs en sobrenadantes celulares en el modelo *in vitro*. Se muestran los niveles de expresión de miRNAs en sobrenadantes celulares a 24 y 48 horas en los distintos grupos del modelo experimental *in vitro* en cardiomiocitos H9c2: 1- control (normoxia con nutrientes), 2- normoxia sin nutrientes, 3- hipoxia con nutrientes, 4-hipoxia sin nutrientes. Los resultados se expresan como ΔC_t o intervalo del umbral de corte respecto al valor del normalizador, miR-191. Un incremento del valor del ΔC_t indica infraexpresión mientras que un valor menor es reflejo de sobreexpresión respecto al control.

De forma análoga a los procedimientos experimentales *in vivo*, se analizó la presencia de 2 genes marcadores ineludibles de hipoxia celular por la vía de HIF-1 α y HIF-2 α que son BNIP-3 y VEGF, respectivamente. Es importante reseñar que no se determina directamente HIF por qRT-PCR puesto que es una molécula con regulación a nivel traduccional preferentemente por hidroxilación y degradación de la proteína. Así, se estudiaron los niveles de expresión de VEGF, gen dependiente de HIF-2 α (y en menor

medida de HIF-1 α), y responsable de la síntesis del factor de crecimiento vascular endotelial, una glicoproteína vasoactiva involucrada en procesos de angiogénesis tras isquemia, y marcador de daño y estrés celular. También se estudiaron los niveles de expresión de BNIP3, gen dependiente de HIF-1 α y responsable de la síntesis de un grupo de proteínas proapoptóticas miembros de la familia Bcl2 que se encuentran muy presentes a nivel miocárdico y que han demostrado ser mediadores de daño miocárdico en situaciones de isquemia. Como se aprecia en la Figura 5.26, la expresión de VEGF se incrementó discretamente en los grupos de hipoxia o privación de nutrientes de forma aislada, multiplicándose cuando la agresión se llevó a cabo de forma combinada. En el caso de BNIP3, su principal inductor fue la hipoxia. Las células sometidas de forma combinada a privación de nutrientes e hipoxia presentaron descenso global a las 48h de ambos marcadores, reflejo de la intensa apoptosis que impide alcanzar los mismos niveles de expresión que a las 24h.

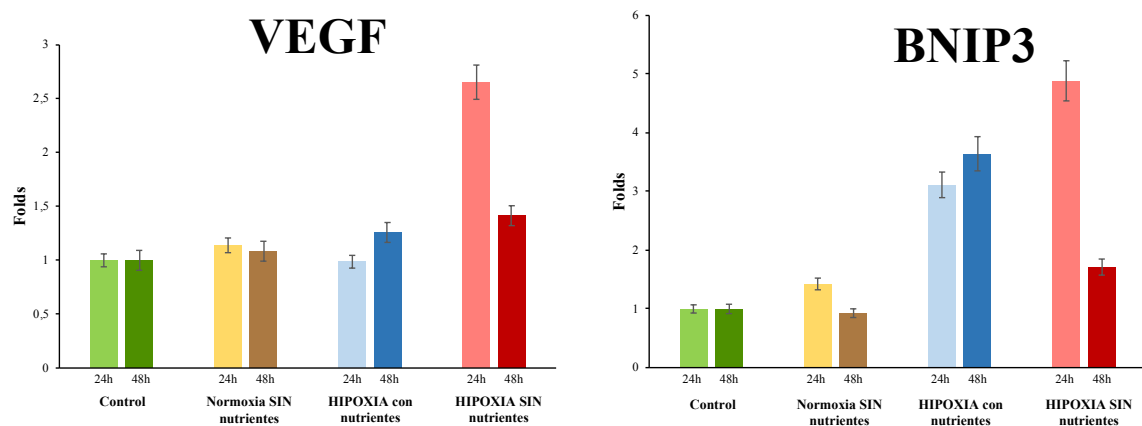


Figura 5.26. Niveles de expresión celular de los genes marcadores de hipoxia VEGF y de BNIP3 en los modelos *in vitro*. La expresión de estos genes se analiza mediante *qRT-PCR*, utilizando como *housekeeping* el gen ribosómico 28S. Se presenta el resultado como *folds* o número de veces respecto al valor del grupo control (normoxia con aporte de nutrientes).

Determinamos a nivel intracelular los niveles de expresión de los miRNAs, a fin de confirmar si su concentración intracelular refleja lo observado en sobrenadantes (Figura 5.27). Nuestros resultados indican que existe una buena correlación entre los valores observados a nivel intra y extracelular para los miRNAs más relevantes. Así, miR-210, sobreexpresado en sobrenadantes en respuesta a la privación de nutrientes y/o hipoxia, también presenta un incremento de expresión a nivel intracelular. El patrón de expresión fue diferente para cada miRNA, tal y como se había observado a nivel

extracelular, pero siguiendo algunas pautas y cambios dinámicos comunes. Es especialmente relevante de nuevo el comportamiento mostrado por miR-210-3p, cuyos valores se duplicaron a las 24 horas, multiplicándose más de 7 veces a las 48 horas. Se pudo apreciar un patrón de expresión similar en muchos de los miRNAs (miR-let7, -20a, -21, -23a, -27b, -30b, -93, -106b, -107, -122, -148b) en el grupo de normoxia con privación de nutrientes, donde se aprecia una sobreexpresión inicial seguida a las 48 horas de infraexpresión respecto al grupo control.

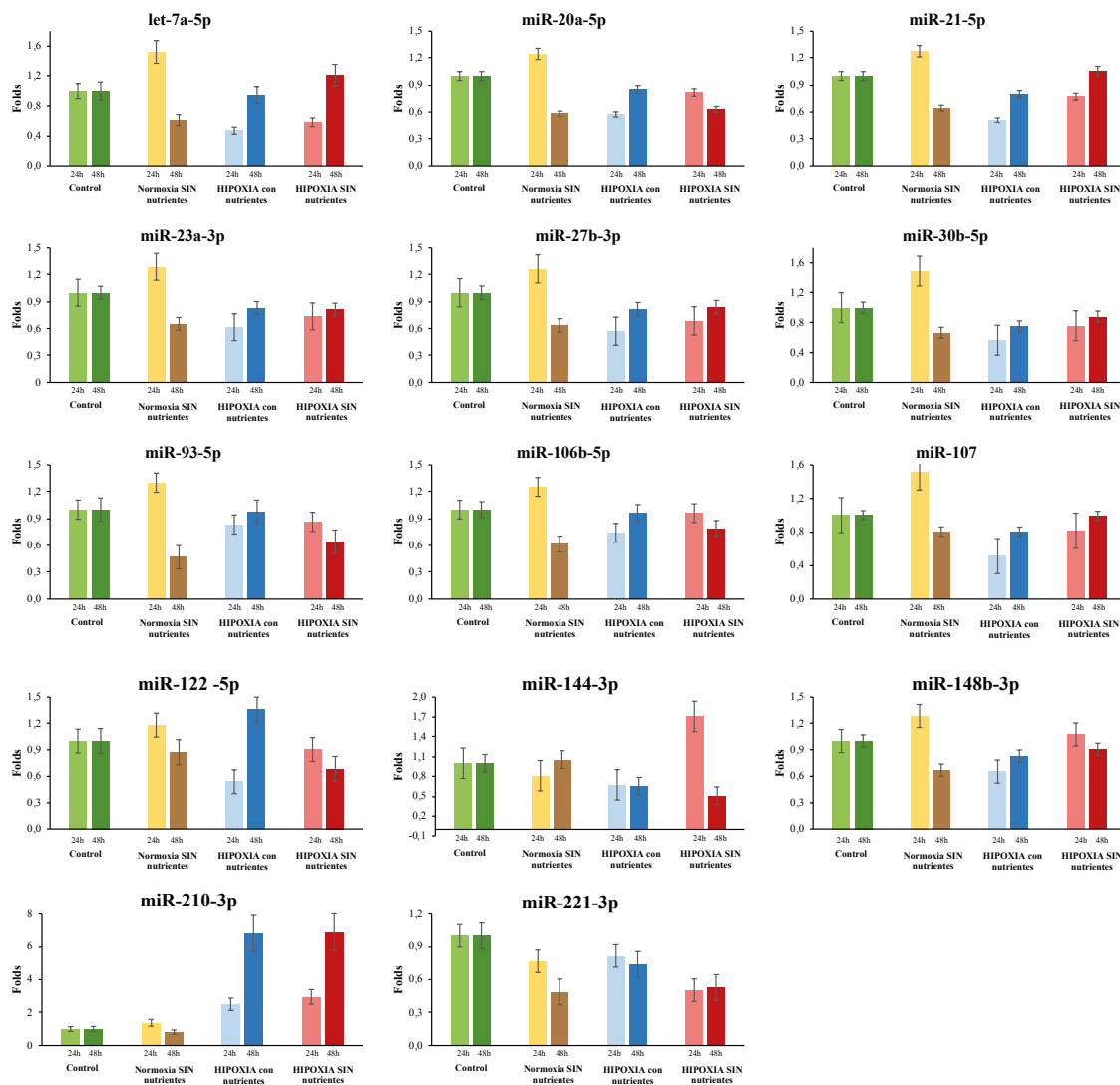


Figura 5.27. Expresión intracelular de miRNAs en el modelo *in vitro*. Se muestran los niveles de expresión de miRNAs a nivel intracelular, determinados a 24 y 48 horas en los distintos grupos del modelo experimental *in vitro* en cardiomiocitos H9c2, utilizando como housekeeping el snRNA U6. Los resultados se expresan como folds o número de veces respecto al valor del grupo control (normoxia con aporte de nutrientes).

5.4 Modulación experimental – miRNAs como mecanismos fisiopatológicos y potenciales dianas en IAM

Para la selección de los miRNAs a ser modulados en células, se realizó un estudio en su conjunto de los resultados descritos hasta el momento en pacientes con IAM, modelos *in vitro* y experimentos *in vivo*. Así, en pacientes se observó que 11 de los 14 miRNAs seleccionados presentaron expresión diferencial en IAM en humanos frente a controles sanos. De estos, 6 aparecieron de forma constante alcanzando la significación estadística en todas y cada una de las asociaciones planteadas frente parámetros clínicos o analíticos estudiados: clase Killip, score GRACE, niveles de troponina I, niveles de BNP y FEVI: miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-27b-3p, miR-107, miR-148b-3p, miR-210-3p.

Varios miRNAs tuvieron capacidad pronóstica independiente en pacientes con IAM: el análisis de supervivencia identificó como predictores independientes a 6 miRNAs para el *endpoint* primario, 8 miRNAs para muerte CV y 4 miRNAs como predictores de mala clase funcional NYHA. En su valoración conjunta destacaron miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-210-3p y miR-221-3p. Los procedimientos experimentales *in vivo* sirvieron para estudiar la cinética de expresión de estos miRNAs a nivel intra y extracelular tras un IAM, correlacionando los resultados con los obtenidos en pacientes y asociándolos con el análisis de la respuesta inflamatoria y remodelado ventricular procedente de las técnicas inmuno- e histoquímicas. Finalmente, los estudios *in vitro* sirvieron para sugerir el papel clave que juegan miR-210-3p y miR-23a-3p en respuesta celular a la hipoxia en cardiomiocitos, demostrando una adecuada correlación intra vs extracelular, así como los genes diana sobre los que podrían actuar.

De este análisis global emergieron miR-210-3p y miR-23a-3p como los más prometedores para el estudio de su modulación. El estudio de redes funcionales sitúa a ambos como reguladores clave de genes implicados en procesos biológicos fundamentales en la respuesta celular a isquemia, sin que presentaran niveles apreciables de colinealidad entre ambos ni por el estudio estadístico realizado a tal efecto ni por el análisis bioinformático de dianas terapéuticas conocidas.

Previo al inicio de la modulación, se realizaron nuevos cultivos celulares para analizar los niveles de expresión intracelular de los principales genes implicados en el desarrollo de apoptosis y progresión miocárdica hacia remodelado ventricular adverso.

Para ello se utilizó el mismo modelo *in vitro* planteado con anterioridad, centrado el análisis en la comparación entre el grupo control (normoxia y medio con nutrientes) y el grupo experimental (hipoxia con privación de nutrientes), estudiando los cambios a 24 y 48 horas (Figura 5.28). Los resultados de VEGF mostraron la inducción de hipoxia celular en el grupo experimental tanto a 24 como a 48 horas. El incremento de BCL2 a las 48 horas es indicativo de la puesta en marcha de mecanismos de control de apoptosis. En los casos en los que el daño celular es de carácter subletal se ponen en marcha mecanismos reguladores del proceso de transición epitelio-mesénquima hacia miofibroblastos, como el incremento de SLUG a las 48 horas. La puesta en marcha de mecanismos de fibrosis y remodelado ventricular adverso se confirmó a nivel tisular con el incremento mostrado por los genes de fibronectina y colágeno 1 α , que codifican sus respectivas proteínas de la matriz extracelular. A nivel celular, estos cambios fueron visualizados por el incremento mostrado por Vimentina, marcador de célula transicionada (fibroblástica).

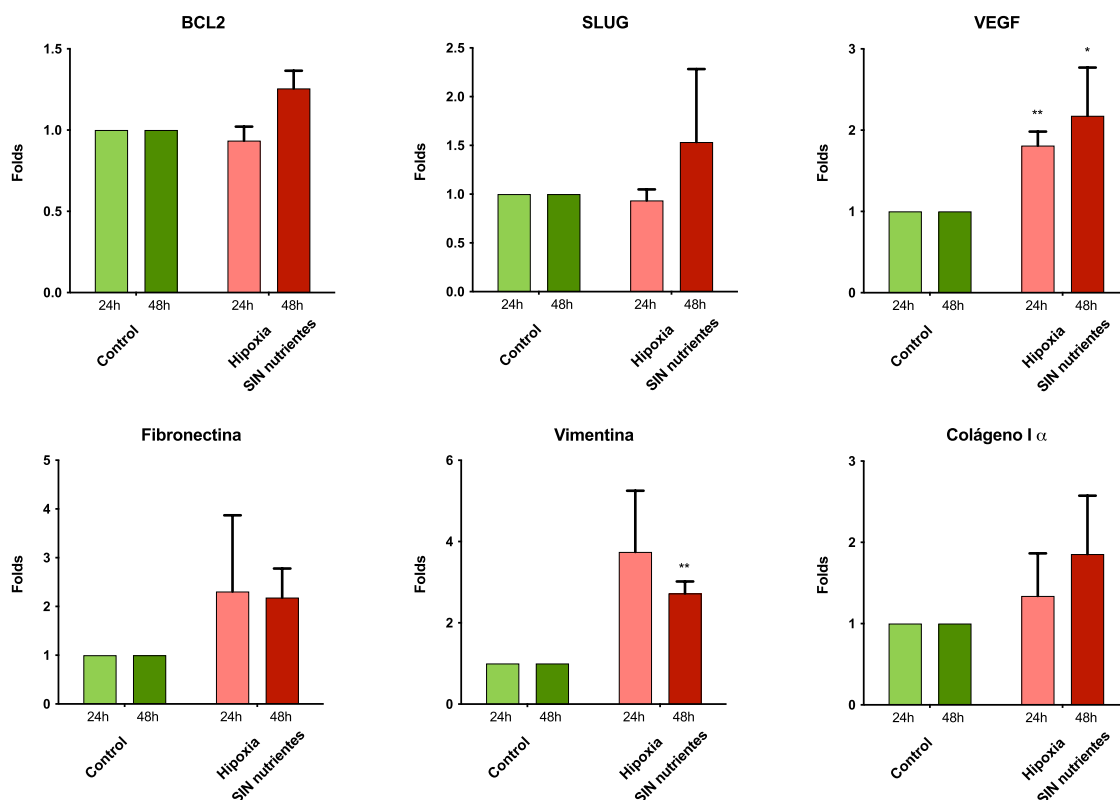


Figura 5.28. Expresión intracelular de genes en cardiomiocitos H9c2, previo a su modulación. Niveles de expresión de genes de interés a 24 y 48 horas para los grupos control (normoxia + aporte de nutrientes) y el grupo experimental equivalente a isquemia (hipoxia + privación de nutrientes). Se muestran genes relacionados con hipoxia (VEGF), apoptosis (BCL2), transición epitelio-mesénquima (SLUG y a nivel celular Vimentina) y fibrosis (Fibronectina y Colágeno I α).

5.4.1 Modulación de miR-210-3p

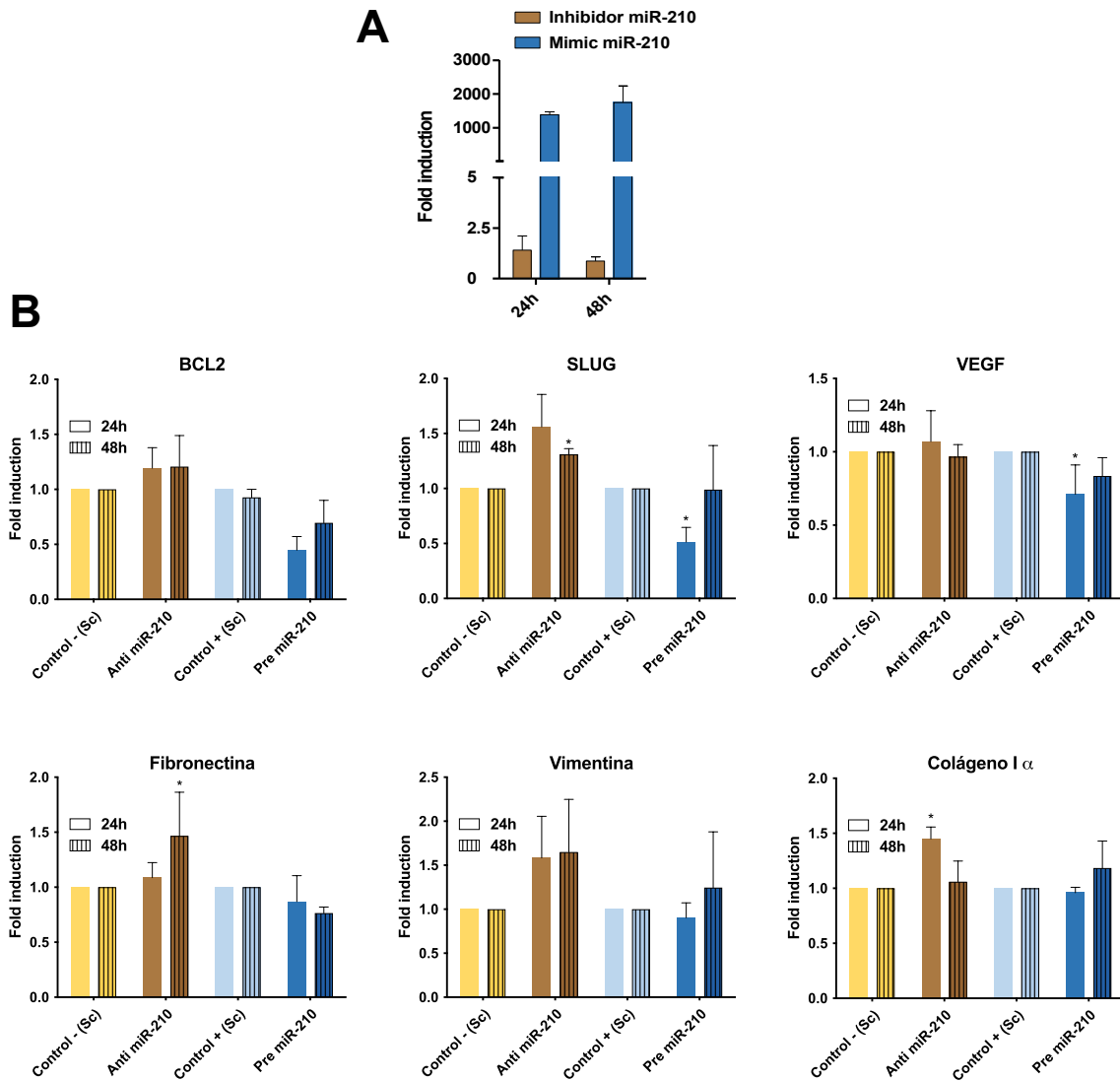
Una vez establecido que miR-210-3p emerge como biomarcador pronóstico clave en respuesta a un IAM, se evaluó el efecto de la modulación de este miRNA en algunos de los principales genes vinculados con la recuperación celular tras un evento isquémico agudo.

Para ello, inicialmente comprobamos la eficiencia de la transfección dirigida a la sobreexpresión e inhibición de miR-210-3p en cardiomiocitos H9c2 sometidos a hipoxia y privación de nutrientes. En la Figura 5.29 se muestra cómo tanto a las 24 como a las 48 horas de la transfección, miR-210-3p tenía un mayor nivel de expresión en los cultivos transfectados con el mimético (*Mimic* miR-210) que en los cultivos transfectados con anti-miR-210 (*Power inhibitor*), demostrando que la modulación de miR-210 es eficaz.

Tras esto, analizamos si la sobreexpresión o inhibición exógena de miR-210-3p inducía alguna variación en los niveles de expresión de los genes de interés en una situación de agresión celular de tipo isquémico. Así, se puede observar cómo el gen regulador de apoptosis BCL2 ve modificada su expresión con la modulación de miR-210 en las comparaciones frente a sus controles *scrambled* positivo y negativo. Siguiendo este análisis, también se identificaron modificaciones significativas en los niveles de expresión de los genes SLUG, VEGF, Fibronectina, Vimentina o Colágeno 1 α . El efecto del mimetizador fue menos marcado a las 48 horas que a las 24h, disminuyendo su efecto sobre los genes estudiados en la segunda determinación realizada.

Estos resultados suponen una prueba de concepto indicativa que la modulación de miR-210-3p logra modificar la expresión de genes con efecto antiapoptótico, inductores de neovascularización, ligados a procesos de transición epitelio mesénquima o depósito de proteínas de la matriz extracelular, que contribuyen al desarrollo de fibrosis.

A pesar de las limitaciones derivadas del tamaño muestral reducido actual, que impiden por el momento establecer conclusiones categóricas, los datos actuales reflejan como la modulación de miR-210 en cardiomiocitos sometidos a hipoxia/privación de nutrientes tiene la capacidad de estimular genes en un sentido que se minimicen la apoptosis y contribuyan al mantenimiento del fenotipo miocárdico.



5.4.2 Modulación de miR-23a-3p

Siguiendo la misma metodología, evaluamos si la modulación de miR-23a-3p se asocia con cambios en la expresión intracelular de los genes a estudio.

Como primer paso se comprobó la eficacia de la transfección mediante la utilización de un inhibidor (*Power Inhibitor*) y un mimético (*Mimic*) específico para miR-23a-3p, midiendo sus niveles de expresión a 24 y 48 horas. En la figura 5.30 se aprecia como la expresión de miR-23a-3p se multiplica en los cultivos transfectados con el mimético, frente a los niveles prácticamente indetectables en los transfectados con su inhibidor. Esto demuestra que tanto la sobreexpresión como la inhibición exógena de miR-23a son eficaces en nuestro modelo, analizado a las 24 y 48 horas.

El siguiente paso fue el estudio de los genes relacionados con apoptosis, fibrosis y transición epitelio-mesénquima. Así, en comparación con sus controles *scrambled*, observamos como BCL2, SLUG, Vimentina y colágeno 1 α aumentan marcadamente su expresión en condiciones de inhibición del miRNA, de carácter más marcado a las 48 horas. En contraste, el uso de un Pre miR o mimético se asoció a un descenso significativo en la expresión de VEGF y fibronectina.

Valorados conjuntamente, estos hallazgos son indicativos de que los genes estudiados pueden ser *targets* biológicos de miR-210-3p y de miR-23a-3p, y que estos miRNAs, entre otros, son capaces de modificar la respuesta a la isquemia través de la regulación de sus genes diana, claves para determinar la respuesta celular y tisular a la agresión isquémica.

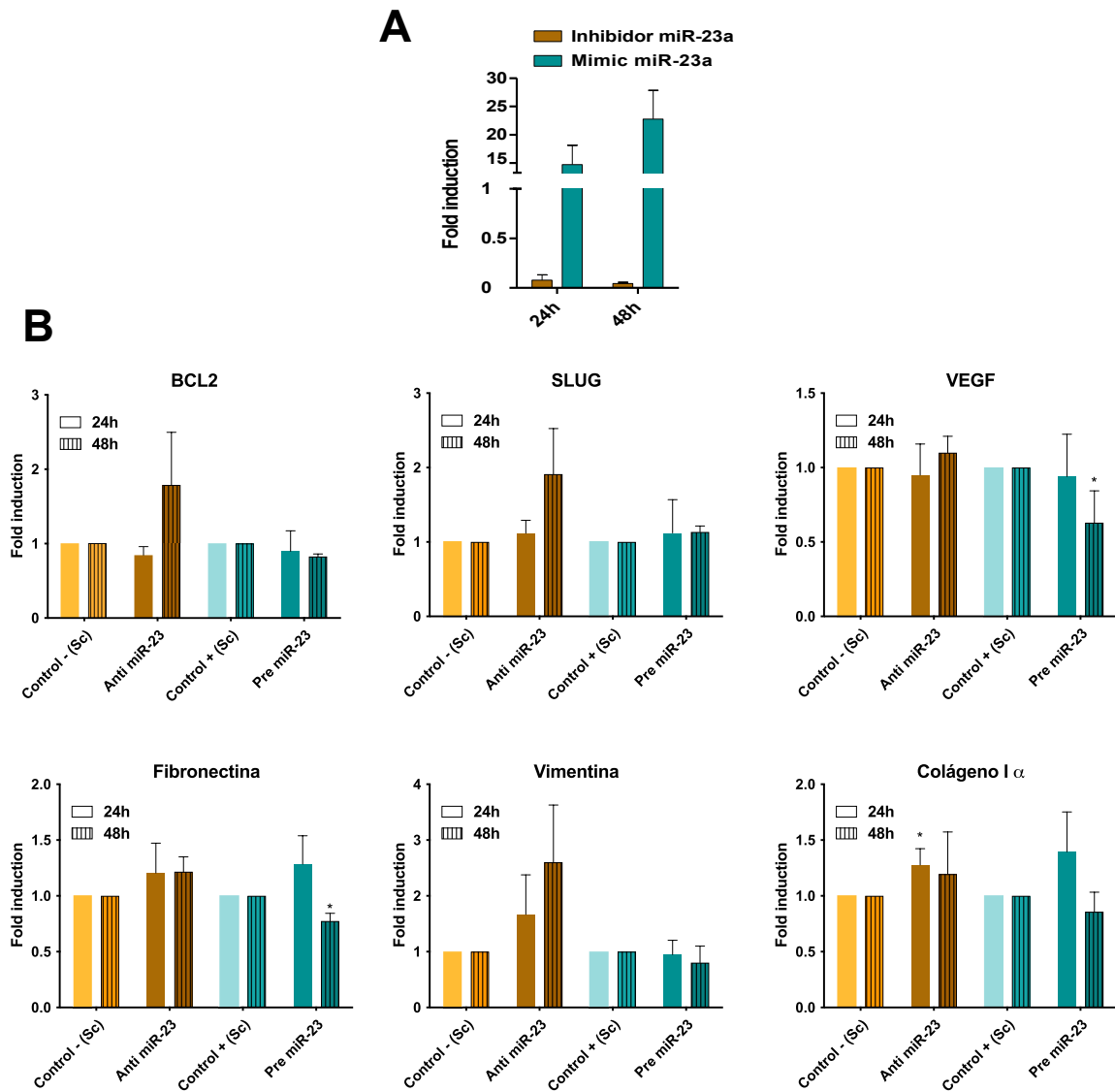


Figura 5.30 Modulación *in vitro* de miR-23a-3p en H9c2 y expresión de genes asociados a apoptosis, transición epitelio mesénquima y fibrosis. Las células H9c2 fueron transfectadas con Anti-miR-scrambled (Control negativo), Anti-miR-23a-3p, Pre-miR-scrambled (Control positivo) y Pre-miR-23a-3p. La condición scrambled se considera como control comparativo. **A.** Comprobación de la eficiencia de la transfección mediante qRT-PCR, expresada en número de veces de inducción (folds): un menor valor de las veces de inducción, en presencia de Anti-miR-23a, demuestra menor expresión de miR-23a, mientras que un mayor valor con su mimético, traduce una mayor expresión. **B.** Se muestra la expresión de genes diana como veces de inducción, determinadas a 24 y 48 horas.

6. DISCUSIÓN

La presente Tesis Doctoral constituye un abordaje exhaustivo y traslacional del papel pronóstico de dos familias de reguladores de base génica involucrados en el IAM: SNPs y miRNAs. Mediante una investigación traslacional, en la que se pusieron en marcha sucesivos modelos clínicos y experimentales *in vitro* e *in vivo* ha sido posible obtener datos determinantes acerca del papel pronóstico y regulador que estos biomarcadores génicos juegan en la aparición de nuevos eventos cardiovasculares tras un IAM. Estos resultados clarifican aspectos previamente desconocidos sobre el papel de los miRNAs en la respuesta miocárdica ante un evento isquémico agudo, en concreto, su papel como marcadores de evolución desfavorable y los mecanismos que les confieren esta capacidad. También hemos documentado la importancia de cuantificar el riesgo residual de origen genético tras IAM, proponiendo la utilización de una escala de riesgo poligénico basado en SNPs.

Hemos identificado y validado, de forma inédita, una combinación de miRNAs como biomarcadores con utilidad pronóstica, capaces de identificar a pacientes con mayor riesgo de desarrollo de insuficiencia cardíaca y mortalidad cardiovascular a largo plazo tras un IAM. Mediante la aplicación de un ambicioso estudio clínico prospectivo y sucesivos modelos experimentales,¹⁴⁶ hemos documentado cómo la información proporcionada por estos miRNAs es independiente y adicional a ofrecida por las variables clínicas, mejorando todas las estrategias de predicción de riesgo clínico disponibles en la actualidad. Los hallazgos en los modelos experimentales correlacionan los resultados obtenidos en pacientes, validando estos modelos experimentales para el estudio de las bases génicas y moleculares por las que los miRNAs ejercen el papel regulador que les dota de utilidad pronóstica. La modulación exógena en células de dos de los miRNAs más prometedores indujo cambios en la expresión en varios genes diana fundamentales para el proceso de apoptosis y remodelado ventricular adverso tras IAM. La implicación clínica

de estos hallazgos puede resultar de enorme interés, tanto con fines diagnósticos como la posible identificación de nuevas dianas terapéuticas.

Adicionalmente, hemos podido demostrar cómo la cuantificación del riesgo genético mediante una escala de riesgo poligénico -GRS- en pacientes con infarto puede tener utilidad clínica para la predicción de eventos cardiovasculares recurrentes en prevención secundaria.⁸⁸ Esta es la primera serie en población española que evalúa una escala de riesgo genético basada en múltiples SNPs en una población homogénea de pacientes jóvenes con IAM y una alta probabilidad de susceptibilidad genética para su recurrencia. La implementación del GRS fue clínicamente útil para la predicción de riesgo de eventos recurrentes con independencia de otras variables, y mejoró los modelos clínicos de estratificación de riesgo. Los resultados obtenidos en este estudio sirven como prueba de concepto para la implementación de herramientas genéticas en prevención secundaria tras un infarto de miocardio.

En esta sección se discuten también los resultados sobre el papel que desarrollan los miRNAs en el desarrollo y evolución del IAM, con especial énfasis a su carácter pronóstico para eventos relacionados con la insuficiencia cardiaca. Se interpretan los mecanismos por los que determinados miRNAs modulan la respuesta a una agresión de tipo isquémico, así como el efecto potencial a nivel celular producido por su modulación. Se analiza en detalle el papel que las estrategias de cuantificación del riesgo genético determinado por SNPs juegan en la estratificación pronóstica en pacientes con IAM. Se enfatiza el carácter independiente proporcionado tanto por la escala de riesgo poligénico como por varios de los miRNAs identificados en nuestro estudio. Finalmente, discutiremos las implicaciones clínicas y potencial traslacionalidad de los hallazgos realizados, para finalmente reseñar las limitaciones de cada uno de los modelos clínicos, experimentales y de análisis empleados.

6.1 Riesgo genético poligénico y predicción de eventos tras IAM

En nuestro estudio, un GRS validado en prevención primaria, compuesto por 11 variantes genéticas que incluyen 8 SNPs y 1 haplotipo, tuvo capacidad de predecir eventos cardiovasculares recurrentes en una cohorte de pacientes jóvenes no diabéticos con IAM seguidos durante 4,1 años. Un mayor riesgo genético se asoció con un mayor riesgo de presentar el *endpoint* primario del subestudio, definido como evento recurrente, viéndose en gran medida influenciado por los niveles basales de colesterol-LDL. La incorporación de una estimación del riesgo genético con GRS, mejoró el rendimiento clínico de un modelo clínico compuesto por el *score* GRACE y el C-LDL, incluyendo el estadístico C (ΔC 0,086). La población incluida en el estudio partía de una alta probabilidad para tener susceptibilidad genética a la enfermedad coronaria dados los criterios de selección establecidos. Este aspecto fue confirmado al presentar los pacientes jóvenes no diabéticos con IAM una prevalencia de casi el doble para la mayor parte de las variantes de riesgo analizada frente a población general del mismo grupo étnico. Aunque las puntuaciones de riesgo poligénico ya habían demostrado su utilidad clínica en prevención primaria, su uso en prevención secundaria cardiovascular era muy poco conocido.

Muchos de los SNPs identificados en de los grandes GWAS están relacionados con la enfermedad cardiovascular aterosclerótica a través de su efecto sobre factores de riesgo concretos, y en menor medida, directamente con IAM.¹⁴⁷ La fisiopatología de la enfermedad arterial coronaria y del IAM no es idéntica, teniendo un mayor peso los mecanismos trombóticos en el IAM que en el síndrome coronario crónico estable. Esto puede explicar, al menos parcialmente, los diferentes resultados observados en los estudios que evalúan los GRS en prevención primaria frente a los que los han analizado en prevención secundaria. Los SNPs incluidos en nuestro estudio actúan por vías independientes de los factores de riesgo cardiovascular clásico, o bien su mecanismo es desconocido.⁸³ Aunque ninguno de las variantes estudiadas incrementa el riesgo a través de la vía del colesterol, la interacción entre el riesgo genético y los niveles de C-LDL ya había sido descrita con anterioridad, sin que estén clarificadas sus causas.¹⁴⁸

Los estudios que en el pasado han evaluado de forma individual diversos SNPs para determinar su capacidad para la predicción de eventos cardiovasculares recurrentes

tras un SCA mostraron inicialmente una buena capacidad predictiva. Sin embargo, estos resultados rara vez lograba ser replicados con posterioridad. En un estudio,¹⁴⁹ un SNP individual en el locus 9p21 se asoció inicialmente con recurrencias tras IAM, pero un meta-análisis posterior descartó que ejerciese ninguna influencia sobre el riesgo de eventos recurrentes.¹⁵⁰ Otra variante en un SNP identificada en el gen ABO mejoró débilmente un modelo clínico de predicción de riesgo de recurrencias en otro estudio,¹⁵¹ pero este hallazgo tampoco ha sido replicado posteriormente.¹⁵²

Los SNPs asociados con enfermedad arterial coronaria son comunes. Los datos proporcionados por los GWAS ya indican que cada uno de ellos, estimado individualmente, tiene un efecto pequeño en el incremento de riesgo cardiovascular. La acumulación de más de 50 loci independientes con variantes asociadas con mayor riesgo coronario, y la necesidad de integrar la información proporcionada por cada uno de ellos, llevó al desarrollo de los *scores* de riesgo genético poligénico (GRS). Los GRS se diferencian entre sí por el número y combinación de SNPs incluidos, así como la ponderación que cada uno de estos SNPs representa sobre el riesgo total estimado.

Hasta la fecha, pocos estudios habían evaluado los GRS en prevención secundaria cardiovascular, y la evidencia era conflictiva. Labos et al.¹⁵³ fue incapaz de encontrar asociación entre un GRS compuesto por 30 SNPs y el riesgo de eventos recurrentes a corto plazo (<12 meses tras SCA). Aunque estos autores concluyen que el mecanismo causal de las recurrencias precoces puede ser diferente al de eventos posteriores (lo que limitaría la utilidad del estudio genético), hay varias explicaciones alternativas posibles: i) las variantes que componían el GRS empleado cubrían principalmente genes asociados con la trombosis arterial, siendo la terapia antitrombótica intensiva uno de los principales pilares del tratamiento tras un IAM, por lo que es plausible que una vez instaurado un tratamiento contra esta vía, el riesgo residual asociado a esas variantes quede mitigado;¹⁴⁷ ii) el GRS empleado carecía de una validación previa en población general (en prevención primaria), y todos los SNPs incluidos procedían directamente de estudios GWAS, dejando de lado otras variantes de riesgo ya conocidas sobre las que se estima que procede otra gran parte de la susceptibilidad genética.¹⁵⁴ En nuestro estudio, hemos utilizado intencionadamente un GRS que había sido previamente validado para la predicción de enfermedad arterial coronaria en prevención primaria y compuesta de SNPs *a priori* no relacionados con factores de riesgo concretos cuya vía pudiera quedar bloqueada por el tratamiento instaurado. En línea con nuestro estudio, Mega et al.¹⁴⁸ sí

encontró asociación entre categorías de riesgo genético basadas en un GRS de 27 SNPs y el riesgo de eventos incidentes y recurrentes entre pacientes incluidos en varios ensayos clínicos de estatinas; en su estudio, el beneficio de las estatinas fue superior en pacientes con riesgo genético elevado o intermedio. Estos autores sugieren que la carga de riesgo genético debería constituirse como un foco directo de atención, dado que en población con susceptibilidad genética tiene, por una parte, un mayor riesgo de recurrencias, y por otra obtiene un mayor beneficio del tratamiento. Nuestros resultados están en línea con estos hallazgos, y han replicado por primera vez la capacidad de un GRS de predecir eventos cardiovasculares recurrentes, ligando su efecto con la dislipemia. Finalmente, Vaara et al.¹⁵² evaluaron 2 GRS diferentes basados en 47 y 153 SNPs, respectivamente; mientras que el GRS-47 mostró algunos resultados positivos, el GRS-153 no lo hizo, y ninguno de ellos se asoció con el evento compuesto primario ni fueron capaces de mejorar sustancialmente los modelos de predicción de riesgo; estos autores mencionan como limitación propia de su estudio el reducido número de pacientes jóvenes en los que consideran que podría predominar el riesgo de origen genético.

Existen varios factores que pueden influir en el distinto rendimiento observado por los GRS: entre ellos la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas y el diferente tiempo de seguimiento tomado en consideración. También, aunque muchos estudios han utilizado un objetivo compuesto para su análisis primario, existen diferencias en la definición del término “recurrencia”, lo que dificulta las comparaciones; finalmente, un origen étnico diferente al europeo, el más estudiado con gran diferencia, está expuesto a un perfil de expresión de variantes de riesgo diferente.

Una cuestión importante y aún no resuelta es el número de variantes a tomar en consideración en los *scores* poligénicos.¹⁵⁵ Los GRS compuestos por un mayor número de variantes intentan abarcar una mayor proporción de la susceptibilidad genética. Sin embargo, estudios comparativos entre GRS formados por distinto número de variantes han mostrado consistentemente peor capacidad predictiva con aquellos de más de unas decenas de SNPs.^{83,152} Se ha hipotetizado que esto se produce por la introducción de “ruido” o anulación entre sí de algunas variantes. La realidad es que la variabilidad genética explicada por las variantes conocidas hasta ahora se considera inferior al 30%, por lo que el concepto “hereditabilidad perdida” sigue estando sobre la mesa.¹⁵⁶ Con la bajada de costes asociados a la secuenciación del genoma completo, algunos estudios han incrementado exponencialmente el número de variantes analizadas, que han pasado de

menos de 100 en la práctica totalidad de las publicaciones a más de 6 millones de variantes en algunos casos actuales.¹⁵⁷ Queda por demostrar si esta ampliación en el número de variantes permite explicar un mayor porcentaje de la susceptibilidad genética a la cardiopatía isquémica, sin duda una enfermedad con un patrón genético complejo.

Hemos confirmado que la población de pacientes con IAM precoz parte de una mayor predisposición genética frente a población general, documentado por su mayor prevalencia en la práctica totalidad de las variantes de riesgo analizadas. Otros estudios focalizados en pacientes jóvenes con IAM estudiados con GRS han observado como un riesgo genético elevado multiplica el riesgo de un primer IAM en 3-4 veces, siendo similar al efecto de la hipercolesterolemia familiar, pero con una prevalencia 10 veces superior.¹⁵⁸ Un aspecto destacable es que no hemos encontrado asociación entre un mayor riesgo genético determinado por el GRS y la existencia de antecedentes familiares de cardiopatía isquémica precoz. Este hecho, consistentemente repetido en la literatura enfatiza el valor independiente que aporta la cuantificación del riesgo genético respecto a la información clínica.¹⁵⁹

Entre las fortalezas del modelo planteado podemos destacar la inclusión de una población homogénea con alta probabilidad de tener predisposición genética al IAM, el estudio exhaustivo de la información clínica y biohumoral, así como un seguimiento completo a largo plazo. El TC cardiaco con *score* de calcio y análisis de placa ofrece también un vehículo sin precedentes para la caracterización de la enfermedad subyacente y su posible vínculo con el perfil genético del paciente.

Genética y marcadores de gravedad de la enfermedad coronaria aterosclerótica

Este trabajo ofrece la primera descripción conjunta en la literatura entre variantes genéticas de riesgo y las características de las placas ateroscleróticas evaluada por TC coronario en pacientes con IAM. No se objetivó que un mayor riesgo genético determinado por GRS se asociara a un mayor número de placas coronarias, vasos o cantidad de calcio coronario. En nuestro estudio, la presencia de calcificaciones coronarias y enfermedad multivaso-multisegmento fue mayor de la descrita en esta población, en comparación con otros estudios que utilizaron angiografía coronaria invasiva para caracterizar las lesiones no culpables.⁶⁸ Esto puede ser reflejo de que incluso en pacientes jóvenes con un evento clínico agudo, los fenómenos de aterosclerosis preclínica llevan un largo tiempo de evolución. No obstante, el valor clínico que

obtuvimos de la información proporcionada por el TC cardiaco en pacientes con IAM fue limitado: mientras que el número de placas coronarias mostró una tendencia hacia un mayor riesgo de eventos, el *score* de calcio no lo hizo. Esto es posiblemente reflejo de la fisiopatología más habitual del SCA, ocasionado por la rotura de una placa no estenótica rica en lípidos más que por lesiones crónicas calcificadas. Nuestros hallazgos en pacientes con IAM contrastan con los observados en la literatura en prevención primaria de pacientes no tratados y con antecedentes familiares de cardiopatía isquémica precoz, en quienes el *score* de calcio coronario sí fue predictor de un primer evento.¹⁶⁰

También se evaluó, de forma inédita en IAM, la posible relación entre el riesgo genético y los niveles de MMPs, descritos como mediadoras de rotura de placa y fenómenos aterotrombóticos. Las MMPs se encuentran incrementadas en IAM, y han sido propuestas como predictores de insuficiencia cardíaca y remodelado ventricular adverso.¹⁶¹ En nuestro estudio, MMP-7, MMP-10 y TIMP-1 se relacionaron con un infarto de miocardio más grave en fase aguda, pero carecieron de la capacidad predictiva independiente mostrada por el GRS.

¿Es necesario mejorar los *scores* de estratificación de riesgo actuales?

La necesidad de disponer de estimadores del riesgo de eventos isquémicos a largo plazo más precisos ha sido puesta en evidencia por ensayos clínicos aleatorizados como el *Australian GRACE Risk score Intervention Study* (AGRIS), en el que la utilización estandarizada del *score* de GRACE en pacientes con SCASEST no fue capaz de disminuir la aparición de eventos en el seguimiento, siendo esto atribuido a los cambios en los factores que determinan su advenimiento en la actualidad frente a finales del siglo XX, cuando este *score* fue diseñado.¹⁶²

La incorporación del riesgo genético puede también proporcionar una mejor contextualización al uso de *scores* clínicos. A lo largo de los últimos lustros ha sido preciso recalibrar determinados algoritmos pronósticos para adaptarlos a cambios en tendencias temporales y geográficas. Son conocidos algunos trabajos que documentaron la inadecuada estimación del riesgo de mortalidad cardiovascular de escalas pronósticas como la puntuación SCORE en población española,¹⁶³ o la necesidad de adaptar el *score* GRACE a determinados grupos de riesgo, etnias y a los cambios en los condicionantes de eventos derivados de la incorporación de terapias más efectivas en prevención secundaria.^{164,165}

Como resumen de este apartado, podemos decir que en los últimos 15 años se han vivido grandes avances en el estudio de las bases genéticas subyacentes a la cardiopatía isquémica. Actualmente, estamos viendo algunas de sus primeras aplicaciones clínicas, como la reestratificación del riesgo, la identificación de nuevas dianas terapéuticas (PCSK9) o pacientes respondedores a terapias concretas. El surgimiento de los *scores* de riesgo poligénico es reflejo de la capacidad de la genética para convertirse en una herramienta clave la medicina personalizada, mejorando la predicción de riesgo y las estrategias terapéuticas.

6.2 Desregulación de miRNAs en isquemia miocárdica e implicaciones pronósticas

Hemos evaluado el papel que desarrollan varios microRNAs en el desarrollo de un IAM, los mecanismos que regulan su expresión en la recuperación miocárdica tras la isquemia y su potencial efecto a nivel pronóstico. Más específicamente, hemos analizado en detalle: 1) su capacidad para constituirse como biomarcadores específicos en IAM, 2) si su determinación aporta un valor pronóstico significativo e independiente y 3) la posibilidad de que se constituyan como nuevas dianas terapéuticas, analizando los efectos de su modulación en modelos experimentales.

En la sección de Resultados, se muestra, por primera vez, el valor pronóstico de un grupo de miRNAs para identificar, de forma independiente y en el seno de un IAM, a pacientes que van a presentar un mayor riesgo de eventos relacionados con la insuficiencia cardiaca en el seguimiento a largo plazo. En el estudio prospectivo planteado con pacientes ingresados por IAM se identificaron una serie de miRNAs asociados de forma independiente de otras variables clínicas con mortalidad cardiovascular, hospitalizaciones por insuficiencia cardiaca y una peor clase funcional NYHA a largo plazo. La información proporcionada por los miRNAs tiene carácter inédito, y con capacidad de complementar a otros parámetros clínicos y bioquímicos. Utilizando modelos estadísticos avanzados, hemos podido demostrar la capacidad de algunos de los miRNAs estudiados (tanto individual como colectivamente) para mejorar los modelos clínicos de predicción de eventos a largo plazo actualmente disponibles.

El valor pronóstico de los miRNAs en pacientes con IAM ha sido poco estudiado hasta el momento, aunque se trata de un campo muy activo de investigación. En nuestro trabajo, y basándonos en un riguroso proceso de selección que no partía de asunciones *a priori* seleccionamos, de los 752 miRNAs iniciales, a 14 miRNAs como candidatos para su estudio de validación en nuestra cohorte global de 311 pacientes con IAM. En los modelos de Cox planteados, encontramos asociación independiente entre 6 miRNAs (miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-27b-3p, miR-122-5p, miR-210-3p y miR-221-3p) y el *endpoint* primario combinado de hospitalización por insuficiencia cardiaca o muerte cardiovascular. De esta forma, las tasas de eventos se duplicaron por cada incremento en la desviación estándar (SD) para miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-210-3p y miR-221-3p, y se incrementaron en más del 50% para miR-27b-3p y miR-122-5p. Más aún, la combinación de varios miRNAs mejoró consistentemente el rendimiento de cada uno de los 6 modelos multivariantes que fueron planteados, certificando su capacidad pronóstica, independientemente del tipo de ajuste que pudiera realizarse, tal y como se objetivó por mejorías sustanciales en el IDI y el cNRI.

Es reseñable destacar el valor específico que aportó cada uno de los miRNAs seleccionados, que aportaron información sin solaparse entre sí. Este hecho, constatado por el bajo nivel de correlación entre los 14 miRNAs estudiados (ver valores bajos de rho de Spearman en Tabla 5.15) pudo ser conseguido gracias al criterio de selección empleado que se detalló en la sección de Métodos. Brevemente, se siguió una aproximación estadística y bioinformática en la que se potenció la selección de miRNAs involucrados en diferentes vías funcionales.

En el análisis planteado para los *endpoints* secundarios, también identificamos una asociación independiente entre 8 miRNAs y un mayor riesgo de mortalidad: miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-27b-3p, miR-106b-5p, miR-107, miR-122-5p, miR-210-3p y miR-221-3p. Las tasas de mortalidad ajustada se multiplicaron por más de 2 por cada incremento de 1 SD para miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-27b-3p, miR-107 y miR-210-3p en todos los modelos multivariantes estudiados. Adicionalmente, los niveles de 3 miRNAs, miR-23a-3p, miR-210-3p y miR-221-3p, se asociaron tanto con hospitalizaciones por insuficiencia cardiaca como con una peor clase funcional NYHA determinada al final del seguimiento.

Es preciso recalcar que el valor pronóstico ofrecido por estos miRNAs fue aditivo e independiente al ofrecido por el resto de parámetros. Los *scores* de riesgo actuales en IAM tienen un valor muy limitado para predecir complicaciones a largo plazo, más aún si

están relacionadas con insuficiencia cardiaca. Por lo tanto, la posibilidad de mejorar el reconocimiento de qué pacientes con IAM van a presentar un mayor riesgo de eventos por insuficiencia cardiaca en el seguimiento a largo plazo representa un objetivo abordable para poder ofrecer terapias lo más adecuadas posibles.

No todos los miRNAs estudiados en el proceso de validación demostraron expresarse de forma diferente en pacientes con IAM, identificando a 3 (hsa-let-7a-5p, miR-144-3p y miR-93-5p) que, a pesar de nuestras apreciaciones iniciales y alguna descripción en la literatura, adolecieron de especificidad en el contexto de IAM frente a población sana.^{166–168}

6.3 miRNAs como mediadores fisiopatológicos del IAM: estudios en modelos experimentales

Los modelos experimentales realizados en animales, tanto de oclusión permanente como de isquemia-reperusión, mostraron que la expresión de la práctica totalidad de los miRNAs seleccionados se veía modificada en los animales sometidos a IAM frente a los sometidos a cirugía simulada o *sham*. Los cambios de expresión asociados al daño isquémico agudo validan estos modelos experimentales para estudios de estos miRNAs, y que los resultados puedan ser posteriormente trasladados a pacientes.¹⁶⁹ En las ratas sometidas a IAM sin reperusión, el incremento nivel de producción y expresión intracelular de miRNAs se detectó ya a las 24 horas, alcanzando su máximo nivel a las 72 horas. Esto contrasta con el retraso en la expresión de miRNAs en sangre periférica, donde tras un descenso inicial, los valores se incrementaron alcanzando mayoritariamente su cénit a los 7 días. Los modelos experimentales quirúrgicos fueron llevados a cabo siguiendo las guías de realización de modelos animales de isquemia e infarto de miocardio, a fin de mejorar el rigor y la reproducibilidad de la metodología empleada.¹⁷⁰

miR-21-5p, ampliamente estudiado y conocido como ligado a isquemia tisular en múltiples órganos y tejidos, presentó un comportamiento llamativo en el modelo animal: a pesar de alcanzar niveles de expresión muy elevados a nivel intracelular, apenas tuvo reflejo en sangre periférica, tanto en los experimentos de OP como de I/R. Dado que miR-21-5p es uno de los miRNAs más estudiados en enfermedades cardiovasculares y ya ha sido asociado al desarrollo de insuficiencia cardiaca tras IAM, es posible que nuestros

resultados sean debidos a la variabilidad y precisión de los distintos modelos animales utilizados.¹⁷¹

Los experimentos *in vitro* con cardiomiocitos murinos H9c2 nos permiten determinar que los miRNAs evidenciados en pacientes y estudiados en modelos animales son específicos de la respuesta de los cardiomiocitos a la isquemia miocárdica. En primer lugar, en un contexto en el que se estudiaron de forma aislada únicamente células miocárdicas, se confirmó que todos los miRNAs seleccionados eran expresados a este nivel. Los diferentes grupos experimentales con/sin hipoxia y con/sin nutrientes sirvieron para determinar la diferente magnitud de la agresión celular producida en cada una de estas circunstancias. Así, los cardiomiocitos mostraron mayor grado de afectación ante la privación de nutrientes que frente a la hipoxia (Figura 5.24). Al igual que en el modelo *in vivo*, se confirmó la existencia de patrones de variación temporal en los niveles de expresión extracelular de miRNAs en sobrenadantes celulares en las determinaciones a 24 horas frente a las realizadas a 48 horas, siendo éste un aspecto clínicamente relevante de los miRNAs en su potencial faceta como biomarcadores en IAM.¹⁴⁵ La respuesta celular ante la agresión celular isquémica implicó la inducción de la mayor parte de los miRNAs estudiados, siguiendo el comportamiento habitual que se ha descrito en la literatura para los miRNAs sensibles al oxígeno (OxymiRs), siendo llamativo el comportamiento opuesto que presentaron algunos miRNAs como miR-122-5p y miR-144-5p.¹⁵

A fin de cuantificar analíticamente la magnitud del estrés celular inducido en cada grupo experimental se analizaron los niveles de expresión de VEGF y BNIP3, como genes ampliamente estudiados por ser marcadores de hipoxia celular y reguladores de apoptosis y neovascularización en respuesta a isquemia y producidas. El análisis de resultados nos permitió ver en primer lugar su capacidad de ser expresados en cardiomiocitos. De acuerdo a lo esperado, la expresión de ambos se vio incrementada ante la agresión, siendo notable el aumento de BNIP3 en respuesta a la hipoxia.^{172,173}

Los resultados del modelo *in vitro* confirmaron el papel fundamental que juega miR-210-3p en la respuesta a la hipoxia, con un aumento de su expresión detectado en sobrenadantes, reflejo del incremento en su producción intracelular.

Algunos de los miRNAs que se encuentran alterados en pacientes con IAM, y que por tanto pueden tener interés como biomarcadores, carecieron de utilidad pronóstica en pacientes y su papel en los modelos experimentales no quedó clarificado por completo.

En el caso de miR-20a, los niveles de expresión intracelular presentaron comportamientos divergentes en el análisis de sus cambios a nivel intra frente a extracelular, así como en la comparativa entre los modelos *in vitro* e *in vivo*; este miRNA, constituyente del *cluster* 17~92, se ha asociado *in vitro* a una inhibición de la apoptosis de cardiomiocitos en fase isquémica aguda y su proliferación posterior, aunque no existe consenso acerca del papel que puede desempeñar.^{174,175} La expresión de miR-122-5p se incrementó de forma muy marcada tanto en suero de pacientes como de ratas sometidas a IAM, aunque los datos mostrados *in vitro* fueron menos concluyentes; este miRNA tiene descritas funciones proapoptóticas dependientes de mitocondria en cardiomiocitos H9c2,¹⁷⁶ y ha sido ligado al desarrollo de insuficiencia cardiaca tras IAM en ratas.¹⁷⁷ En nuestros estudios, este miRNA no parece estar ligado a la respuesta del cardiomiocito a la agresión, por lo que no se llevó a cabo el estudio de modulación de miR-122 en el modelo celular.

6.4 Potencialidad de los miRNAs como nuevos biomarcadores en IAM: miRNAs en grandes estudios

Para evaluar la capacidad de los miRNAs seleccionados en constituirse como nuevos biomarcadores confirmamos el cumplimiento de cuatro condiciones fundamentales: 1) que se encuentren alterados en el contexto clínico del IAM, para lo que realizamos una comparación frente a controles sanos tanto en el despistaje inicial como en la validación posterior; 2) que tengan especificidad cardiaca, por lo que se analizaron de forma aislada en cardiomiocitos en el modelo *in vitro*; 3) que sean fácilmente determinables en muestras accesibles, por lo que su estudio en pacientes se realizó en sangre periférica; y 4) que muestren resistencia a la degradación durante el procesado, lo que confirmamos verificando su estabilidad en condiciones de almacenamiento en Biobanco, ciclos repetidos de congelado y descongelado, o diferentes pHs.

Este es el primer estudio prospectivo con miRNAs circulantes en IAM que evalúa la aparición de complicaciones a largo plazo relacionadas con insuficiencia cardiaca (incluyendo mortalidad cardiovascular). La utilidad de los miRNAs como biomarcadores pronósticos en el contexto del IAM ha sido evaluada fundamentalmente para la predicción de mortalidad. Uno de los estudios a gran escala en prevención secundaria,

identificó a miR-197 y miR-223 como predictores de muerte cardiovascular, pero en una población que incluía también síndromes coronarios crónicos estables.¹⁷⁸ Un subestudio de esta misma cohorte, que empleó una selección de miRNAs candidatos basada en búsqueda bibliográfica, identificó posteriormente otros ocho miRNAs, incluyendo miR-210, que alcanzaron la significación estadística para la predicción de mortalidad cardiovascular, pero con un elevado grado de colinealidad entre los miRNAs seleccionados.¹⁷⁹ He et al. identificaron como miR-134 y miR-328 se asociaron a mayor mortalidad o insuficiencia cardiaca a 6 meses tras IAM, aunque no los compararon frente a otras variables clínicas o escalas de estratificación.¹⁸⁰ Zampetaki et al. identificaron 3 miRNAs en población general, que añadidos al *score* de riesgo Framingham mejoraron la estratificación de riesgo de un primer IAM.¹⁸¹ Más recientemente, se ha propuesto que varios miRNAs como miR-26b-5p, miR-320a y miR-660-5p podían identificar a pacientes con mayor riesgo de eventos recurrentes tras un IAM, siendo capaces de mejorar los modelos de predicción de riesgo clínicos o el *score* GRACE; sin embargo, el pequeño tamaño de estos estudios, o su diseño tipo caso-control no permite sino sugerir estas asociaciones.^{182,183} Otros miRNAs que han mostrado utilidad pronóstica para la predicción de muerte o MACE en cardiopatía isquémica son: miR-16, miR-27a, miR-34a, miR-101, miR-126, miR-133a, miR-134, miR-145, miR-150, miR-208b, miR-328, miR-499 o miR-652.¹⁸⁴ A pesar de la necesidad de replicación de estos resultados para garantizar su robustez, estos estudios están en línea con la petición establecida en las guías de práctica clínica de disponer de nuevos biomarcadores que ayuden en la toma de decisiones en insuficiencia cardiaca, para lograr una transición desde el modelo actual de tratamiento hacia una medicina personalizada.^{34,185}

La utilidad pronóstica de los miRNAs para predecir insuficiencia cardiaca o remodelado ventricular adverso tras IAM apenas ha sido evaluada. Los estudios que lo han hecho presentan limitaciones metodológicas, adolecieron de un tamaño muestral reducido o utilizaron *endpoints* subrogados que no permiten establecer relaciones firmes;^{186,187} Un aspecto relevante es que dado que no hay una herramienta universalmente aceptada para estratificar el riesgo de insuficiencia cardiaca tras un IAM, nuestros datos enfatizan el papel potencial de la determinación de miRNAs circulantes, que mantienen su capacidad pronóstica con independencia de todas las variables clínicas con las que fue comparado en los seis modelos multivariantes estudiados. En particular, los niveles de expresión de miR-210-3p, miR-221-3p y miR23a-3p fueron cruciales en la

estratificación pronóstica y en la evaluación del riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca tras un evento coronario agudo.

Son más numerosos los estudios clínicos que han evaluado el potencial “diagnóstico” de los miRNAs como biomarcadores de alteraciones cardíacas, abstrayéndose de su posible utilidad pronóstica. Han sido utilizados para diferenciar SCA frente a dolor no coronario,¹⁸⁸ diagnosticar enfermedad cardiovascular,¹⁸⁹ o detectar precozmente un IAM.¹⁹⁰ Entre los miRNAs más frecuentemente asociados a IAM o SCA se encuentran miR-1, miR-122, miR-132, miR-133, miR-150, miR-186, miR-208a/b, miR-223, miR-320a, miR-400, miR-423 o miR-499.¹⁹¹ También han sido utilizados con fines diagnósticos para diferenciar pacientes con insuficiencia cardíaca de origen isquémico frente a otros grupos de pacientes, basados en estudios caso-control. Entre ellos están miR-1, miR-30a, miR-34a, miR-126, miR-133a, miR-134, miR-145, miR-192, miR-194, miR-208b, miR-323, miR-328, miR-499, miR-652 o miR-1254.¹⁹²

Es importante diferenciar la utilidad diagnóstica de un miRNA frente a la pronóstica.¹⁸⁹ Así, miR-122-5p, es uno de los miRNAs más frecuentemente asociados con cardiopatía isquémica e IAM, pero su capacidad pronóstica no había sido estudiada hasta la fecha. En nuestro estudio se confirmó la sobreexpresión de este miRNA frente a controles sanos confirmando su capacidad diagnóstica, pero su capacidad pronóstica fue limitada e inferior a otros. Es plausible considerar que esto se deba a los mecanismos de regulación celular en los que se encuentren implicados y si estos se relacionan con la regeneración celular y remodelado ventricular tras el daño isquémico.

La investigación en miRNAs como biomarcadores es un campo que está evolucionando rápidamente. Sin embargo, hay varios retos que influyen la transferibilidad de los resultados tanto por factores analíticos como preanalíticos.¹⁹³ Una de las dificultades encontradas en la búsqueda de correlación entre miRNAs en los diferentes modelos (humanos vs ratas vs células H9c2) y muestras analizadas (suero/sobrenadante vs células/tejidos) fue la carencia de procedimientos estandarizados aceptados para su análisis (PCR, *microarrays*, secuenciación), forma de expresar los resultados (ΔC_T , C_T , *folds*) y estrategia de normalización (referencias endógenas utilizando *housekeeping*s que varían en función de la patología a estudio o referencias exógenas con *Spikes-in* como *Caenorhabditis elegans* miR-39/54).^{194,195} Otro aspecto relevante a tener en cuenta de cara a su constitución como biomarcadores es el carácter dinámico de los niveles de expresión de miRNAs, objetivable a lo largo de los días posteriores a un IAM, de forma

análoga al comportamiento de otros biomarcadores como la troponina.^{190,196} En nuestro estudio hemos analizado los miRNAs de forma transversal en pacientes (con una determinación en el mismo momento), y en varios tiempos para el resto de estudios, a fin de caracterizar la dinámica de nuestros miRNAs de interés. Sí hemos confirmado la estabilidad de las muestras al tener una buena reproducibilidad en las determinaciones repetidas de miRNAs procedentes de muestras congeladas en Biobanco, en línea con lo descrito en la literatura.¹⁹⁷ En su conjunto, es preciso eliminar la variabilidad derivada de los factores analíticos para generar resultados reproducibles y robustos, automatizar los flujos de trabajo y armonizar la interpretación de resultados, para así poder incorporar los miRNAs a la práctica clínica.

6.5 miRNAs como mecanismos fisiopatológicos en IAM

Las situaciones de hipoxia celular estimulan el miRNoma, y el número de miRNAs que han sido incluidos en el grupo de miRNAs con respuesta al oxígeno (OxymiRs) no ha cesado de crecer, dado que los miRNAs son dianas comunes de los factores de transcripción y viceversa.¹²⁰ Sin embargo, las consecuencias fisiopatológicas a largo plazo de un infarto de miocardio suponen un proceso con múltiples facetas debido a los mecanismos moleculares complejos que se encuentran involucrados en procesos como el remodelado ventricular adverso. El foco de nuestro estudio fue identificar, de todos los miRNAs que se encuentran alterados en un infarto de miocardio, cuáles de ellos aportan información pronóstica relevante.

En nuestro estudio clínico, miR-210-3p fue el más relevante e influyente. miR-210 está regulado por hipoxia a través de la vía de HIF-1, y en nuestro trabajo se asoció de forma independiente con insuficiencia cardiaca, mortalidad cardiovascular y peor clase funcional durante el seguimiento, sugiriendo que pudiera jugar un papel clave en la recuperación miocárdica tras IAM. Los niveles de expresión de miR-210-3p se incrementan rápidamente (<3 horas) tras el inicio de un SCA,¹⁹⁸ y se ha descrito su capacidad de inhibir la apoptosis de cardiomiocitos.¹⁹⁹ En nuestro estudio, los pacientes con mayores niveles de expresión de miR-210-3p presentaron con mayor frecuencia descompensaciones de insuficiencia cardiaca y remodelado ventricular adverso, en línea con las hipótesis planteadas en modelos experimentales.²⁰⁰

Del mismo modo, detectamos como miR-221-3p es un marcador de infartos más graves, así como un estimador independiente de peores consecuencias a largo plazo. miR-221 está relacionado con procesos de disfunción endotelial a través de la regulación de la sintasa del óxido nítrico, y ha sido evaluado con éxito como parte de un cóctel regenerador destinado a mejorar los injertos con células madre en corazones de ratones sometidos a IAM.²⁰¹ También es interesante cómo miR-23, un miembro del grupo 23/27/24, ha sido propuesto como regulador protector tras IAM tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, relacionado con remodelado ventricular e insuficiencia cardíaca.¹⁷¹ miR-27b ejerce un efecto pro-angiogénico y su sobreexpresión dirigida induce reclutamiento de células procedentes de la médula ósea a la neovasculatura, disminuye la fibrosis e incrementa la fracción de eyección en modelos experimentales.²⁰² miR-21-5p es uno de los miRNAs más conocido desde hace años por sus cambios en situaciones de hipoxia celular, con capacidad de modular la supervivencia de los cardiomiocitos; se le ha ligado en modelos experimentales animales con remodelado ventricular adverso e insuficiencia cardíaca tras IAM,¹⁷¹ con carácter reversible mediante el uso de un anti-miR-21.²⁰³ Entre sus mecanismos, miR-21 activa la fibrosis al actuar sobre MMP-2 y el receptor tipo 3 de TGF β , así como en la transición endotelio y epitelio-mesénquima.²⁰⁴⁻²⁰⁶ De la misma forma, se le ha implicado un papel crucial a nivel cardíaco para miR-122 a través de la modulación de la muerte celular de cardiomiocitos *in vitro*, y el desarrollo de fibrosis por su efecto en TGF β -1;^{207,208} se han encontrado niveles elevados de miR-122 en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda.²⁰⁷ miR-122 es un miRNA relacionado con apoptosis, cuyo *knock-down* atenúa la muerte celular de cardiomiocitos ligada al daño hipóxico a través de la sobrerregulación de GATA-4.²⁰⁹ De acuerdo a nuestros conocimientos, ninguno de los miRNAs mencionados anteriormente ha sido identificado previamente como predictores de insuficiencia cardíaca o mortalidad tras infarto agudo de miocardio.

Los análisis funcionales de los 8 miRNAs que demostraron asociarse de forma independiente con eventos adversos en el seguimiento indican que al menos 4 de ellos, miR-21-5p, miR-122-5p, miR-106b-5p y miR-221-3p, comparten dianas terapéuticas comunes. Entre estas dianas se encuentran, PKD2, RhoA, HMGB3, TSC1, FNBP1 y PKM, siendo todos ellos genes particularmente relevantes para el desarrollo de insuficiencia cardíaca y la recuperación de la función miocárdica. Como prueba, mutaciones en el gen PKD2, un canal intracelular de calcio expresado en cardiomiocitos, se ha asociado con dilatación y disfunción ventricular izquierda, entre otras alteraciones

miocárdicas.²¹⁰ RhoA, y la vía RhoK/RhoA han sido identificadas por mostrar un rol crucial en la respuesta tisular a situaciones de isquemia, lo que ha llevado a su evaluación actual como diana terapéutica en medicina cardiovascular.²¹¹ HMGB3 pertenece a la familia de factores de transcripción HMGB, que ha mostrado efectos tanto beneficiosos como deletéreos durante y después de isquemia miocárdica.²¹² El gen TSC1 es responsable de la proliferación celular como manifestación cardíaca de la esclerosis tuberosa, y ha sido relacionada también con hipertrofia ventricular e insuficiencia cardíaca.²¹³ PKM2, piruvato quinasa M2, es una molécula clave para el desarrollo cardíaco embrionario que ha sido recientemente asociada con insuficiencia cardíaca.²¹⁴ Basados en estas dianas comunes que comparten los miRNAs con capacidad pronóstica identificados en nuestro estudio, es concebible pensar que los miRNAs circulantes detectados en nuestra población de pacientes con IAM pueden formar parte de las vías moleculares y celulares que actúan de forma cooperativa en el proceso de daño y reparación miocárdica, según se infiere de los datos mostrados en la Figura 5.15. Otros miRNAs con utilidad pronóstica también actúan por vías cooperativas, como miR-107, que promueve la necrosis de los cardiomiocitos al actuar sobre la proteína asociada a Fas FADD y por la vía del HIF, en la que también actúan varios de los OxymiRs estudiados, siendo el más señalado miR-210.²¹⁵

De forma inversa, algunos de los miRNAs que se ven alterados en el seno de un IAM carecieron de capacidad pronóstica en nuestra población de estudio. Tanto miR-106b-5p como miR-144-3p no proporcionaron información pronóstica a pesar de haber sido relacionados con mortalidad cardiovascular en población sana.²¹⁶ Otros como miR-20a-5p, miR-93-5p o miR-148b-3p, también confirmaron su desregulación en IAM pero desprovista de carácter pronóstico independiente. En relación con miR-30b-5p y miR-let-7a-5p, ninguno de ellos mostró un patrón de expresión diferencial en pacientes con IAM, por lo que no se evaluó su capacidad pronóstica.

Hemos prestado particular atención a la participación de los miRNAs en procesos de remodelado ventricular adverso, en respuesta a la mayor evidencia de que juegan un papel clave en su aparición y desarrollo de insuficiencia cardíaca. Estudios *in vitro* realizados en células endoteliales cardíacas han demostrado que en ausencia de miR-532 se induce su transformación hacia fibroblasto, siendo este uno de los componentes de la transición epitelio-mesénquima que forma parte de la fibrosis.²¹⁷ Estudios posteriores confirmaron la importancia de la regulación de cardiomiocitos, tal y como hemos podido

constatar en nuestro trabajo. Estudiando de forma aislada cardiomiocitos H9c2, hemos identificado la puesta en marcha de genes clave, como BCL2, SLUG, VEGF, fibronectina, Vimentina o colágeno 1 α , reflejo del papel central que estas células juegan en el remodelado ventricular y permitiéndonos utilizar este modelo para estudiar el efecto de la modulación de miRNAs.

6.6 Efectos de la modulación de miRNAs: potenciales nuevas dianas terapéuticas en IAM

Hemos estudiado el efecto de la modulación de los dos miRNAs más prometedores a lo largo de las distintas fases del estudio. miR-210-3p fue el que obtuvo los resultados más consistentes en todos los modelos, con un marcado carácter cardioprotector. El efecto de la modulación *in vitro* de miR-210-3p se asoció con cambios en la expresión de genes clave que determinan si el daño sufrido por el cardiomiocito inducirá la apoptosis celular o tendrá carácter subletal, tal como sugieren las variaciones en BCL2, potencialmente gen diana. En caso de no producirse la apoptosis, nuestros datos sugieren que miR-210-3p también tiene como genes diana a SLUG, VEGF, Fibronectina, Vimentina o Colágeno 1 α , directamente implicados con el desarrollo de fibrosis en el miocardio, al regular fenómenos de transición epitelio mesénquima o depósito de proteínas de la matriz extracelular. miR-210 pertenece al grupo de los miRNAs sensibles a oxígeno (OxymiRs), estando inducido por hipoxia, y se encuentra sobreexpresado en IAM.¹⁵ Estudios previos *in vitro* habían observado que la administración de un precursor de miR-210 lograba mejorar la función sistólica tras daño miocárdico de tipo isquémico, sugiriendo que su efecto podría producirse al inhibir en cardiomiocitos la apoptosis vía su acción sobre *tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1* (Ptp1b), y en células endoteliales, al favorecer la angiogénesis actuando sobre el receptor de tirosin-cinasa Ephrin-A3.²¹⁸

Hemos identificado cómo miR-23a-3p juega una importancia crucial en el desarrollo de apoptosis y adaptación posterior de los cardiomiocitos. La expresión de miR-23a se incrementó en la fase aguda tras el daño hipóxico/isquémico, mientras que su

modulación *in vitro* se asoció a cambios en la expresión de BCL2, SLUG, VEGF, Fibronectina, Vimentina o Colágeno 1 α , indicativo de que es posible conseguir una reducción del depósito de matriz extracelular y transformación de cardiomiocitos en miofibroblastos. Song et al. obtuvieron resultados similares en su modelo murino en el que se limitaron al análisis de VEGF.²¹⁹ Se ha sugerido la asociación de miR-23a-3p con el desarrollo de insuficiencia cardiaca tras IAM, tanto *in vivo* como *in silico*,¹⁷¹ vinculándolo a apoptosis de cardiomiocitos por su efecto sobre el mRNA SOD2.²²⁰ Un estudio reciente ha determinado que su inhibición facilita la transformación de células pluripotenciales en cardiomiocitos maduros a través de la activación de la vía Wnt, siendo una vía alternativa a la estudiada por nosotros que podría facilitar la regeneración miocárdica tras IAM.²²¹ También se ha identificado que miR-23 es capaz de inducir la proliferación de cardiomiocitos al inhibir la traslación de Meis1, regulando por tanto el ciclo celular.²²²

6.7 Implicaciones clínicas

Escalas de riesgo poligénico y medicina de precisión

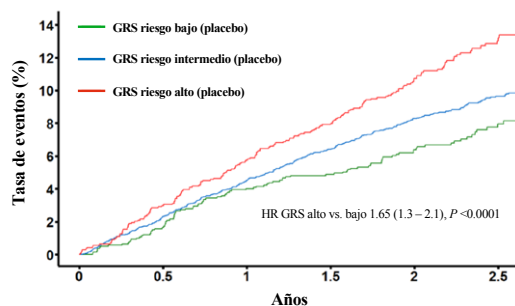
La información genética es considerada uno de los pilares de la medicina de precisión o personalizada. De la aplicación de los *scores* de riesgo poligénico es preciso reflexionar acerca de 1) cómo puede influir un GRS en la toma de decisiones relativas al uso de tratamientos en prevención secundaria; 2) qué puede proporcionar un *score* a nivel individual para inducir cambios en la estrategia de seguimiento, hábitos y estilo de vida de ese paciente.

Pocos meses después de la publicación de nuestros resultados,⁸⁸ se publicaron dos artículos con el análisis pos-hoc en función del riesgo genético poligénico de dos grandes ensayos clínicos pivotaes: FOURIER (*Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 Inhibition*)²²³ y ODISEY-Outcomes (*Evaluation of Cardiovascular Outcomes After an Acute Coronary Syndrome During Treatment With Alirocumab*).¹⁵⁷ En estos subanálisis se incluyeron más de 26.000 pacientes de origen europeo y genotipo disponible que habían presentado un evento cardiovascular y habían sido reclutados en estos estudios aleatorizados doble ciego dirigidos a evaluar el beneficio clínico del tratamiento con los inhibidores de PCSK9 evolocumab y alirocumab, respectivamente. En

ambos estudios, que utilizaron GRS muy similar al empleado en nuestro trabajo, se objetivó cómo: 1) aquellas personas con un riesgo genético desfavorable presentaban una mayor incidencia de eventos coronarios, de forma independiente y complementaria a lo sugerido por parámetros clínicos; 2) el beneficio absoluto y relativo obtenido por el tratamiento con inhibidores de PCSK9 fue muy superior en el tercil de pacientes con alto riesgo genético en comparación con los de bajo riesgo (Figura 6.1). La reducción absoluta del riesgo de eventos con evolocumab fue del 4,0% en el grupo de alto riesgo genético (con independencia de si presentaban factores de riesgo o no), y de tan solo 1,4% en pacientes con múltiples factores de riesgo y bajo riesgo genético.²²³ De forma similar, el tratamiento con alirocumab consiguió una reducción del riesgo absoluto del 6,0% en pacientes de alto riesgo genético frente al 1,5% en los de bajo riesgo genético.¹⁵⁷ Las curvas de Kaplan-Meier mostradas en ambos subanálisis, en las que se asocia riesgo genético con mayor riesgo de eventos coronarios sucesivos guardan una tremenda similitud con la publicada previamente en nuestro estudio (Figura 5.3 Resultados). Estos hallazgos sirven como validación de nuestros resultados, amplían el rango etario en el que el riesgo genético resulta útil para la estratificación pronóstica, y avanza en la transición hacia una mayor personalización, al abrir la posibilidad de utilizar la información genética para maximizar el beneficio de una estrategia farmacológica de alto impacto económico, dirigiéndola hacia aquellos que más la precisen. Estos datos se suman a los ya publicados por Mega et al. en el campo de las estatinas, en el que aquellos pacientes en prevención secundaria con alto riesgo genético mostraron una reducción del 47% en el riesgo de nuevos eventos cardiovasculares frente al 3% en los de bajo riesgo.¹⁴⁸ La importancia de todos estos estudios se encuentra en que muestran la capacidad que tienen los GRS de identificar a grupos de pacientes respondedores para determinadas terapias, en línea con el desarrollo de medicina de precisión.

A

Eventos coronarios en función del riesgo genético en FOURIER

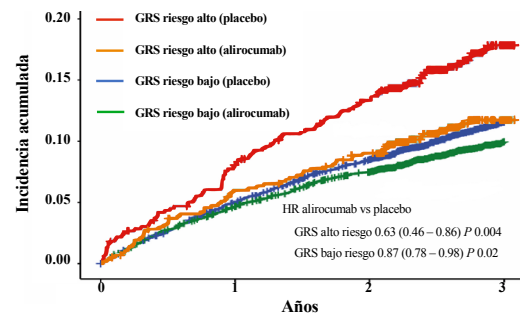


N° en riesgo

| | | | | | | |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|
| GRS riesgo bajo | 1406 | 1372 | 1329 | 1308 | 997 | 510 |
| GRS riesgo int. | 4283 | 4159 | 4046 | 3932 | 2993 | 1546 |
| GRS riesgo alto | 1446 | 1397 | 1354 | 1310 | 1006 | 513 |

B

MACE en función del riesgo genético en ODYSSEY OUTCOMES



N° en riesgo

| | | | | |
|-----------------------|------|------|------|------|
| GRS bajo (placebo) | 5373 | 5080 | 4843 | 2156 |
| GRS bajo (alirocumab) | 5383 | 5109 | 4905 | 2234 |
| GRS alto (placebo) | 613 | 557 | 520 | 209 |
| GRS alto (alirocumab) | 584 | 545 | 523 | 217 |

Figura 6.1. Scores de riesgo poligénico y medicina de precisión. A. Curvas de Kaplan-Meier para la aparición de eventos coronarios recurrentes mayores en función del grupo de riesgo genético (GRS) en sujetos incluidos en el estudio FOURIER (grupo placebo). B. Incidencia acumulada de eventos cardiovasculares mayores (MACE) en función del riesgo genético (GRS) y el tratamiento recibido (alirocumab vs. placebo) en el ensayo clínico ODYSSEY OUTCOMES. GRS, genetic risk score; MACE, major adverse cardiovascular events (muerte cardiovascular, infarto agudo de miocardio, ictus isquémico u hospitalización por angina inestable); HR, hazard ratio; N°, número. Adaptado de Marston et al.²²³ y Damask et al.¹⁵⁷

Fuera del ámbito terapéutico, la cuestión acerca de si la información genética puede ser útil como herramienta para inducir cambios en el seguimiento, estilos de vida y control de factores de riesgo no ha sido evaluada en prevención secundaria cardiovascular hasta el momento. Dentro de la prevención primaria sí se ha observado que aquellos sujetos con alto riesgo genético consiguen grandes beneficios si siguen un estilo de vida adecuado que incluye ejercicio físico habitual, cese del hábito tabáquico y dieta cardiosaludable.²²⁴ Sin embargo, el efecto de comunicar al sujeto los resultados de su GRS, no ha demostrado hasta ahora que tenga efectos sobre el tabaquismo, ejercicio o dieta.²²⁵ Siguiendo las pautas ya conocidas en los programas de Rehabilitación Cardíaca, este tipo de información debe formar parte de una estrategia global de abordaje del riesgo cardiovascular global en el marco de un programa multidisciplinar si se desean lograr cambios conductuales sostenidos en el tiempo.

MicroRNAs y medicina personalizada

La implementación de nuevos biomarcadores en práctica clínica forma una parte importante de la investigación en enfermedades cardiovasculares, y estos son demandados por las grandes sociedades científicas en las guías de práctica clínica. En general, los biomarcadores pueden tener una función *diagnóstica* o *pronóstica*. A nivel diagnóstico, la especificidad tisular ha llevado a la propuesta de algunos miRNAs, como miR-208 (cuya síntesis es exclusivamente cardíaca), para ser utilizados en el diagnóstico del IAM;²²⁶ sin embargo, la disponibilidad de otros marcadores como la troponina ultrasensible, masivamente extendidos y validados dificilmente justifica su adopción. Las guías de práctica clínica enfatizan que para la introducción de nuevos biomarcadores con finalidad pronóstica es preciso llevar a cabo una evaluación exquisita del valor añadido que estos aportan en la predicción de riesgo cardiovascular, siendo éste un prerrequisito para que cualquier biomarcador alcance relevancia clínica.³⁴ Nuestro estudio cumple los requisitos de ser el primer estudio que muestra la utilidad de un patrón de miRNAs como biomarcador *pronóstico* en la estratificación de riesgo de insuficiencia cardíaca y muerte tras IAM, mejorando las estrategias actuales de forma muy marcada.

Más allá de su papel como biomarcadores, resulta apasionante la función que los miRNAs muestran a nivel mecanístico, lo que les confiere un gran potencial para convertirse en nuevas dianas terapéuticas. El desarrollo de redes asistenciales de angioplastia primaria y las estrategias de revascularización precoz han mejorado sustancialmente el pronóstico inicial de los pacientes con IAM, dando como resultado un número creciente de supervivientes que presentan cierto grado de daño estructural miocárdico permanente, que frecuentemente deriva en el desarrollo de insuficiencia cardíaca. Existe una necesidad clínica no cubierta dirigida a la recuperación de las zonas miocárdicas disfuncionantes, teniendo en cuenta la dificultad de los cardiomiocitos para dividirse y regenerar las zonas de necrosis.²²⁷ Hasta el momento, existen terapias basadas en RNA (siRNAs y miRNAs) utilizadas en cáncer, enfermedades infecciosas o neurodegenerativas. La utilización de silenciadores génicos en cardiología está prevista que sea autorizada en breve (ej. inclisirán, patisirán o inotersén). Dentro de la cardiopatía isquémica e insuficiencia cardíaca, la investigación ha estado centrada durante años en la utilización de terapias celulares con células madre, pluripotenciales o derivadas de médula ósea, que han mostrado efectos cardioprotectores a nivel experimental y en algunos ensayos clínicos.²²⁸ Sin embargo, su uso ha estado expuesto a serios problemas

relacionados con el escaso porcentaje de células que sobreviven y se injertan en la región de interés, así como la limitada capacidad de diferenciación de la mayor parte de las células progenitoras adultas.

Es factible pensar que los miRNAs pueden ser utilizados para mejorar los resultados de las terapias celulares, al haberse confirmado su capacidad de modular los procesos de migración de células progenitoras o la regeneración miocárdica a través de mecanismos paracrinos.²²⁹ Mientras que miR-15 y miR-34 inhiben la función de células progenitoras, miR-1, miR-21, miR-24, miR-126, miR-155, miR-221, y miR-499 tienen capacidad de potenciarlas.²³⁰ Una combinación de miRNAs compuesta por miR-21, miR-24 (perteneciente al *cluster* 23/24/27) y miR-221 fue capaz de mejorar sustancialmente el injerto y supervivencia de las células cardíacas progenitoras al reprimir la proteína proapoptótica Bim, relacionada con Bcl-2.²⁰¹ Otros estudios han mostrado como una combinación de células cardíacas progenitoras y exosomas enriquecidos en miR-210 inhibían la apoptosis de los cardiomiocitos y mejoraban la función sistólica en ratones sometidos a IAM.²³¹

Un mayor potencial de aplicabilidad en grupos amplios de pacientes son las nuevas opciones terapéuticas exclusivamente basadas en miRNAs que se están evaluando de forma más reciente, cuyo objetivo es el estimular la regeneración cardíaca a través de la reprogramación directa de fibroblastos o induciendo la proliferación de cardiomiocitos. La inhibición o sobreexpresión aguda de miRNAs después de un IAM puede ser útil para limitar el daño tisular y promover la neovascularización para prevenir el remodelado ventricular adverso. Ya se han publicado resultados de estudios traslacionales que han evaluado el potencial de un anti-miR-92a para minimizar el daño por isquemia-reperfusión y mejorar la re-endotelización tras daño vascular.^{232,233} También, dentro del campo de las tecnologías emergentes existen estudios comparativos de la eficacia terapéutica entre siRNAs y miRNAs para lograr el silenciamiento génico.^{234,235}

Sin embargo, antes de que estos estudios alcancen su fase clínica es preciso haber identificado todos los miRNAs que resulten clave en los procesos de reparación tras IAM, donde una selección estricta de los pacientes y modelos sobre los que se ha estudiado es fundamental para el éxito.²³⁶ También es preciso realizar ensayos previos de modulación en modelos de animal grande, lo que implica dificultades que aún no han sido resueltas en su totalidad.²³⁷ En primer lugar, varios de los miRNAs que han sido considerados como dianas terapéuticas en cardiología han sido involucrados también en otros procesos como

el cáncer, por lo será preciso evaluar en cada caso concreto el riesgo de desarrollo de efectos secundarios no deseados y trabajar en su vehiculización y liberación de forma exclusiva en el miocardio. También, aunque algunos miRNAs solo se expresan en un único tipo celular, la mayor parte de ellos se expresan en mayor o menor medida en diferentes tejidos o tipos celulares. Para sobreponerse a estas dificultades, se han diseñado estrategias de administración dirigida, bien utilizando una infusión percutánea intracoronaria,²³⁸ o bien recurriendo a estrategias dirigidas a tipos celulares concretos.²³⁹

Otra dificultad puede ser el conseguir una sobreexpresión de miRNAs de forma mantenida y controlada. Para ello se han diseñado vehículos liposomales o basados en lentivirus, adenovirus o virus adeno-asociados, que, aunque han sido empleados *in vitro* y en ratones, su experiencia es escasa en animales de mayor tamaño.²⁴⁰ Un estudio realizado en cerdos sometidos a IAM demostró como la administración de miR-199a con un vector viral logró una buena proliferación miocárdica, pero sus resultados estuvieron lastrados por un alto riesgo de muerte súbita arrítmica que los autores justificaron por una sobreexpresión incontrolada del miRNA y no alcanzar los cardiomiocitos el grado de diferenciación adecuado.²⁴¹ No obstante, el número crecientes de publicaciones que describen estas terapias en infarto agudo de miocardio e insuficiencia cardiaca es reflejo del interés en este campo, y sin duda contribuirán a superar las dificultades actuales.

6.8 Limitaciones

El estudio del riesgo genético poligénico en IAM, dirigido a la predicción de eventos secundarios está sujeto a una serie de limitaciones. La primera es que, debido al carácter restrictivo de los criterios de selección planteados, el número de pacientes es relativamente bajo; la focalización en el grupo de pacientes jóvenes y no diabéticos se basó en descripciones previas en las que se proponía que esta población tenía una mayor predisposición a eventos recurrentes achacables a un origen genético;²⁴² por lo tanto, los resultados pueden no ser generalizables a todo el espectro de edades, comorbilidades o grupos étnicos. Segundo, utilizamos un *endpoint* combinado, similar al de estudios comparables pero expuesto a recoger eventos no condicionados por el riesgo genético. Tercero, el número de eventos en el seguimiento fue inferior al esperado, probablemente por una mayor adherencia a las pautas de tratamiento médico óptimo que el observado en otros registros y que obligó a alargar el periodo de seguimiento.²⁴³

En los **estudios de identificación y validación de miRNAs como biomarcadores pronósticos en IAM** una potencial limitación viene derivada del número de miRNAs que fueron analizados. El análisis se limitó a 14 miRNAs, tras un proceso de selección basado en nuestras propias observaciones iniciales. Aunque se escogió esta aproximación independiente para evitar el estudio repetitivo no justificado de algunos miRNAs ya estudiados en la literatura, esta metodología puede haber conducido a la exclusión de miRNAs potencialmente relevantes, pero no detectados en nuestro despistaje inicial. En segundo lugar, hemos presentado seis análisis de regresión de Cox a fin de evaluar la capacidad predictiva de los miRNAs en diferentes contextos, por lo que en su interpretación debe tenerse en cuenta el riesgo de sobre-ajuste. Finalmente, los estudios de modulación de miRNAs han estado sujetos a restricciones presupuestarias que han limitado el tamaño muestral de los experimentos, por lo que el efecto de la modulación sobre los genes de interés debe ser visto como prueba de concepto. Serán necesarios experimentos adicionales los que permitan alcanzar las asociaciones estadísticas necesarias para escalar a fases más avanzadas este modelo terapéutico.

Entre los valores originales de este trabajo está su carácter traslacional, que se inicia con el estudio inicial del patrón de expresión de miRNAs en pacientes con IAM y controles sanos, el desarrollo de estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* para confirmar los resultados y analizar las vías de señalización implicadas, su validación posterior con fines pronósticos en una gran cohorte de pacientes con IAM, y finalmente el estudio de su modulación a fin de convertirse en eventuales dianas terapéuticas. Resaltar también el carácter independiente, donde el estudio se ha centrado en los miRNAs más prometedores basados en nuestras propias observaciones, sin asunciones previas y siguiendo una metodología común. Por estos motivos, los resultados obtenidos en este proyecto pueden ser considerados como una de las iniciativas más firmes para el estudio de los miRNAs como potenciales biomarcadores con finalidad pronóstica en IAM, así como para el estudio de si su modulación puede ser considerada en un futuro una aproximación terapéutica para pacientes que sufren un IAM.

7. CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado la presencia de una elevada susceptibilidad hereditaria entre pacientes jóvenes que sufren un IAM, con una prevalencia de SNPs y variantes genéticas de riesgo superior a la población general.
2. La cuantificación del riesgo genético, mediante una escala de riesgo poligénico basada en SNPs, permite identificar entre pacientes jóvenes con IAM, a aquellos con mayor riesgo de sufrir nuevos eventos cardiovasculares a largo plazo.
3. La información pronóstica proporcionada por el perfil de riesgo genético poligénico mejoró el rendimiento predictivo de las escalas clínicas disponibles actualmente.
4. No se ha documentado la existencia de asociación entre el riesgo genético poligénico y un patrón de aterosclerosis coronaria más agresiva evaluada mediante TC coronaria y análisis de las metaloproteinasas de la matriz extracelular.
5. Se ha identificado y validado una combinación de miRNAs desregulados en pacientes con IAM, con capacidad de constituirse en nuevos biomarcadores diagnósticos.
6. Se ha demostrado, por primera vez, la capacidad pronóstica de varios miRNAs asociados de forma independiente con un mayor riesgo de hospitalizaciones a largo plazo por insuficiencia cardíaca y mortalidad cardiovascular en pacientes ingresados por infarto agudo de miocardio.
7. Basado en un proceso de selección y validación independiente, se ha identificado un grupo de miRNAs, en particular miR-210-3p, miR-221-3p y miR-23a-3p, con un valor pronóstico significativo y clínicamente relevante.

8. Las escalas de evaluación del riesgo genético poligénico y un perfil de expresión de miRNAs constituyen una herramienta independiente en la estratificación pronóstica a largo plazo y medicina de precisión tras infarto agudo de miocardio.
9. Se ha establecido un modelo *in vivo* válido para el estudio de miRNAs en IAM, que implica y reproduce los cambios observados en pacientes.
10. Se ha determinado, mediante un modelo experimental *in vitro* en cardiomiocitos, que varios miRNAs están implicados en las alteraciones celulares que promueven el daño miocárdico crónico, incluyendo apoptosis y transición epitelio mesénquima.
11. La modulación experimental de miR-210-3p y miR-23a-3p modificó la expresión de genes reguladores clave para la supervivencia celular ante la isquemia y su recuperación posterior, sentando las bases para su evaluación futura como potenciales dianas terapéuticas en IAM.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Harvey W. *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*. 1628.
2. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Cheng S, Delling FN, Elkind MS V, Evenson KR, Ferguson JF, Gupta DK, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Lee CD, Lewis TT, Liu J, Loop MS, Lutsey PL, Ma J, Mackey J, Martin SS, Matchar DB, Mussolino ME, Navaneethan SD, Perak AM, Roth GA, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2021;**143**:e254–e743.
3. World Health Organization - Life expectancy and leading causes of death and disability. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates> (14 September 2021)
4. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD, ESC Scientific Document Group. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J* 2019;**40**:237–269.
5. Timmis A, Townsend N, Gale CP, Torbica A, Lettino M, Petersen SE, Mossialos EA, Maggioni AP, Kazakiewicz D, May HT, Smedt D De, Flather M, Zuhlke L, Beltrame JF, Huculeci R, Tavazzi L, Hindricks G, Bax J, Casadei B, Achenbach S, Wright L, Vardas P, Mimosza L, Artan G, Aurel D, Chettibi M, Hammoudi N, Sisakian H, Pepoyan S, Metzler B, et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur Heart J* 2020;**41**:12–85.
6. Hammond-Haley M, Hartley A, Essa M, DeLago AJ, Marshall DC, Saliccioli JD, Shalhoub J. Trends in Ischemic Heart Disease and Cerebrovascular Disease Mortality in Europe. *J Am Coll Cardiol* 2021;**77**:1697–1698.
7. National Center for Health Statistics. Summary health statistics, United States, 2019. National Health Interview Survey. Generated interactively: Sep 15 2021 from.
8. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, Community Surveillance Component, 2005–2014. <https://sites.csc.unc.edu/aric/> (15 September 2021)
9. Malmberg K, Båvenholm P, Hamsten A. Clinical and biochemical factors associated with prognosis after myocardial infarction at a young age. *J Am Coll Cardiol* 1994;**24**:592–599.
10. Maglietta G, Ardissino M, Malagoli Tagliazucchi G, Disisto C, Merlini PA, Crocarno A, Notarangelo MF, Calabrò P, Berzuini C, Ardissino D. Long-Term Outcomes After Early-Onset Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2019;**74**:2113–2115.
11. Centre for Economics and Business Research. The economic cost of cardiovascular disease from 2014-2020 in six European economies.
12. Agency for Healthcare Research and Quality. Medical Expenditure Panel Survey (MEPS): Household Component summary tables: medical conditions, United

- States. <https://meps.ahrq.gov/mep-strends/home/index.html> (15 September 2021)
13. Liu M, Galli G, Wang Y, Fan Q, Wang Z, Wang X, Xiao W. Novel Therapeutic Targets for Hypoxia-Related Cardiovascular Diseases: The Role of HIF-1. *Front Physiol* 2020;**11**:774.
 14. Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci* 2007;**32**:389–397.
 15. Hadj-Moussa H, Storey KB. The OxymiR response to oxygen limitation: a comparative microRNA perspective. *J Exp Biol* 2020;**223**.
 16. Serocki M, Bartoszevska S, Janaszak-Jasiecka A, Ochocka RJ, Collawn JF, Bartoszewski R. miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. *Angiogenesis* 2018;**21**:183–202.
 17. Thum T. Noncoding RNAs and myocardial fibrosis. *Nat Rev Cardiol* 2014;**11**:655–663.
 18. Nielsen SH, Mouton AJ, DeLeon-Pennell KY, Genovese F, Karsdal M, Lindsey ML. Understanding cardiac extracellular matrix remodeling to develop biomarkers of myocardial infarction outcomes. *Matrix Biol* 2019;**75–76**:43–57.
 19. Katz AM. The descending limb of the Starling curve and the failing heart. *Circulation* 1965;**32**:871–875.
 20. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) public use data files. <https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/> (14 September 2021)
 21. Bahit MC, Kochar A, Granger CB. Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *JACC Hear Fail* 2018;**6**:179–186.
 22. Juillièrè Y, Cambou JP, Bataille V, Mulak G, Galinier M, Gibelin P, Benamer H, Bouvaist H, Méneveau N, Tabone X, Simon T, Danchin N. Heart Failure in Acute Myocardial Infarction: a Comparison Between Patients With or Without Heart Failure Criteria From the FAST-MI Registry. *Rev Española Cardiol (English Ed)* 2012;**65**:326–333.
 23. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000;**101**:2981–2988.
 24. Pérez Del Villar C, Bermejo J, Rodríguez-Pérez D, Martínez-Legazpi P, Benito Y, Antoranz JC, Desco MM, Ortuño JE, Barrio A, Mombiela T, Yotti R, Ledesma-Carbayo MJ, Álamo JC Del, Fernández-Avilés F. The role of elastic restoring forces in right-ventricular filling. *Cardiovasc Res* 2015;**107**:45–55.
 25. Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, Tomaselli GF. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 11e. Elsevier, ed. 2018.
 26. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet J-P, Costa F, Jeppsson A, Juni P, Kastrati A, Kolh P, Mauri L, Montalescot G, Neumann F-J, Petricevic M, Roffi M, Steg PG, Windecker S, Zamorano JL, Levine GN. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European . *Eur Heart J England*; 2018;**39**:213–260.
 27. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;**366**:1267–1278.
 28. Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, McCagg A, White JA, Theroux P, Darius H, Lewis BS, Ophuis TO, Jukema JW, Ferrari GM De, Ruzyllo W, Lucca P De, Im K, Bohula EA, Reist C, Wiviott SD, Tershakovec AM, Musliner TA, Braunwald E, Califf RM. Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes.

- N Engl J Med* 2015;**372**:2387–2397.
29. Sabatine MS. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 2017;1–10.
 30. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bittner VA, Diaz R, Edelberg JM, Goodman SG, Hanotin C, Harrington RA, Jukema JW, Lecorps G, Mahaffey KW, Moryusef A, Pordy R, Quintero K, Roe MT, Sasiela WJ, Tamby J-F, Tricoci P, White HD, Zeiher AM. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med* United States; 2018;**379**:2097–2107.
 31. Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, Carballo D, Koskinas KC, Böck M, Benetos A, Biffi A, Boavida J-M, Capodanno D, Cosyns B, Crawford C, Davos CH, Desormais I, Angelantonio E Di, Franco OH, Halvorsen S, Hobbs FDR, Hollander M, Jankowska EA, Michal M, Sacco S, Sattar N, Tokgozoglul L, Tonstad S, Tsioufis KP, Dis I van, Gelder IC van, Wanner C, Williams B, et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* 2021;**42**:3227–3337.
 32. Collet J-P, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, Dendale P, Dorobantu M, Edvardsen T, Folliguet T, Gale CP, Gilard M, Jobs A, Jüni P, Lambrinou E, Lewis BS, Mehilli J, Meliga E, Merkely B, Mueller C, Roffi M, Rutten FH, Sibbing D, Siontis GCM, ESC Scientific Document Group. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2021;**42**:1289–1367.
 33. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno HH, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P, ESC Scientific Document Group, Widimsky P. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Socie. *Eur Heart J* England; 2018;**39**:119–177.
 34. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJ V, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2021;
 35. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017;**377**:1119–1131.
 36. Tardif J-C, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, Pinto FJ, Ibrahim R, Gamra H, Kiwan GS, Berry C, López-Sendón J, Ostadal P, Koenig W, Angoulvant D, Grégoire JC, Lavoie M-A, Dubé M-P, Rhainds D, Provencher M, Blondeau L, Orfanos A, L'Allier PL, Guertin M-C, Roubille F. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2019;**381**:2497–2505.
 37. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, Backer G De, Bacquer D De, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Njølstad I, Oganov RG, Thomsen T,

- Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM, SCORE project group, Witheimsen L, Graham IM. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003;**24**:987–1003.
38. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corra U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FDRR, Løchen ML, Løilgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, Worp HB Van Der, Dis I Van, Verschuren WMMM, Binno S, Backer G De, Roffi M, Aboyans V, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* 2016;**37**:2315–2381.
 39. Lloyd-Jones DM, Huffman MD, Karmali KN, Sanghavi DM, Wright JS, Pelsler C, Gulati M, Masoudi FA, Goff DC. Estimating Longitudinal Risks and Benefits From Cardiovascular Preventive Therapies Among Medicare Patients: The Million Hearts Longitudinal ASCVD Risk Assessment Tool: A Special Report From the American Heart Association and American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2017;**69**:1617–1636.
 40. Lloyd-Jones DM, Braun LT, Ndumele CE, Smith SC, Sperling LS, Virani SS, Blumenthal RS. Use of Risk Assessment Tools to Guide Decision-Making in the Primary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 2019;**73**:3153–3167.
 41. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, Himmelfarb CD, Khera A, Lloyd-Jones D, McEvoy JW, Michos ED, Miedema MD, Muñoz D, Smith SC, Virani SS, Williams KA, Yeboah J, Ziaeian B. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* 2019;**140**:e596–e646.
 42. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation* 2002;**105**:310–315.
 43. Hippisley-Cox J, Coupland C, Vinogradova Y, Robson J, Minhas R, Sheikh A, Brindle P. Predicting cardiovascular risk in England and Wales: prospective derivation and validation of QRISK2. *BMJ* 2008;**336**:1475–1482.
 44. D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, Kannel WB. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;**117**:743–753.
 45. Woodward M, Brindle P, Tunstall-Pedoe H, SIGN group on risk estimation. Adding social deprivation and family history to cardiovascular risk assessment: the ASSIGN score from the Scottish Heart Health Extended Cohort (SHHEC). *Heart* 2007;**93**:172–176.
 46. Hajifathalian K, Ueda P, Lu Y, Woodward M, Ahmadvand A, Aguilar-Salinas CA, Azizi F, Cifkova R, Cesare M Di, Eriksen L, Farzadfar F, Ikeda N, Khalili D, Khang Y-H, Lanska V, León-Muñoz L, Magliano D, Msyamboza KP, Oh K, Rodríguez-Artalejo F, Rojas-Martinez R, Shaw JE, Stevens GA, Tolstrup J, Zhou B, Salomon JA, Ezzati M, Danaei G. A novel risk score to predict cardiovascular disease risk in national populations (GloboRisk): a pooled analysis of prospective cohorts and health examination surveys. *lancet Diabetes Endocrinol* 2015;**3**:339–355.
 47. Giampaoli S. CUORE: a sustainable cardiovascular disease prevention strategy. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;**14**:161–162.

48. Jousilahti P, Laatikainen T, Peltonen M, Borodulin K, Männistö S, Jula A, Salomaa V, Harald K, Puska P, Vartiainen E. Primary prevention and risk factor reduction in coronary heart disease mortality among working aged men and women in eastern Finland over 40 years: population based observational study. *BMJ* 2016;**352**:i721.
49. Rubini Gimenez M, Twerenbold R, Reichlin T, Wildi K, Haaf P, Schaefer M, Zellweger C, Moehring B, Stallone F, Sou SM, Mueller M, Denhaerynck K, Mosimann T, Reiter M, Meller B, Freese M, Stelzig C, Klimmeck I, Voegelé J, Hartmann B, Rentsch K, Osswald S, Mueller C. Direct comparison of high-sensitivity-cardiac troponin I vs. T for the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2014;**35**:2303–2311.
50. Haaf P, Reichlin T, Twerenbold R, Hoeller R, Rubini Gimenez M, Zellweger C, Moehring B, Fischer C, Meller B, Wildi K, Freese M, Stelzig C, Mosimann T, Reiter M, Mueller M, Hochgruber T, Sou SM, Murray K, Minners J, Freidank H, Osswald S, Mueller C. Risk stratification in patients with acute chest pain using three high-sensitivity cardiac troponin assays. *Eur Heart J* 2014;**35**:365–375.
51. Ahmed W, Zafar S, Alam AY, Ahktar N, Shah MA, Alpert MA. Plasma Levels of B-Type Natriuretic Peptide in Patients With Unstable Angina Pectoris or Acute Myocardial Infarction: Prognostic Significance and Therapeutic Implications. *Angiology* 2007;**58**:269–274.
52. Thygesen K, Mair J, Mueller C, Huber K, Weber M, Plebani M, Hasin Y, Biasucci LM, Giannitsis E, Lindahl B, Koenig W, Tubaro M, Collinson P, Katus H, Galvani M, Venge P, Alpert JS, Hamm C, Jaffe AS. Recommendations for the use of natriuretic peptides in acute cardiac care: A position statement from the Study Group on Biomarkers in Cardiology of the ESC Working Group on Acute Cardiac Care. *Eur Heart J* 2012;**33**:2001–2006.
53. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE, Ganiats TG, Holmes DR, Jaffe AS, Jneid H, Kelly RF, Kontos MC, Levine GN, Liebson PR, Mukherjee D, Peterson ED, Sabatine MS, Smalling RW, Zieman SJ. 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2014;**64**:e139–e228.
54. American College of Emergency Physicians, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, O’Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE, Chung MK, Lemos JA de, Ettinger SM, Fang JC, Fesmire FM, Franklin BA, Granger CB, Krumholz HM, Linderbaum JA, Morrow DA, Newby LK, Ornato JP, Ou N, Radford MJ, Tamis-Holland JE, Tommaso CL, Tracy CM, Woo YJ, Zhao DX, Anderson JL, Jacobs AK, Halperin JL, Albert NM, Brindis RG, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013;**61**:e78–140.
55. Fox KAA, Dabbous OH, Goldberg RJ, Pieper KS, Eagle KA, Werf F Van de, Avezum A, Goodman SG, Flather MD, Anderson FA, Granger CB. Prediction of risk of death and myocardial infarction in the six months after presentation with acute coronary syndrome: prospective multinational observational study (GRACE). *BMJ* 2006;**333**:1091.
56. Fox KAAA, Fitzgerald G, Puymirat E, Huang W, Carruthers K, Simon T, Coste P, Monsegu J, Gabriel Steg P, Danchin N, Anderson F, Steg PG, Danchin N,

- Anderson F. Should patients with acute coronary disease be stratified for management according to their risk? Derivation, external validation and outcomes using the updated GRACE risk score. *BMJ Open* 2014;**4**:e004425.
57. Elbarouni B, Goodman SG, Yan RT, Welsh RC, Kornder JM, Deyoung JP, Wong GC, Rose B, Grondin FR, Gallo R, Tan M, Casanova A, Eagle KA, Yan AT, Canadian Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE/GRACE(2)) Investigators. Validation of the Global Registry of Acute Coronary Event (GRACE) risk score for in-hospital mortality in patients with acute coronary syndrome in Canada. *Am Heart J* 2009;**158**:392–399.
 58. Hung J, Roos A, Kadesjö E, McAllister DA, Kimenai DM, Shah AS V, Anand A, Strachan FE, Fox KAA, Mills NL, Chapman AR, Holzmann MJ. Performance of the GRACE 2.0 score in patients with type 1 and type 2 myocardial infarction. *Eur Heart J* 2021;**42**:2552–2561.
 59. Fox KAA, Carruthers KF, Dunbar DR, Graham C, Manning JR, Raedt H De, Buyschaert I, Lambrechts D, Werf F Van de. Underestimated and under-recognized: the late consequences of acute coronary syndrome (GRACE UK-Belgian Study). *Eur Heart J* 2010;**31**:2755–2764.
 60. Morrow DA, Antman EM, Charlesworth A, Cairns R, Murphy SA, Lemos JA de, Giugliano RP, McCabe CH, Braunwald E. TIMI risk score for ST-elevation myocardial infarction: A convenient, bedside, clinical score for risk assessment at presentation: An intravenous nPA for treatment of infarcting myocardium early II trial substudy. *Circulation* 2000;**102**:2031–2037.
 61. Bradshaw PJ, Ko DT, Newman AM, Donovan LR, Tu J V. Validation of the Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI) risk index for predicting early mortality in a population-based cohort of STEMI and non-STEMI patients. *Can J Cardiol* 2007;**23**:51–56.
 62. Müller C. Xanthomata, Hypercholesterolemia, Angina Pectoris. *Acta Med Scand* 2009;**95**:75–84.
 63. Roberts R, Wells GA, Stewart AFR, Dandona S, Chen L. The genome-wide association study--a new era for common polygenic disorders. *J Cardiovasc Transl Res* 2010;**3**:173–182.
 64. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, Faire U de. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1994;**330**:1041–1046.
 65. Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, Spertus JA. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. *JAMA* 2007;**297**:1551–1561.
 66. Anand SS, Xie C, Paré G, Montpetit A, Rangarajan S, McQueen MJ, Cordell HJ, Keavney B, Yusuf S, Hudson TJ, Engert JC, INTERHEART Investigators. Genetic variants associated with myocardial infarction risk factors in over 8000 individuals from five ethnic groups: The INTERHEART Genetics Study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;**2**:16–25.
 67. Roberts R. Genetics of coronary artery disease. *Circ Res* 2014;**114**:1890–1903.
 68. Rubin JB, Borden WB. Coronary heart disease in young adults. *Curr Atheroscler Rep* 2012;**14**:140–149.
 69. Doughty M. Acute myocardial infarction in the young— The University of Michigan experience. *Am Heart J* 2002;**143**:56–62.
 70. Leifheit-Limson EC, D’Onofrio G, Daneshvar M, Geda M, Bueno H, Spertus JA, Krumholz HM, Lichtman JH. Sex Differences in Cardiac Risk Factors, Perceived Risk, and Health Care Provider Discussion of Risk and Risk Modification Among

- Young Patients With Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2015;**66**:1949–1957.
71. Malmberg K, Båvenholm P, Hamsten A. Clinical and biochemical factors associated with prognosis after myocardial infarction at a young age. *J Am Coll Cardiol* 1994;**24**:592–599.
 72. Choi J, Daskalopoulou SS, Thanassoulis G, Karp I, Pelletier R, Behloul H, Pilote L. Sex- and Gender-Related Risk Factor Burden in Patients With Premature Acute Coronary Syndrome. *Can J Cardiol* 2014;**30**:109–117.
 73. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, Bird CP, Grassi A de, Lee C, Tyler-Smith C, Carter N, Scherer SW, Tavaré S, Deloukas P, Hurler ME, Dermitzakis ET. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 2007;**315**:848–853.
 74. CARDIoGRAMplusC4D Consortium, Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, Ingelsson E, Saleheen D, Erdmann J, Goldstein BA, Stirrups K, König IR, Cazier J-B, Johansson A, Hall AS, Lee J-YJ-Y, Willer CJ, Chambers JC, Esko T, Folkersen L, Goel A, Grundberg E, Havulinna AS, Ho WK, Hopewell JC, Eriksson N, Kleber ME, Kristiansson K, Lundmark P, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2013;**45**:25–33.
 75. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, Preuss M, Stewart AFR, Barbalic M, Gieger C, Absher D, Aherrahrou Z, Allayee H, Altshuler D, Anand SS, Andersen K, Anderson JL, Ardisino D, Ball SG, Balmforth AJ, Barnes T a, Becker DM, Becker LC, Berger K, Bis JC, Boehholdt SM, Boerwinkle E, Braund PS, Brown MJ, Burnett MS, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2011;**43**:333–338.
 76. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann H-E, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet D-A, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM, Braenne I, Gieger C, Deloukas P, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 2007;**357**:443–453.
 77. Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir AA, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A, Masson G, Gudbjartsson DF, Magnusson KP, Andersen K, Levey AI, Backman VM, Matthiasdottir S, Jonsdottir T, Palsson S, Einarsdottir H, Gunnarsdottir S, Gylfason A, Vaccarino V, Hooper WC, Reilly MP, Granger CB, Austin H, Rader DJ, Shah SH, Quyyumi A a, Gulcher JR, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007;**316**:1491–1493.
 78. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007;**316**:1488–1491.
 79. A comprehensive 1000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nat Genet* 2015;**47**:1121–1130.
 80. Nelson CP, Goel A, Butterworth AS, Kanoni S, Webb TR, Marouli E, Zeng L, Ntalla I, Lai FY, Hopewell JC, Giannakopoulou O, Jiang T, Hamby SE, Angelantonio E Di, Assimes TL, Bottinger EP, Chambers JC, Clarke R, Palmer CNA, Cubbon RM, Ellinor P, Ermel R, Evangelou E, Franks PW, Grace C, Gu D, Hingorani AD, Howson JMM, Ingelsson E, Kastrati A, et al. Association analyses

- based on false discovery rate implicate new loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2017;**49**:1385–1391.
81. Gupta RM, Hadaya J, Trehan A, Zekavat SM, Roselli C, Klarin D, Emdin CA, Hilvering CRE, Bianchi V, Mueller C, Khera A V., Ryan RJH, Engreitz JM, Issner R, Shores N, Epstein CB, Laati W de, Brown JD, Schnabel RB, Bernstein BE, Kathiresan S. A Genetic Variant Associated with Five Vascular Diseases Is a Distal Regulator of Endothelin-1 Gene Expression. *Cell* 2017;**170**:522-533.e15.
 82. Chatterjee N, Shi J, García-Closas M. Developing and evaluating polygenic risk prediction models for stratified disease prevention. *Nat Rev Genet* 2016;**17**:392–406.
 83. Iribarren C, Lu M, Jorgenson E, Martínez M, Lluís-Ganella C, Subirana I, Salas E, Elosua R. Clinical Utility of Multimarker Genetic Risk Scores for Prediction of Incident Coronary Heart Disease: A Cohort Study among over 51 Thousand Individuals of European Ancestry. *Circ Cardiovasc Genet* 2016;**9**:531–540.
 84. Mosley JD, Gupta DK, Tan J, Yao J, Wells QS, Shaffer CM, Kundu S, Robinson-Cohen C, Psaty BM, Rich SS, Post WS, Guo X, Rotter JI, Roden DM, Gerszten RE, Wang TJ. Predictive Accuracy of a Polygenic Risk Score Compared With a Clinical Risk Score for Incident Coronary Heart Disease. *JAMA* 2020;**323**:627–635.
 85. Ganna A, Magnusson PKE, Pedersen NL, Faire U de, Reilly M, Arnlöv J, Sundström J, Hamsten A, Ingelsson E. Multilocus genetic risk scores for coronary heart disease prediction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;**33**:2267–2272.
 86. Brautbar A, Pompeii LA, Dehghan A, Ngwa JS, Nambi V, Virani SS, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Hofman A, Witteman JCM, Pencina MJ, Folsom AR, Cupples LA, Ballantyne CM, Boerwinkle E. A genetic risk score based on direct associations with coronary heart disease improves coronary heart disease risk prediction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC), but not in the Rotterdam and Framingham Offspring, Studies. *Atherosclerosis* 2012;**223**:421–426.
 87. Cole JH, Miller JI, Sperling LS, Weintraub WS. Long-term follow-up of coronary artery disease presenting in young adults. *J Am Coll Cardiol Elsevier Masson SAS*; 2003;**41**:521–528.
 88. Rincón LM, Sanmartín M, Alonso GL, Rodríguez JA, Muriel A, Casas E, Navarro M, Carbonell A, Lázaro C, Fernández S, González P, Rodríguez M, Jiménez-Mena M, Fernández-Golfín C, Esteban A, García-Bermejo ML, Zamorano JL. A genetic risk score predicts recurrent events after myocardial infarction in young adults. *Rev Española Cardiol (English Ed)* 2020;**73**:623–631.
 89. Fu X-D. Non-coding RNA: a new frontier in regulatory biology. *Natl Sci Rev* 2014;**1**:190–204.
 90. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. 2016. p. 3–17.
 91. Non-coding DNA – a brief review. *J Appl Biol Biotechnol* 2017;
 92. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 2015;**16**:421–433.
 93. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;**20**:21–37.
 94. Salloum-Asfar S, Satheesh NJ, Abdulla SA. Circulating miRNAs, Small but Promising Biomarkers for Autism Spectrum Disorder. *Front Mol Neurosci* 2019;**12**.
 95. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4*

- encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993;**75**:843–854.
96. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;**403**:901–906.
 97. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000;**408**:86–89.
 98. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 2018;**173**:20–51.
 99. Mohr A, Mott J. Overview of MicroRNA Biology. *Semin Liver Dis* 2015;**35**:003–011.
 100. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2010;**1803**:1231–1243.
 101. Rivera-Barahona A, Pérez B, Richard E, Desviat LR. Role of miRNAs in human disease and inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2017;**40**:471–480.
 102. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb Haemost* 2012;**107**:605–610.
 103. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A. Smad Proteins Bind a Conserved RNA Sequence to Promote MicroRNA Maturation by Drosha. *Mol Cell* 2010;**39**:373–384.
 104. Trabucchi M, Briata P, Garcia-Mayoral M, Haase AD, Filipowicz W, Ramos A, Gherzi R, Rosenfeld MG. The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* 2009;**459**:1010–1014.
 105. Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective Blockade of MicroRNA Processing by Lin28. *Science (80-)* 2008;**320**:97–100.
 106. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;**9**.
 107. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol* 2019;**234**:5451–5465.
 108. Hanna J, Hossain GS, Kocerha J. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Front Genet* 2019;**10**.
 109. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002;**48**:1647–1653.
 110. Turchinovich A, Weiz L, Langheinze A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011;**39**:7223–7233.
 111. Hata A. Functions of MicroRNAs in Cardiovascular Biology and Disease. *Annu Rev Physiol* 2013;**75**:69–93.
 112. Mayr M, Zampetaki A, Willeit P, Willeit J, Kiechl S. MicroRNAs Within the Continuum of Postgenomics Biomarker Discovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;**33**:206–214.
 113. Bonneau E, Neveu B, Kostantin E, Tsongalis GJ, Guire V De. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC* 2019;**30**:114–127.
 114. Goldberg L, Tirosh-Wagner T, Vardi A, Abbas H, Pillar N, Shomron N, Nevo-Caspi Y, Paret G. Circulating MicroRNAs: a Potential Biomarker for Cardiac Damage, Inflammatory Response, and Left Ventricular Function Recovery in

- Pediatric Viral Myocarditis. *J Cardiovasc Transl Res* 2018;**11**:319–328.
115. Velle-Forbord T, Eidlaug M, Debik J, Sæther JC, Follestad T, Nauman J, Gigante B, Røsjø H, Omland T, Langaas M, Bye A. Circulating microRNAs as predictive biomarkers of myocardial infarction: Evidence from the HUNT study. *Atherosclerosis* 2019;**289**:1–7.
 116. Lu M, Yuan S, Li S, Li L, Liu M, Wan S. The Exosome-Derived Biomarker in Atherosclerosis and Its Clinical Application. *J Cardiovasc Transl Res* 2019;**12**:68–74.
 117. Devaux Y, Creemers EE, Boon RA, Werfel S, Thum T, Engelhardt S, Dimmeler S, Squire I. Circular RNAs in heart failure. *Eur J Heart Fail* 2017;**19**:701–709.
 118. Dutka M, Bobiński R, Korbecki J. The relevance of microRNA in post-infarction left ventricular remodelling and heart failure. *Heart Fail Rev* 2019;**24**:575–586.
 119. Kim GH. MicroRNA regulation of cardiac conduction and arrhythmias. *Transl Res* 2013;**161**:381–392.
 120. Boon RA, Dimmeler S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol* 2015;**12**:135–142.
 121. Xiao J, ed. Non-coding RNAs in Cardiovascular Diseases. Singapore: Springer Singapore; 2020.
 122. Hong DS, Kang Y-K, Borad M, Sachdev J, Ejadi S, Lim HY, Brenner AJ, Park K, Lee J-L, Kim T-Y, Shin S, Becerra CR, Falchook G, Stoudemire J, Martin D, Kelnar K, Peltier H, Bonato V, Bader AG, Smith S, Kim S, O'Neill V, Beg MS. Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2020;**122**:1630–1637.
 123. Sigalotti L, Fratta E, Coral S, Cortini E, Covre A, Nicolay HJM, Anzalone L, Pezzani L, Giacomo AM Di, Fonsatti E, Colizzi F, Altomonte M, Calabrò L, Maio M. Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: Biomolecular aspects and clinical applications. *J Cell Physiol* 2007;**212**:330–344.
 124. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006;**9**:435–443.
 125. Tao J, Xia L, Cai Z, Liang L, Chen Y, Meng J, Wang Z. Interaction Between microRNA and DNA Methylation in Atherosclerosis. *DNA Cell Biol* 2021;**40**:101–115.
 126. Schiano C, Benincasa G, Franzese M, Mura N Della, Pane K, Salvatore M, Napoli C. Epigenetic-sensitive pathways in personalized therapy of major cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther* 2020;**210**:107514.
 127. Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SFA, Thorgeirsson G, Sveinbjornsdóttir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdóttir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdóttir M, Andresdóttir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson H, Gulcher JR, Stefansson K. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet* 2004;**36**:233–239.
 128. Huang H, Zeng Z, Li J, Zhang L, Chen Y. Variants of arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) gene and risk of coronary heart disease: A meta-analysis. *Arch Med Res* 2010;**41**:634–641.
 129. Tsai AK, Li N, Hanson NQ, Tsai MY, Tang W. Associations of genetic polymorphisms of arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein with risk of coronary artery disease in a European-American population. *Atherosclerosis*

- 2009;**207**:487–491.
130. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005;**76**:887–893.
 131. Carr JJ, Nelson JC, Wong ND, McNitt-Gray M, Arad Y, Jacobs DR, Sidney S, Bild DE, Williams OD, Detrano RC. Calcified coronary artery plaque measurement with cardiac CT in population-based studies: standardized protocol of Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) and Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Radiology* 2005;**234**:35–43.
 132. Orbe J, Montero I, Rodríguez JA, Beloqui O, Roncal C, Páramo JA. Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2007;**5**:91–97.
 133. Martínez-Aguilar E, Gómez-Rodríguez V, Orbe J, Rodríguez JA, Fernández-Alonso L, Roncal C, Páramo JA. Matrix metalloproteinase 10 is associated with disease severity and mortality in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg Society for Vascular Surgery*; 2015;**61**:428–435.
 134. Lorente L, Martín MM, Ramos L, Cáceres JJ, Solé-Violán J, Argueso M, Jiménez A, Borreguero-León JM, Orbe J, Rodríguez JA, Páramo JA. Serum tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels are associated with mortality in patients with malignant middle cerebral artery infarction. *BMC Neurol* 2015;**15**.
 135. Uno H, Tian L, Cai T, Kohane IS, Wei LJ. A unified inference procedure for a class of measures to assess improvement in risk prediction systems with survival data. *Stat Med* 2013;**32**:2430–2442.
 136. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 2015;**4**.
 137. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;**4**:44–57.
 138. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 2012;**16**:284–287.
 139. Bastian M, Heymann S, Jacomy M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. *Proc Third Int AAAI Conf Weblogs Soc Media, San Jose, CA, USA, 17–20 May 2009* 2009;361–362.
 140. Uno H, Cai T, Pencina MJ, D’Agostino RB, Wei LJ. On the C-statistics for evaluating overall adequacy of risk prediction procedures with censored survival data. *Stat Med* 2011;**30**:1105–1117.
 141. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011.
 142. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Exp Physiol* 2010;**95**:842–844.
 143. Kuznetsov A V, Javadov S, Sickinger S, Frotschnig S, Grimm M. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochim Biophys Acta* 2015;**1853**:276–284.
 144. Sáenz-Morales D, Escribese MM, Stamatakis K, García-Martos M, Alegre L, Conde E, Pérez-Sala D, Mampaso F, García-Bermejo ML. Requirements for proximal tubule epithelial cell detachment in response to ischemia: role of oxidative stress. *Exp Cell Res* 2006;**312**:3711–3727.
 145. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010;**11**:597–610.
 146. Rincón LM, Rodríguez-Serrano M, Conde E, F. Lanza V, Sanmartín M, González-Portilla P, Paz-García M, Rey JM del, Menacho M, García-Bermejo M-L,

- Zamorano JL. Serum microRNAs are key predictors of long-term heart failure and cardiovascular death after myocardial infarction. *ESC Hear Fail* 2021;[Submitted-2nd review].
147. Assimes TL, Roberts R. Genetics: Implications for Prevention and Management of Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol* 2016;**68**:2797–2818.
 148. Mega JL, Stitzel NO, Smith JG, Chasman DI, Caulfield MJ, Devlin JJ, Nordio F, Hyde CL, Cannon CP, Sacks FM, Poulter NR, Sever PS, Ridker PM, Braunwald E, Melander O, Kathiresan S, Sabatine MS. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: An analysis of primary and secondary prevention trials. *Lancet* 2015;**385**:2264–2271.
 149. Buyschaert I, Carruthers KF, Dunbar DR, Peuteman G, Rietzschel E, Belmans A, Hedley A, Meyer T De, Budaj A, Werf F Van De, Lambrechts D, Fox KAA. A variant at chromosome 9p21 is associated with recurrent myocardial infarction and cardiac death after acute coronary syndrome: The GRACE genetics study. *Eur Heart J* 2010;**31**:1132–1141.
 150. Gong Y, Beitelshees AL, Cooper-DeHoff RM, Lobmeyer MT, Langae TY, Wu J, Cresci S, Province MA, Spertus JA, Pepine CJ, Johnson JA. Chromosome 9p21 haplotypes and prognosis in white and black patients with coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2011;**4**:169–178.
 151. Wauters E, Carruthers KF, Buyschaert I, Dunbar DR, Peuteman G, Belmans A, Budaj A, Werf F Van De, Lambrechts D, Fox KAAA. Influence of 23 coronary artery disease variants on recurrent myocardial infarction or cardiac death: The GRACE Genetics Study. *Eur Heart J* 2013;**34**:993–1001.
 152. Vaara S, Tikkanen E, Parkkonen O, Lokki M-LL, Ripatti S, Perola M, Nieminen MS, Sinisalo J. Genetic Risk Scores Predict Recurrence of Acute Coronary Syndrome. *Clinical Perspective*. *Circ Cardiovasc Genet* 2016;**9**:172–178.
 153. Labos C, Martinez SC, Leo Wang RH, Lenzini PA, Pilote L, Bogaty P, Brophy JM, Engert JC, Cresci S, Thanassoulis G. Utility of a genetic risk score to predict recurrent cardiovascular events 1 year after an acute coronary syndrome: A pooled analysis of the RISCA, PRAXY, and TRIUMPH cohorts. *Atherosclerosis Elsevier Ltd*; 2015;**242**:261–267.
 154. Roberts R. Genetic Risk Stratification. *Circulation* 2018;**137**:2554–2556.
 155. Brion M, González-Juanatey JR, Carracedo Á. Polygenic risk score as a key factor in cardiovascular clinical prediction models. *Rev Española Cardiol (English Ed)* 2020;**73**:608–610.
 156. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TFC, McCarroll SA, Visscher PM. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009;**461**:747–753.
 157. Damask A, Steg PG, Schwartz GG, Szarek M, Hagström E, Badimon L, Chapman MJ, Boileau C, Tsimikas S, Ginsberg HN, Banerjee P, Manvelian G, Pordy R, Hess S, Overton JD, Lotta LA, Yancopoulos GD, Abecasis GR, Baras A, Paulding C. Patients with High Genome-Wide Polygenic Risk Scores for Coronary Artery Disease May Receive Greater Clinical Benefit from Alirocumab Treatment in the ODYSSEY OUTCOMES Trial. *Circulation* 2020;
 158. Khera A V., Chaffin M, Zekavat SM, Collins RL, Roselli C, Natarajan P, Lichtman JH, D’Onofrio G, Mathera J, Dreyer R, Spertus JA, Taylor KD, Psaty BM, Rich SS, Post W, Gupta N, Gabriel S, Lander E, Ida Chen Y-D, Talkowski ME, Rotter JI,

- Krumholz HM, Kathiresan S. Whole-Genome Sequencing to Characterize Monogenic and Polygenic Contributions in Patients Hospitalized With Early-Onset Myocardial Infarction. *Circulation* 2019;**139**:1593–1602.
159. Tada H, Melander O, Louie JZ, Catanese JJ, Rowland CM, Devlin JJ, Kathiresan S, Shiffman D. Risk prediction by genetic risk scores for coronary heart disease is independent of self-reported family history. *Eur Heart J* 2016;**37**:561–567.
160. Dudum R, Dzaye O, Mirbolouk M, Dardari ZA, Orimoloye OA, Budoff MJ, Berman DS, Rozanski A, Miedema MD, Nasir K, Rumberger JA, Shaw L, Whelton SP, Graham G, Blaha MJ. Coronary artery calcium scoring in low risk patients with family history of coronary heart disease: Validation of the SCCT guideline approach in the coronary artery calcium consortium. *J Cardiovasc Comput Tomogr* 2019;**13**:21–25.
161. DeLeon-Pennell KY, Meschiari CA, Jung M, Lindsey ML. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017;**75**–100.
162. Chew DP, Astley CM, Luker H, Alprandi-Costa B, Hillis G, Chow CK, Quinn S, Yan AT, Gale CP, Goodman S, Fox KAA, Brieger D. A cluster randomized trial of objective risk assessment versus standard care for acute coronary syndromes: Rationale and design of the Australian GRACE Risk score Intervention Study (AGRIS). *Am Heart J* 2015;**170**:995-1004.e1.
163. Sans S, Fitzgerald AP, Royo D, Conroy R, Graham I. [Calibrating the SCORE cardiovascular risk chart for use in Spain]. *Rev Esp Cardiol* 2007;**60**:476–485.
164. Chan MY, Shah BR, Gao F, Sim LL, Chua T, Tan HC, Yeo TC, Ong HY, Foo D, Goh PP, Surrin SK, Pieper KS, Granger CB, Koh TH, Salim A, Tai ES. Recalibration of the Global Registry of Acute Coronary Events risk score in a multiethnic Asian population. *Am Heart J* 2011;**162**:291–299.
165. Alter DA, Venkatesh V, Chong A, SESAMI Study Group. Evaluating the performance of the Global Registry of Acute Coronary Events risk-adjustment index across socioeconomic strata among patients discharged from the hospital after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2006;**151**:323–331.
166. Gan J, Yuan J, Liu Y, Lu Z, Xue Y, Shi L, Zeng H. Circular RNA_101237 mediates anoxia/reoxygenation injury by targeting let-7a-5p/IGF2BP3 in cardiomyocytes. *Int J Mol Med* 2020;**45**:451–460.
167. Gong X, Zhu Y, Chang H, Li Y, Ma F. Long noncoding RNA MALAT1 promotes cardiomyocyte apoptosis after myocardial infarction via targeting miR-144-3p. *Biosci Rep* 2019;**39**.
168. Infante T, Forte E, Punzo B, Cademartiri F, Cavaliere C, Soricelli A, Salvatore M, Napoli C. Correlation of Circulating miR-765, miR-93-5p, and miR-433-3p to Obstructive Coronary Heart Disease Evaluated by Cardiac Computed Tomography. *Am J Cardiol* 2019;**124**:176–182.
169. Zhang H, Rombouts K, Raes L, Xiong R, Smedt SC De, Braeckmans K, Remaut K. Fluorescence-Based Quantification of Messenger RNA and Plasmid DNA Decay Kinetics in Extracellular Biological Fluids and Cell Extracts. *Adv Biosyst* 2020;**4**:2000057.
170. Lindsey ML, Bolli R, Canty JM, Du X-J, Frangogiannis NG, Frantz S, Gourdie RG, Holmes JW, Jones SP, Kloner RA, Lefter DJ, Liao R, Murphy E, Ping P, Przyklenk K, Recchia FA, Schwartz Longacre L, Ripplinger CM, Eyk JE Van, Heusch G. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Circ Physiol* 2018;**314**:H812–H838.
171. Charrier H, Cuvelliez M, Dubois-Deruy E, Mulder P, Richard V, Bauters C, Pinet

- F. Integrative System Biology Analyses Identify Seven MicroRNAs to Predict Heart Failure. *Non-coding RNA* 2019;**5**.
172. Zhang HM, Cheung P, Yanagawa B, McManus BM, Yang DC. BNips: a group of pro-apoptotic proteins in the Bcl-2 family. *Apoptosis* 2003;**8**:229–236.
173. Braile M, Marcella S, Cristinziano L, Galdiero MR, Modestino L, Ferrara AL, Varricchi G, Marone G, Loffredo S. VEGF-A in Cardiomyocytes and Heart Diseases. *Int J Mol Sci* 2020;**21**:5294.
174. Frank D, Gantenberg J, Boomgaarden I, Kuhn C, Will R, Jarr K-U, Eden M, Kramer K, Luedde M, Mairbäurl H, Katus HA, Frey N. MicroRNA-20a inhibits stress-induced cardiomyocyte apoptosis involving its novel target Egl3/PHD3. *J Mol Cell Cardiol* 2012;**52**:711–717.
175. Chen J, Huang Z-P, Seok HY, Ding J, Kataoka M, Zhang Z, Hu X, Wang G, Lin Z, Wang S, Pu WT, Liao R, Wang D-Z. mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ Res* 2013;**112**:1557–1566.
176. Shi Y, Zhang Z, Yin Q, Fu C, Barszczyk A, Zhang X, Wang J, Yang D. Cardiac-specific overexpression of miR-122 induces mitochondria-dependent cardiomyocyte apoptosis and promotes heart failure by inhibiting Hand2. *J Cell Mol Med* 2021;**25**:5326–5334.
177. Liu X, Meng H, Jiang C, Yang S, Cui F, Yang P. Differential microRNA Expression and Regulation in the Rat Model of Post-Infarction Heart Failure. *PLoS One* 2016;**11**:e0160920.
178. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, Karakas M, Ojeda F, Lau DM, Hartmann T, Lackner KJ, Westermann D, Schnabel RB, Blankenberg S, Zeller T. MiRNA-197 and miRNA-223 predict cardiovascular death in a cohort of patients with symptomatic coronary artery disease. *PLoS One* 2015;
179. Karakas M, Schulte C, Appelbaum S, Ojeda F, Lackner KJ, Münzel T, Schnabel RB, Blankenberg S, Zeller T. Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease-results from the large AtheroGene study. *Eur Heart J* 2017;**38**:516–523.
180. He F, Lv P, Zhao X, Wang X, Ma X, Meng W, Meng X, Dong S. Predictive value of circulating miR-328 and miR-134 for acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2014;**394**:137–144.
181. Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, Drozdov I, Prokopi M, Renard J-M, Mayr A, Weger S, Schett G, Shah A, Boulanger CM, Willeit J, Chowienczyk PJ, Kiechl S, Mayr M. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;**60**:290–299.
182. Jakob P, Kacprowski T, Briand-Schumacher S, Heg D, Klingenberg R, Stähli BE, Jaguszewski M, Rodondi N, Nanchen D, Räber L, Vogt P, Mach F, Windecker S, Völker U, Matter CM, Lüscher TF, Landmesser U. Profiling and validation of circulating microRNAs for cardiovascular events in patients presenting with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J* 2017;**38**:511–515.
183. Hromádka M, Černá V, Pešta M, Kučerová A, Jarkovský J, Rajdl D, Rokyta R, Mořovská Z. Prognostic Value of MicroRNAs in Patients after Myocardial Infarction: A Substudy of PRAGUE-18. *Dis Markers* 2019;**2019**:2925019.
184. Cao W, Guo Q, Zhang T, Zhong D, Yu Q. Prognostic value of microRNAs in acute myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol Elsevier Ireland Ltd*; 2015;**189**:79–84.
185. Bayes-Genis A, Voors AA, Zannad F, Januzzi JL, Mark Richards A, Díez J. Transitioning from usual care to biomarker-based personalized and precision

- medicine in heart failure: call for action. *Eur Heart J* 2018;**39**:2793–2799.
186. Maciejak A, Kostarska-Srokosz E, Gierlak W, Dluzniewski M, Kuch M, Marchel M, Opolski G, Kiliszek M, Matlak K, Dobrzycki S, Lukasik A, Segiet A, Sygitowicz G, Sitkiewicz D, Gora M, Burzynska B. Circulating miR-30a-5p as a prognostic biomarker of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction. *Sci Rep* 2018;**8**:9883.
 187. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Kelly D, Collignon O, Ng LL, Wagner DR, Squire IB. A Panel of 4 microRNAs Facilitates the Prediction of Left Ventricular Contractility after Acute Myocardial Infarction. Rouet P, ed. *PLoS One* 2013;**8**:e70644.
 188. Zeller T, Keller T, Ojeda F, Reichlin T, Twerenbold R, Tzikas S, Wild PS, Reiter M, Czyz E, Lackner KJ, Munzel T, Mueller C, Blankenberg S. Assessment of microRNAs in patients with unstable angina pectoris. *Eur Heart J* 2014;**35**:2106–2114.
 189. Wang SS, Wu LJ, Li JJH, Xiao HB, He Y, Yan YX. A meta-analysis of dysregulated miRNAs in coronary heart disease. *Life Sci Elsevier*; 2018;**215**:170–181.
 190. Parahuleva MS, Euler G, Mardini A, Parviz B, Schieffer B, Schulz R, Aslam M. Identification of microRNAs as potential cellular monocytic biomarkers in the early phase of myocardial infarction: A pilot study. *Sci Rep Springer US*; 2017;**7**:1–10.
 191. Wang L, Jin Y. Noncoding RNAs as Biomarkers for Acute Coronary Syndrome. *Biomed Res Int* 2020;**2020**:1–11.
 192. Cruz MS, Silva AMG da, Souza KSC de, Luchessi AD, Silbiger VN. miRNAs emerge as circulating biomarkers of post-myocardial infarction heart failure. *Heart Fail Rev* 2020;**25**:321–329.
 193. Backes C, Leidinger P, Altmann G, Wuerstle M, Meder B, Galata V, Mueller SC, Sickert D, Stähler C, Meese E, Keller A. Influence of Next-Generation Sequencing and Storage Conditions on miRNA Patterns Generated from PAXgene Blood. *Anal Chem* 2015;**87**:8910–8916.
 194. Faraldi M, Gomasasca M, Sansoni V, Perego S, Banfi G, Lombardi G. Normalization strategies differently affect circulating miRNA profile associated with the training status. *Sci Rep* 2019;**9**:1584.
 195. Donati S, Ciuffi S, Brandi ML. Human Circulating miRNAs Real-time qRT-PCR-based Analysis: An Overview of Endogenous Reference Genes Used for Data Normalization. *Int J Mol Sci* 2019;**20**:4353.
 196. Iborra-Egea O, Rueda F, Lakkisto P, Harjola V-P, García-García C, Bayes-Genis A. Circulating MiRNA Dynamics in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction-driven Cardiogenic Shock. *Rev Española Cardiol (English Ed)* 2019;**72**:783–786.
 197. Bertoia ML, Bertrand KA, Sawyer SJ, Rimm EB, Mukamal KJ, Jeyaseelan K. Reproducibility of circulating MicroRNAs in stored plasma samples. *PLoS One* 2015;**10**:1–15.
 198. Shalaby SM, El-Shal AS, Shoukry A, Khedr MH, Abdelraheim N. Serum miRNA-499 and miRNA-210: A potential role in early diagnosis of acute coronary syndrome. *IUBMB Life* 2016;
 199. Qiu Q, Shen T, Wang Q, Yu X, Jia N, He Q. Cardiac shock wave therapy protects cardiomyocytes from hypoxia-induced injury by modulating miR-210. *Mol Med Rep* 2019;
 200. Zhu J, Lu K, Zhang N, Zhao Y, Ma Q, Shen J, Lin Y, Xiang P, Tang Y, Hu X, Chen J, Zhu W, Webster KA, Wang J, Yu H. Myocardial reparative functions of

- exosomes from mesenchymal stem cells are enhanced by hypoxia treatment of the cells via transferring microRNA-210 in an nSMase2-dependent way. *Artif cells, nanomedicine, Biotechnol* 2018;**46**:1659–1670.
201. Hu S, Huang M, Nguyen PK, Gong Y, Li Z, Jia F, Lan F, Liu J, Nag D, Robbins RC, Wu JC. Novel MicroRNA Prosurvival Cocktail for Improving Engraftment and Function of Cardiac Progenitor Cell Transplantation. *Circulation* 2011;**124**.
 202. Veliceasa D, Biyashev D, Qin G, Misener S, Mackie AR, Kishore R, Volpert O V. Therapeutic manipulation of angiogenesis with miR-27b. *Vasc Cell* 2015;
 203. Hinkel R, Ramanujam D, Kaczmarek V, Howe A, Klett K, Beck C, Dueck A, Thum T, Laugwitz K-L, Maegdefessel L, Weber C, Kupatt C, Engelhardt S. AntimiR-21 Prevents Myocardial Dysfunction in a Pig Model of Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Coll Cardiol* 2020;**75**:1788–1800.
 204. Roy S, Khanna S, Hussain S-RA, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res* 2009;**82**:21–29.
 205. Liang H, Zhang C, Ban T, Liu Y, Mei L, Piao X, Zhao D, Lu Y, Chu W, Yang B. A novel reciprocal loop between microRNA-21 and TGF β RIII is involved in cardiac fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;**44**:2152–2160.
 206. Ghosh AK, Nagpal V, Covington JW, Michaels MA, Vaughan DE. Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT): Differential expression of microRNAs during EndMT. *Cell Signal* 2012;**24**:1031–1036.
 207. Huang X, Huang F, Yang D, Dong F, Shi X, Wang H, Zhou X, Wang S, Dai S. Expression of microRNA-122 contributes to apoptosis in H9C2 myocytes. *J Cell Mol Med* 2012;
 208. Beaumont J, López B, Hermida N, Schroen B, San José G, Heymans S, Valencia F, Gómez-Doblas JJ, Teresa E De, Díez J, González A. microRNA-122 down-regulation may play a role in severe myocardial fibrosis in human aortic stenosis through TGF- β 1 up-regulation. *Clin Sci* 2014;**126**:497–506.
 209. Liang W, Guo J, Li J, Bai C, Dong Y. Downregulation of miR-122 attenuates hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced myocardial cell apoptosis by upregulating GATA-4. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;**478**:1416–1422.
 210. Paavola J, Schliffke S, Rossetti S, Kuo IY-T, Yuan S, Sun Z, Harris PC, Torres VE, Ehrlich BE. Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2013;**58**:199–208.
 211. Shimokawa H, Sunamura S, Satoh K. RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System. *Circ Res* 2016;**118**:352–366.
 212. Raucci A, Maggio S Di, Scavello F, D'Ambrosio A, Bianchi ME, Capogrossi MC. The Janus face of HMGB1 in heart disease: a necessary update. *Cell Mol Life Sci* 2019;**76**:211–229.
 213. Tham YK, Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, McMullen JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol* 2015;**89**:1401–1438.
 214. Rees ML, Subramaniam J, Li Y, Hamilton DJ, Frazier OH, Taegtmeier H. A PKM2 signature in the failing heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;**459**:430–436.
 215. Wang J-X, Zhang X-J, Li Q, Wang K, Wang Y, Jiao J-Q, Feng C, Teng S, Zhou L-Y, Gong Y, Zhou Z-X, Liu J, Wang J-L, Li P. MicroRNA-103/107 Regulate Programmed Necrosis and Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Through

- Targeting FADD. *Circ Res* 2015;**117**:352–363.
216. Bye A, Røsjø H, Nauman J, Silva GJJ, Follestad T, Omland T, Wisløff U. Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - The HUNT study. *J Mol Cell Cardiol* 2016;**97**:162–168.
 217. Bayoumi AS, Teoh J-PP, Aonuma T, Yuan Z, Ruan X, Tang Y, Su H, Weintraub NL, Kim I-MM. MicroRNA-532 protects the heart in acute myocardial infarction, and represses prss23, a positive regulator of endothelial-to-mesenchymal transition. *Cardiovasc Res* 2017;**113**:1603–1614.
 218. Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, Fasanaro P, Sun N, Wang X, Martelli F, Robbins RC, Wu JC. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation* 2010;
 219. Song Y-S, Joo H-W, Park I-H, Shen G-Y, Lee Y, Shin JH, Kim H, Kim K-S. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived vascular endothelial growth factor attenuates cardiac apoptosis via regulation of cardiac miRNA-23a and miRNA-92a in a rat model of myocardial infarction. Fan G-C, ed. *PLoS One* 2017;**12**:e0179972.
 220. Long B, Gan T-Y, Zhang R-C, Zhang Y-H. miR-23a Regulates Cardiomyocyte Apoptosis by Targeting Manganese Superoxide Dismutase. *Mol Cells* 2017;**40**:542–549.
 221. Lu M, Xu Y, Wang M, Guo T, Luo F, Su N, Wang Z, Xu L, Liu Z. MicroRNA-23 inhibition protects the ischemia/reperfusion injury via inducing the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Int J Clin Exp Pathol* 2019;**12**:1060–1069.
 222. Pandey R, Yang Y, Jackson L, Ahmed RPH. MicroRNAs regulating meis1 expression and inducing cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Regen Med* 2016;**3**.
 223. Marston NA, Kamanu FK, Nordio F, Gurmu Y, Roselli C, Sever PS, Pedersen TR, Keech AC, Wang H, Pineda AL, Giugliano RP, Lubitz SA, Ellinor PT, Sabatine MS, Ruff CT. Predicting Benefit from Evolocumab Therapy in Patients with Atherosclerotic Disease Using a Genetic Risk Score. *Circulation* 2020;
 224. Khera A V., Emdin CA, Drake I, Natarajan P, Bick AG, Cook NR, Chasman DI, Baber U, Mehran R, Rader DJ, Fuster V, Boerwinkle E, Melander O, Ortho-Melander M, Ridker PM, Kathiresan S, Marju OM, Ridker PM, Kathiresan S. Genetic risk, adherence to a healthy lifestyle, and coronary disease. *N Engl J Med* 2016;**375**:2349–2358.
 225. Hollands GJ, French DP, Griffin SJ, Prevost AT, Sutton S, King S, Marteau TM. The impact of communicating genetic risks of disease on risk-reducing health behaviour: systematic review with meta-analysis. *BMJ* 2016;i1102.
 226. Pinchi E, Frati P, Aromatario M, Cipolloni L, Fabbri M, Russa R La, Maiese A, Neri M, Santurro A, Scopetti M, Viola RV, Turillazzi E, Fineschi V. miR-1, miR-499 and miR-208 are sensitive markers to diagnose sudden death due to early acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med* 2019;**23**:6005–6016.
 227. Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, Field LJ, Fleischmann BK, Frisén J, Giacca M, Hare JM, Houser S, Lee RT, Marbán E, Martin JF, Molkenstein JD, Murry CE, Riley PR, Ruiz-Lozano P, Sadek HA, Sussman MA, Hill JA. Cardiomyocyte Regeneration. *Circulation* 2017;**136**:680–686.
 228. Müller P, Lemcke H, David R. Stem Cell Therapy in Heart Diseases – Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cell Physiol Biochem* 2018;**48**:2607–2655.
 229. Dimmeler S, Ding S, Rando TA, Trounson A. Translational strategies and

- challenges in regenerative medicine. *Nat Med* 2014;**20**:814–821.
230. Moghaddam AS, Afshari JT, Esmaeili S-A, Saburi E, Joneidi Z, Momtazi-Borojeni AA. Cardioprotective microRNAs: Lessons from stem cell-derived exosomal microRNAs to treat cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2019;**285**:1–9.
231. Barile L, Lionetti V, Cervio E, Matteucci M, Gherghiceanu M, Popescu LM, Torre T, Siclari F, Moccetti T, Vassalli G. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2014;**103**:530–541.
232. Hinkel R, Penzkofer D, Zühlke S, Fischer A, Husada W, Xu Q-F, Baloch E, Rooij E van, Zeiher AM, Kupatt C, Dimmeler S. Inhibition of MicroRNA-92a Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury in a Large-Animal Model. *Circulation* 2013;**128**:1066–1075.
233. Daniel J-M, Penzkofer D, Teske R, Dutzmann J, Koch A, Bielenberg W, Bonauer A, Boon RA, Fischer A, Bauersachs J, Rooij E van, Dimmeler S, Sedding DG. Inhibition of miR-92a improves re-endothelialization and prevents neointima formation following vascular injury. *Cardiovasc Res* 2014;**103**:564–572.
234. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2015;**4**:e252.
235. Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet* 2015;**16**:543–552.
236. Lyman GH, Moses HL. Biomarker Tests for Molecularly Targeted Therapies — The Key to Unlocking Precision Medicine. *N Engl J Med* 2016;**375**:4–6.
237. Rooij E, Kauppinen S. Development of micro <scp>RNA</scp> therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med* 2014;**6**:851–864.
238. Bellera N, Barba I, Rodriguez-Sinovas A, Ferret E, Asín MA, Gonzalez-Alujas M, Pérez-Rodon J, Esteves M, Fonseca C, Toran N, Garcia del Blanco B, Pérez A, Garcia-Dorado D. Single Intracoronary Injection of Encapsulated Antagomir-92a Promotes Angiogenesis and Prevents Adverse Infarct Remodeling. *J Am Heart Assoc* 2014;**3**.
239. Lesizza P, Prosdocimo G, Martinelli V, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M. Single-Dose Intracardiac Injection of Pro-Regenerative MicroRNAs Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circ Res* 2017;**120**:1298–1304.
240. Poller W, Dimmeler S, Heymans S, Zeller T, Haas J, Karakas M, Leistner D-M, Jakob P, Nakagawa S, Blankenberg S, Engelhardt S, Thum T, Weber C, Meder B, Hajjar R, Landmesser U. Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *Eur Heart J* 2018;**39**:2704–2716.
241. Gabisonia K, Prosdocimo G, Aquaro GD, Carlucci L, Zentilin L, Secco I, Ali H, Braga L, Gorgodze N, Bernini F, Burchielli S, Collesi C, Zandonà L, Sinagra G, Piacenti M, Zacchigna S, Bussani R, Recchia FA, Giacca M. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. *Nature* 2019;**569**:418–422.
242. Topol EJ, McCarthy J, Gabriel S, Moliterno DJ, Rogers WJ, Newby LK, Freedman M, Metivier J, Cannata R, O'Donnell CJ, Kottke-Marchant K, Murugesan G, Plow EF, Stenina O, Daley GQ. Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin genes may be associated with familial premature myocardial infarction. *Circulation* 2001;**104**:2641–2644.
243. Kotseva K, Backer G De, Bacquer D De, Rydén L, Hoes A, Grobbee D, Maggioni A, Marques-Vidal P, Jennings C, Abreu A, Aguiar C, Badariene J, Bruthans J, Castro Conde A, Cifkova R, Crowley J, Davletov K, Deckers J, Smedt D De, Sutter J De, Dilic M, Dolzhenko M, Dzerve V, Erglis A, Fras Z, Gaita D, Gotcheva

N, Heuschmann P, Hasan-Ali H, Jankowski P, et al. Lifestyle and impact on cardiovascular risk factor control in coronary patients across 27 countries: Results from the European Society of Cardiology ESC-EORP EUROASPIRE V registry. *Eur J Prev Cardiol* 2019;**26**:824–835.

9. PUBLICACIONES, COMUNICACIONES A CONGRESOS Y RECONOCIMIENTOS

9.1 Publicaciones

Los resultados presentados en este trabajo han generado los siguientes artículos:

AUTORES: **Luis M. Rincón,*** Marcelo Sanmartín, Gonzalo L. Alonso, José Antonio Rodríguez, Alfonso Muriel, Eduardo Casas, Miguel Navarro, Alejandra Carbonell, Carla Lázaro, Sara Fernández, Paz González, Macarena Rodríguez, Manuel Jiménez-Mena, Covadonga Fernández-Golfín, Amparo Esteban, María Laura García-Bermejo, and José L. Zamorano.

TÍTULO: A genetic risk score predicts recurrent events after myocardial infarction in young adults

REVISTA: **Rev Esp Cardiol (Engl Ed)**. 2020 Aug;73(8):623-631.

Factor de impacto: **5,17**.

AUTORES: **Luis M. Rincón,*** Macarena Rodríguez-Serrano, Elisa Conde, Val F. Lanza, Marcelo Sanmartín, Paz González-Portilla, Marta Paz-García, José Manuel del Rey, Miriam Menacho, María-Laura García Bermejo,* and José L. Zamorano.

TÍTULO: Serum microRNAs are key predictors of long-term heart failure and cardiovascular death after myocardial infarction.

REVISTA: ESC Heart Failure (*Aceptación pendiente – 2ª revisión*)

Factor de impacto: **4,41**.

AUTORES: **Luis M. Rincón,*** Macarena Rodríguez-Serrano, Elisa Conde, María-Laura García Bermejo,* and José L. Zamorano.

TÍTULO: miRNAs as mediators of post-myocardial infarction cell response and ventricular remodelling

(*En preparación*)

9.2 Comunicaciones a congresos

Los resultados presentados en este trabajo han generado las siguientes comunicaciones a congresos:

AUTORES: **Luis Miguel Rincón**, Carla Lázaro, Alejandra Carbonell, Sara Fernández, Eduardo Casas, Manuel Jiménez-Mena, Marcelo Sanmartín y José Luis Zamorano

TÍTULO: Estratificación del riesgo cardiovascular en arteriopatía coronaria precoz

Tipo de presentación: Póster

Congreso: SEC 2014 - Congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología

Lugar: Santiago de Compostela

Fecha: 30 de octubre – 1 de noviembre de 2014

AUTORES: C. Moreno, E. Casas, **L.M. Rincón**, C. Fernández-Golfín, L. Salido Tahoces, A. Carbonell, A. García, M. Jiménez Mena, R. Hernández Antolín, J.L. Zamorano

TÍTULO: 3D deformation parameters in patients with acute coronary syndrome: utility in the prediction of adverse remodeling.

Tipo de presentación: Póster

Congreso: ESC 2014 – European Society of Cardiology Congress

Lugar: Barcelona

Fecha: 30 de agosto – 3 de septiembre de 2014

AUTORES: A Carbonell, **LM Rincón**, S. Fernandez Santos, C. Lazaro Rivera, C. Moreno Vinues, E. Casas Rojo, M. Sanmartin Fernandez, A. Camino Lopez, M. Jimenez Mena, J.L. Zamorano Gomez TÍTULO: Risk stratification in coronary artery disease in young adults

Tipo de presentación: Póster

Congreso: Acute Cardiovascular Care 2014

Lugar: Ginebra, Suiza

Fecha: 18-20 de octubre de 2014

AUTORES: C. Moreno, E. Casas, **L.M. Rincón**, L. Salido Tahoces, A. Carbonell, A. García, C. Fernández-Golfín, M. Jiménez Mena, R. Hernández Antolín, J.L. Zamorano

TÍTULO: Fracción de Eyección del Ventriculo Izquierdo (FEVI) tras Síndrome Coronario Agudo (SCA): ¿La Ecocardiografía con Speckle Tracking 3D (STE 3D) optimiza y precisa su cálculo y estimación?

Tipo de presentación: Póster

Congreso: SEC 2014 - Congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología

Lugar: Santiago de Compostela

Fecha: 30 de octubre – 1 de noviembre de 2014

AUTORES: **L.M. Rincón**, A. Carbonell, E. Casas, M. Sanmartín, S. Fernández, M. Jiménez-Mena, C. Fernández-Golfín, J.L. Zamorano.

TÍTULO: Diferencias clínicas y epidemiológicas en el síndrome coronario agudo en población joven.

Tipo de presentación: Póster.

Congreso: SEC 2015 - Congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología

Lugar: Bilbao

Fecha: 22 – 24 de octubre de 2015

AUTORES: J.A. Rodríguez, B. Lainez, M.D. García, **L.M. Rincón**, S. Fernández, M. Sanmartín, J.A. Páramo, C. Roncal.

TÍTULO: La elevación de la metaloproteinasa-10 (MMP-10) tras el síndrome coronario agudo con elevación de ST (SCACEST) se asocia con la escala de flujo TIMI

Tipo de presentación: Póster.

Congreso: SEC 2015 - Congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología

Lugar: Bilbao

Fecha: 22 – 24 de octubre de 2015

AUTORES: A. Carbonell, **L.M. Rincón**, E. Casas, M. Sanmartín, S. Fernández, C. Fernández-Golfín, M. Jiménez-Mena, J.L. Zamorano.

TÍTULO: El síndrome coronario agudo es infrecuente en la mujer premenopáusica no diabética ¿Cómo difieren sus características clínicas y epidemiológicas respecto a otras poblaciones?

Tipo de presentación: Póster.

Congreso: SEC 2015 - Congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología

Lugar: Bilbao

Fecha: 22 – 24 de octubre de 2015

AUTORES: A. Carbonell, **L.M. Rincón**, E. Casas, C. Fraile, A. Camino, M. Sanmartín, M. Jiménez-Mena, J.L. Zamorano.

TÍTULO: La enfermedad coronaria en pacientes jóvenes: un escenario diferente.

Tipo de presentación: Póster.

Congreso: SEC 2015 - Congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología

Lugar: Bilbao

Fecha: 22 – 24 de octubre de 2015

AUTORES: E. Casas, A. Carbonell, **LM Rincón**, A. González, S. Fernández, M. Sanmartín, C. Fernández-Golfín, J.L. Zamorano.

TÍTULO: Ecocardiografía 3D speckle-tracking para valorar la función ventricular y tamaño del infarto en pacientes jóvenes tras un síndrome coronario agudo

Tipo de presentación: Póster.

Congreso: SEC 2015 - Congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología

Lugar: Bilbao

Fecha: 22 – 24 de octubre de 2015

AUTORES: Miguel Navarro, **Luis M. Rincón**, Amparo Esteban, José J. Jiménez-Nacher, Covadonga Fernández-Golfín, José L. Zamorano, Javier Blázquez.

TÍTULO: CT angiography coronary findings in young patients with no risk factors after an ischemic event and stent placement. What's beyond the conventional angiography

Tipo de presentación: Póster.

Congreso: CARS 2015—Computer Assisted Radiology and Surgery Proceedings

Lugar: Barcelona

Fecha: 22 – 27 de junio de 2015.

AUTORES: **L.M. Rincón**, A. Carbonell, M. Rodríguez, E. Casas, M. Sanmartín, M. Jiménez-Mena, M.L. García-Bermejo, J.L. Zamorano.

TÍTULO: miRNAs séricos en infarto agudo de miocardio: un nuevo biomarcador aplicado en una cohorte de pacientes jóvenes.

Tipo de presentación: Presentación oral.

Congreso: SEC 2016 - Congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología

Lugar: Zaragoza.

Fecha: 27 – 29 de octubre de 2016

AUTORES: G Alonso, M. Sanmartín, **LM Rincón**, A. Marco, M. Pascual, C. Lozano, A. Pardo, JM Monteagudo, P. Pastor, R. Martín, L. Salvador, A. Recio, M. Jiménez-Mena, JL. Zamorano.

TÍTULO: Frailty is an in-hospital acute coronary syndrome prognostic marker in elderly population.

Tipo de presentación: Póster

Congreso: ESC 2016 – European Society of Cardiology Congress

Lugar: Roma, Italia.

Fecha: 27 – 31 de agosto de 2016

AUTORES: G Alonso, A. Marco, M. Sanmartín, **LM. Rincón**, M. Pascual, M. Valverde, D. del Val, P. Pastor, D. Rodríguez, A. Recio, L. Salvador, D. Marzal, A. Camino, M. Jiménez-Mena, JL. Zamorano.

TÍTULO: Frailty predicts major bleeding within 30 days in elderly patients with acute coronary syndrome.

Tipo de presentación: Póster

Congreso: ESC 2016 – European Society of Cardiology Congress

Lugar: Roma, Italia.

Fecha: 27 – 31 de agosto de 2016

AUTORES: G. Alonso, P. Pastor, M. Pascual, A. Pardo, M. Sanmartín, A. Marco, JM. Monteagudo, D. del Val, C. Lozano, M. Valverde, **LM. Rincón**, A. Camino, M. Jiménez-Mena, JL. Zamorano.

TÍTULO: Is grace index a good predictor of mortality in old population with acute coronary syndrome?:

Tipo de presentación: Póster

Congreso: Acute Cardiovascular Care 2016

Lugar: Lisboa, Portugal.

Fecha: 15 – 17 de octubre de 2016.

AUTORES: G Alonso, M. Pascual, M. Sanmartín, **LM. Rincón**, S. del Prado, A. Camino, M. Jiménez-Mena, JL. Zamorano.

TÍTULO: La fragilidad es un marcador pronóstico independiente en pacientes mayores de 75 años ingresada por infarto agudo de miocardio

Tipo de presentación: Póster

Congreso: SEC 2017 - Congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología

Lugar: Madrid

Fecha: 26 – 28 de octubre de 2017

AUTORES: GL. Alonso, M. Pascual, M. Sanmartín, R. Martín, **LM Rincón**, M. Jiménez-Mena, A. Camino, JL. Zamorano.

TÍTULO: Repercusión pronóstica del tratamiento invasivo en pacientes frágiles mayores de 75 años ingresados por infarto agudo de miocardio.

Tipo de presentación: Póster

Congreso: SEC 2017 - Congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología

Lugar: Madrid

Fecha: 26 – 28 de octubre de 2017

AUTORES: GL Alonso, M Sanmartin, M Pacual, **LM. Rincón**, A Marco, A Recio-Mayoral, R Martin-Asenjo, A Camino, M Jimenez-Mena, J L Zamorano

TÍTULO: Role of Frailty on acute coronary syndromes in the elderly

Tipo de presentación: Póster

Congreso: ESC 2018 – European Society of Cardiology Congress

Lugar: Munich, Alemania.

Fecha: 25 – 29 de agosto de 2018

European Heart Journal, Volume 39, Issue suppl_1, August 2018, ehy566.P6286,
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy566.P6286>

AUTORES: **L.M. Rincón**, M. Sanmartín, GL. Alonso, JA. Rodríguez, A. Muriel, E. Casas, M. Navarro, A. Carbonell, C. Lázaro, S. Fernández, M. Jiménez-Mena, C. Fernández-Golfín, ML. García-Bermejo, JL. Zamorano.

TÍTULO: A genetic risk score predicts recurrent events after myocardial infarction in young adults

Tipo de presentación: Póster

Congreso: ESC 2019 – European Society of Cardiology Congress.

Lugar: París, Francia.

Fecha: 31 de agosto - 1 de septiembre de 2019

European Heart Journal, Volume 40, Issue Supplement_1, October 2019, ehz748.0311.

<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz748.0311>

AUTORES: M. Linares, M. Menacho, **L.M. Rincón**, A. Rodríguez, J.M. del Rey

TÍTULO: Estudio del efecto de la lesión renal aguda en la concentración de BNP y NT-proBNP en plasma de pacientes infartados

Tipo de presentación: Póster

Congreso: XIV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico

Lugar: Virtual

Fecha: 8 – 14 de noviembre de 2020

AUTORES: L Alcázar, M. Menacho, **L.M. Rincón**, A Ravelo, A Rodríguez, JM. del Rey

TÍTULO: Estudio de correlación y concordancia en la determinación de los péptidos BNP y NT-proBNP.

Tipo de presentación: Póster

Congreso: XIV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico

Lugar: Virtual

Fecha: 8 – 14 de noviembre de 2020

AUTORES: M. Menacho, L. Alcázar, **L.M. Rincón**, M. Linares, J.M. del Rey, I. Arribas

TÍTULO: Comparación de péptidos natriuréticos en la fase aguda del infarto agudo de miocardio.

Tipo de presentación: Póster

Congreso: XIV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico

Lugar: Virtual

Fecha: 8 – 14 de noviembre de 2020

AUTORES: L. Alcázar, M. Menacho, **L.M. Rincón**, J.P. Venero, D. Mora, J.M. del Rey.

TÍTULO: Análisis descriptivo del estudio del BNP y NT-proBNP en función de sexo y edad.

Tipo de presentación: Póster

Congreso: XIV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico

Lugar: Virtual

Fecha: 8 – 14 de noviembre de 2020

AUTORES: **LM. Rincón**, EM. Rodríguez-Serrano, P. González-Portilla, E. Conde, M. Sanmartín, M. Jiménez-Mena, ML. García-Bermejo, JL. Zamorano

TÍTULO: Identificación de miRNAs como predictores independientes de mortalidad cardiovascular e insuficiencia cardiaca tras infarto agudo de miocardio.

Tipo de presentación: Presentación oral

Congreso: SEC 2020 - Congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología

Lugar: Virtual

Fecha: 28 – 31 de octubre de 2020

AUTORES: **L.M Rincón**, E.M Rodriguez-Serrano, P Gonzalez-Portilla, E Conde, M Sanmartin, M Jimenez-Mena, M.L Garcia-Bermejo, J.L Zamorano

TÍTULO: Predicting adverse ventricular remodelling and poor outcome after acute myocardial infarction by a distinctive miRNA signature

Tipo de presentación: Presentación oral -

Congreso: ESC 2020 – European Society of Cardiology Congress

Lugar: Amsterdam, Holanda / Virtual

Fecha: 29 de agosto – 1 de septiembre de 2020.

European Heart Journal, Volume 41, Issue Supplement_2, November 2020,
<https://doi.org/10.1093/ehjci/ehaa946.1670>

9.3 Premios y reconocimientos

Los resultados presentados en este trabajo han sido merecedores de los siguientes reconocimientos:

- Young Investigator Award (YIA) in Coronary Pathophysiology and Microcirculation. European Society of Cardiology. ESC Congress 2020. Receptor: **Luis M. Rincón**.
- Primer premio - Mejor trabajo presentado en el Congreso 2020 de la Sociedad Española de Cardiología. Receptor: **Luis M. Rincón**.
- Entrevista Sociedad Española de Cardiología 2016. Noticias destacadas: investigación en miRNAs en pacientes jóvenes con IAM. **Luis M. Rincón**.
<https://secardiologia.es/comunicacion/notas-de-prensa/notas-de-prensa-sec/8065-mirnas-sericos-en-jovenes-con-iam-biomarcadores-y-dianas-terapeuticas>.
- Comentario editorial al artículo publicado por **Luis M. Rincón** et al. en Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2020 Aug;73(8):623-631: Polygenic risk score as a key factor in cardiovascular clinical prediction models. Brion M, González-Juanatey JR, Carracedo Á. Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2020 Aug;73(8):608-610.
doi: 10.1016/j.rec.2020.01.003.

10.ANEXO

ANEXO 1: Publicación Rev Esp Cardiol (Engl Ed)

Original article

A genetic risk score predicts recurrent events after myocardial infarction in young adults



Luis M. Rincón,^{a,b,*} Marcelo Sanmartín,^{a,b} Gonzalo L. Alonso,^{a,b} José Antonio Rodríguez,^{b,c} Alfonso Muriel,^d Eduardo Casas,^a Miguel Navarro,^e Alejandra Carbonell,^{a,f} Carla Lázaro,^{a,g} Sara Fernández,^a Paz González,^{a,b} Macarena Rodríguez,^h Manuel Jiménez-Mena,^{a,i} Covadonga Fernández-Golfín,^{a,b} Amparo Esteban,^{e,i} María Laura García-Bermejo,^h and José L. Zamorano^{a,b,j}

^a Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Universidad de Alcalá, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Madrid, Spain

^c Laboratorio de Aterotrombosis, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA)-Universidad de Navarra, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdISNA), Pamplona, Navarra, Spain

^d Unidad de Bioestadística Clínica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

^e Servicio de Radiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

^f Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

^g Hospital de Torrejón, Madrid, Spain

^h Unidad Central de Apoyo en Biomarcadores y Dianas Terapéuticas, EATRIS Biomarkers Platform, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

ⁱ Hospital La Moraleja, Madrid, Spain

^j Hospital La Zarzuela, Madrid, Spain

Article history:

Received 28 March 2019

Accepted 5 August 2019

Available online 17 October 2019

Keywords:

Myocardial infarction

Genetic risk score

Recurrent events

Coronary disease

Cardiac computed tomography

ABSTRACT

Introduction and objectives: To evaluate whether a genetic risk score (GRS) improves prediction of recurrent events in young nondiabetic patients presenting with an acute myocardial infarction (AMI) and identifies a more aggressive form of atherosclerosis.

Methods: We conducted a prospective study with consecutive nondiabetic patients aged < 55 years presenting with AMI. We performed a genetic test, cardiac computed tomography, and analyzed several biomarkers. We studied the association of a GRS composed of 11 genetic variants and a primary composite endpoint (cardiovascular mortality, a recurrent event, and cardiac hospitalization).

Results: A total of 81 patients were studied and followed up for a median of 4.1 years. There were 24 recurrent cardiovascular events. Compared with the general population, study participants had a higher prevalence of 9 out of 11 risk alleles. The GRS was significantly associated with recurrent cardiovascular events, especially when baseline low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were elevated. Compared with the low-risk GRS tertile, the multivariate-adjusted HR for recurrences was 10.2 (95%CI, 1.1-100.3; $P = .04$) for the intermediate-risk group and was 20.7 (2.4-181.0; $P = .006$) for the high-risk group when LDL-C was ≥ 2.8 mmol/L (≥ 110 mg/dL). Inclusion of the GRS improved the C-statistic (ΔC -statistic = 0.086), cNRI (continuous net reclassification improvement) (30%), and the IDI (integrated discrimination improvement) index (0.05). Cardiac computed tomography frequently detected coronary calcified atherosclerosis but had limited value for prediction of recurrences. No association was observed between metalloproteinases, GRS and recurrences.

Conclusions: A multilocus GRS may identify individuals at increased risk of long-term recurrences among young nondiabetic patients with AMI and improve clinical risk stratification models, particularly among patients with high baseline LDL-C levels.

© 2019 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Una puntuación de riesgo genético predice recurrencias en pacientes jóvenes con infarto agudo de miocardio

RESUMEN

Introducción y objetivos: Evaluar si una puntuación de riesgo genético (GRS) mejora la predicción de eventos recurrentes en pacientes jóvenes con infarto agudo de miocardio (IAM) e identifica una forma de aterosclerosis más agresiva.

Palabras clave:

Infarto agudo de miocardio

Puntuación de riesgo genético

Eventos recurrentes

SEE RELATED CONTENT:

<https://doi.org/10.1016/j.rec.2020.01.003>

* Corresponding author: Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ctra. Colmenar km 9, 28034 Madrid, Spain.

E-mail address: lmrincon@secardiologia.es (L.M. Rincón).

<https://doi.org/10.1016/j.rec.2019.08.006>

1885-5857/© 2019 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Enfermedad coronaria
Tomografía computarizada cardiaca

Métodos: Se diseñó un estudio prospectivo con pacientes < 55 años, no diabéticos, ingresados por IAM. Se realizó un test genético, una tomografía computarizada cardiaca y determinación de varios biomarcadores. Se analizó la asociación de un GRS compuesto por 11 variantes genéticas con la aparición de un objetivo primario combinado (muerte cardiovascular, evento recurrente u hospitalización cardiovascular).

Resultados: Se siguió a 81 pacientes durante una mediana de 4,1 años, y se documentaron 24 eventos. La prevalencia de variantes de riesgo fue superior en 9 de los 11 alelos frente a población general. El GRS se asoció con recurrencias, particularmente cuando los niveles basales de colesterol-LDL estaban elevados. En el modelo multivariado, teniendo como referencia el tercil de bajo riesgo genético, el HR para el grupo de riesgo intermedio fue de 10,2 (IC95% 1,1–100,3; $p = 0,04$) y de alto riesgo 20,7 (2,4–181,0; $p = 0,006$) si el colesterol-LDL era $\geq 2,8\text{mmol/L}$ ($\geq 110\text{ mg/dL}$). La incorporación del GRS al modelo multivariado mejoró el estadístico C ($\Delta\text{C-statistic} = 0,086$), el cNRI (30%) y el IDI (0,05). El TC cardiaco detectó aterosclerosis calcificada frecuentemente, pero tuvo un valor pronóstico limitado. No se detectó una asociación entre metaloproteinasas, GRS y recurrencias.

Conclusiones: En una población de pacientes jóvenes no diabéticos con IAM, una puntuación de riesgo genético puede predecir recurrencias y mejorar los modelos clínicos de estratificación pronóstica, especialmente en aquellos pacientes con colesterol-LDL basal elevado.

© 2019 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Abbreviations

AMI: acute myocardial infarction
CAD: coronary artery disease
CT: computed tomography
GRS: genetic risk score
GWAS: genome-wide association studies
SNPs: single-nucleotide polymorphisms

INTRODUCTION

Coronary artery disease (CAD) remains the first cause of mortality worldwide.¹ CAD has a complex etiology involving environmental risk factors and genetic susceptibility. Genetic predisposition has been stated to account for 40% to 50% of variability in the development of CAD.² Young patients (< 55 years) with an acute myocardial infarction (AMI) usually lack most of the clinical risk factors and almost invariably have low cardiovascular risk based on clinical estimators until the moment of the event. Genome-wide association studies (GWAS) have consistently identified more than 57 loci in the general population that predispose to CAD/AMI either through cardiovascular risk factors or independently.³ The importance of genetically derived etiopathogenic mechanisms of CAD is enhanced among patients with early clinical events. Nevertheless, clinical guidelines do not currently recommend the use of genetic testing to assess cardiovascular risk in primary or secondary prevention.^{4,5}

CAD is not uncommon in the young population, and patients < 45 years represent approximately 10% of AMI admissions,⁶ with a significantly high lifelong chance of recurrent cardiovascular events despite therapy.^{7,8}

Classical cardiovascular risk factors are of great importance as therapeutic targets after an AMI and have also been used to design risk prediction scores for further coronary events (ie, Global Registry of Acute Coronary Events [GRACE]). However, their predictive ability is limited and they do not account for genetically derived risk.⁹

The association of genetic scores with incident CAD has been prospectively studied in the general population, with overall positive results. Advances in genetic testing have made these studies affordable, although cost-effectiveness remains an issue.^{10,11}

Currently, there is an unmet need to identify patients with established cardiovascular disease who are at higher risk of recurrent cardiovascular events and who could benefit from more aggressive secondary prevention. Young patients with cardiovascular disease emerge as one of the main focuses of attention, since

they have an unfavourable long-term prognosis with a high probability of further recurrences.¹² In this context, genetic risk scores (GRS) composed of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) might be clinically useful to assess lifelong residual risk.

We sought to determine whether an SNP-based GRS could predict long-term recurrent cardiovascular events after an AMI in a cohort of young nondiabetic patients with a high likelihood of genetic susceptibility and could therefore improve risk stratification. We also aimed to determine whether a poor GRS was associated with a more aggressive form of CAD through a comprehensive study of plaque morphology and coronary calcium by computed tomography (CT), invasive angiography, and biochemical extracellular matrix metabolism parameters.

METHODS

Study design

We conducted a prospective study with consecutive inclusion of nondiabetic patients aged < 55 years hospitalized for type 1 AMI in a tertiary hospital. Inclusion criteria were: a) age between 18 and 55 years; b) type 1 AMI presenting as non-ST-segment elevation or ST-segment elevation acute coronary syndrome (ACS) and, c) invasive coronary angiography performed. Exclusion criteria were: a) age >55 years, and b) a clinical history of diabetes or fulfilment of established diagnostic criteria according to the European Society of Cardiology/European Association for the Study of Diabetes guidelines. We obtained comprehensive clinical, demographic, echocardiographic, and invasive angiographic data. Blood samples for genetic testing and metalloproteinase analysis were extracted at admission and were stored at the local biobank. A cardiac CT for calcium score analysis and noninvasive coronary angiography was performed at baseline unless contraindicated. The study protocol was approved by the ethics committee (reference 175/13) and complied with the Declaration of Helsinki. All participants provided written informed consent.

Outcome

The primary outcome, defined as a recurrent cardiovascular event, was a composite of cardiovascular mortality, recurrent ACS, and cardiac hospitalization. Recurrent ACS included both AMI and unstable angina. Ambulatory staged procedures for revascularization of nonculprit lesions were not considered as recurrences. All outcomes were reviewed by 2 cardiologists. Follow-up was performed on site every 6 months. Covariate definitions were standardized for analysis.

Genotyping

DNA extraction was performed using standard techniques. Genotyping was conducted at the Gen inCode Laboratory (Barcelona, Spain), using designed Affymetrix Axiom arrays.³ The genome-wide arrays gave high-quality genotypes, with high genotype call rates (100%) and SNP reproducibility (100%). Genotype imputation was done on a per-array basis using IMPUTE2 v2.2.2 and using 1000 genomes as the reference panel. Genetic variants (table 1) were determined using a commercial platform named Cardio inCode Score (Gen inCode, Spain), which includes 11 genetic variants associated with CAD but not with classic risk factors in accordance with the data available at genome-wide association studies catalogue reviewed in August 2010 and which were described in GWAS (rs10455872 in *LPA*, rs12526453 in *PHACTR1*, rs1333049 in *CDKN2A/B*, rs17465637 in *MIA3*, rs501120 in *CXCL12*, rs6725887 in *WDR12*, rs9818870 in *MRAS* and rs9982601 in *SLC5A3/KCNE2*) including also a haplotype in *ALOX5AP* gene (Hap B, composed by: rs10507391-A, rs9315050-A and rs17222842-G), which has been reported to be associated with CAD in different populations.^{13–15} This haplotype was not found in GWAS because individual genetic variants are usually analyzed without taking haplotypes into consideration. The array yielded high genotype call rates (100%). The exact test was used to compute Hardy-Weinberg equilibrium in each individual variant considering a P value $< \frac{0.05}{11}$ for statistical significance in multiple testing.¹⁶

A GRS was computed using the following formula $GRS = \sum_{i=1}^n SNP_i$ where the sum of the number of risk alleles described in table 1 (with values 0, 1, or 2) across the genetic variants (n) was included. Patients were divided into tertiles based on their GRS for analysis.

Cardiac computed tomography

A cardiac CT scan was performed after myocardial revascularization and before hospital discharge in all participants unless contraindicated. Coronary artery calcium (CAC) score as well as noninvasive coronary angiography were performed using a 128-slice multidetector CT. The scans were read independently by 2 investigators. The methodology for CAC acquisition and interpretation of the CT scans was performed according to a validated standardized protocol.¹⁷ The amount of calcium was quantified with the Agatston scoring method, excluding stents from the analysis.

Extracellular matrix metabolism biomarkers

Venous blood samples were collected during the first 24 hours after admission. Within 30 minutes after extraction, centrifugation was performed at 100 g for 15 minutes. Serum was removed and stored at -80°C at the local biobank. Metalloproteinase (MMP) 1, 2, 7, 9 and 10, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP-1) assays were performed at the Atherosclerosis Research Laboratory, CIMA-University of Navarre (Pamplona, Spain). MMP 1, 2, 7, 9 and 10 were analyzed in serum with a bead-based multiplex assay using the Luminex technology, from Merck (MILLIPLEX MAP, Darmstadt, Germany). TIMP-1 levels were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, United States). Interassay and intra-assay coefficients of variation were $< 6\%$.

Statistical analysis

For statistical analysis, the GRS was divided into 3 tertiles and Kaplan-Meier survival curves were plotted for the primary outcome. The low-risk GRS was used as the reference group. Several Cox regression models were constructed: a) a univariate model with all the variables of interest collected; b) a multivariate clinical model where the already established GRACE risk score and variables that were statistically associated with the composite endpoint in the univariate analysis were tested; the backward elimination method was used for selection of covariables, and c) the previous multivariate model with the addition of GRS tertiles. Interaction was studied. The percent risk for the GRACE risk score was calculated using the nomogram for the 3-year outcomes of death or AMI. Goodness of fit was evaluated using the likelihood ratio test and the C-statistic. Multivariate models with and without GRS were compared by the integrated discrimination improvement index (IDI) method, which compares the average difference in correctly predicting the risk for patients who have a recurrent cardiovascular event with those who do not, and the continuous net reclassification improvement (cNRI), detailed in [methods of the supplementary data](#).¹⁸ Missing values ($< 3\%$) were sampled using a multiple imputation technique based on the Markov method. This was a hypothesis-generating and exploratory study; therefore, no formal sample size calculation was performed in advance. The statistical analyses were performed using SPSS software version 22.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, United States) and R version 3.3.2.

Table 1
Genetic variants analyzed

| Band | rsID | Gene loci | Chromosome | RA/NRA (RAF) | H-W P |
|----------|------------|----------------------------|------------|--------------|----------|
| 1q41 | rs17465637 | <i>MIA3</i> | 1 | C/A (0.69) | .925 |
| 2q33.2 | rs6725887 | <i>WDR12</i> | 2 | C/T (0.18) | 1.000 |
| 3q22.3 | rs9818870 | <i>MRAS</i> | 3 | T/C (0.13) | – |
| 6q25.3 | rs10455872 | <i>SLC22A3-LPAL2-LPA</i> | 6 | G/A (0.11) | .072 |
| 6p24.1 | rs12526453 | <i>PHACTR1</i> | 6 | C/G (0.66) | .674 |
| 9p21.3 | rs1333049 | <i>CDKN2B-AS1</i> | 9 | C/G (0.39) | .512 |
| 10q11.21 | rs501120 | <i>CXCL12</i> | 10 | T/C (0.84) | .037 |
| 21q22.11 | rs9982601 | <i>KCNE2-SCL5A3</i> | 21 | T/C (0.13) | – |
| 13q12.3 | rs10507391 | <i>ALOX5AP</i> (haplotype) | 13 | A/T (0.36) | .589 |
| | rs17222842 | <i>ALOX5AP</i> (haplotype) | 13 | G/A (0.92) | .822 |
| | rs9315050 | <i>ALOX5AP</i> (haplotype) | 13 | G/A (0.07) | .616 |

H-W, Hardy-Weinberg equilibrium; NRA, nonrisk allele; RA, risk allele; RAF, risk allele frequency.
 $P < .0045$ for statistical significance.

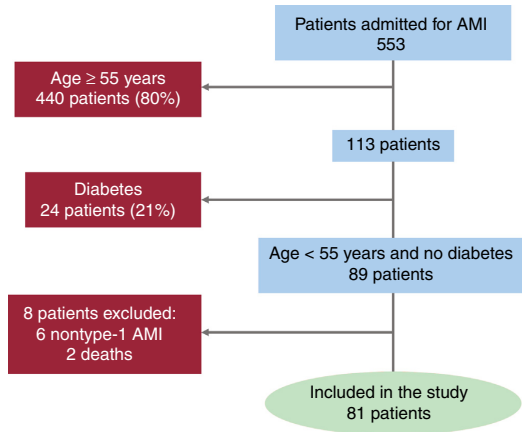


Figure 1. Patient selection. Flowchart showing the successive steps taken during the study. AMI, acute myocardial infarction.

RESULTS

Patient profile

From August 2013 through December 2014, a total of 81 patients (89% male) aged 48 ± 6 years were enrolled into the study after screening (figure 1). Cardiovascular risk factors and clinical features are shown in table 2 and table 1 of the supplementary data. The most common risk factor was smoking (65%) followed by hypertension and dyslipidemia in 38% and 33%, respectively. One in every 4 patients was in the obesity range, and 29% reported a family history of premature CAD (AMI in first-degree male relatives aged < 55 years or female relatives aged < 65 years). All patients were of European ancestry and none of them had familial hypercholesterolemia according to the Dutch Lipid Clinic Network criteria (table 2 of the supplementary data).

ST-segment elevation AMI was the most frequent presentation accounting for 72% of cases. The median [IQR] hospitalization time was 2.5 [2-4] days. A total of 32% had severe nonculprit stenosis determined by invasive angiography, and 4% had 3-vessel disease. Discharge treatment met current guideline recommendations.

After a median [IQR] follow-up of 4.1 [3.5-4.4] years, there were 24 occurrences (30%) of the primary composite endpoint. Morbidity and mortality was almost exclusively cardiac. Three-year follow-up was completed in all participants, and among patients with recurrent cardiovascular events, the mean time to the primary endpoint was 1.1 ± 0.8 years.

In the univariate analysis, a previous history of CAD (hazard ratio [HR], 3.4, 95% confidence interval [95%CI], 1.2-9.9; $P = .02$), dyslipidemia (HR, 5.0; 95%CI, 1.8-14.2; $P = .001$) and previous cocaine abuse (HR, 5.1, 95%CI, 1.7-15.1; $P = .001$) were significantly associated with the composite endpoint. Clinical features at admission that were associated with recurrent cardiovascular events were Killip class (HR, 2.3 per point increase; 95%CI, 1.4-3.7; $P < .001$), suboptimal revascularization defined as final TIMI (Thrombolysis in Myocardial Infarction) flow < 3 (HR, 8.9; 95%CI, 2.9-26.9; $P = .01$), a low hemoglobin count (HR, 1.4 per point decrease; 95%CI, 1.2-1.7; $P < .001$), and need of diuretic drugs during the index event (HR, 4.2; 95%CI, 1.5-11.3; $P < .002$).

A multivariate clinical model was constructed, testing all significant variables in the univariate analysis. Only GRACE risk score and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels remained in the final model, which showed an area under the

curve of 0.78 for the prediction of the primary endpoint at 3 years in the ROC (receiver operating characteristic) curve.

Genetics

The prevalence of each SNP that composed the GRS was evaluated in our population in comparison with a cohort of more than 15 400 exome sequences from unrelated individuals of European non-Finnish origin included in the Genome Aggregation Database (gnomAD). Our population had a consistently higher prevalence in 9 out of the 11 risk alleles analyzed (figure 1 of the supplementary data).

When the 8 SNPs and the 3 haplotype variants were individually examined, none of them were found to have statistical association with recurrent cardiovascular events after application of the Bonferroni correction for multiple hypotheses (table 3 of the supplementary data).

The mean GRS in our population was 7.2 ± 1.7 . When divided into tertiles based on GRS, the characteristics of the index event were not significantly different (table 2). As expected by design (ie, selection of SNP components in the Cardio inCode platform), GRS was not associated with the classic risk factors or a family history of premature CAD. The validated GRACE risk prediction score determined at inclusion did not differ depending on the genetic risk tertile.

We found a significant association between the GRS and recurrent cardiovascular events in the multivariate Cox model (which included GRACE and LDL-C) (table 3, results of the supplementary data and table 4 of the supplementary data). Kaplan-Meier curves showed a clear pattern toward higher recurrent cardiovascular events for intermediate and high-risk GRS patients (figure 2). LDL-C levels determined at baseline showed a strong interaction effect among patients with high-risk GRS and consequently, in this group, elevated levels of LDL-C increased their HR of recurrent cardiovascular events (figure 2 of the supplementary data). Among patients with baseline LDL-C ≥ 110 mg/dL (≥ 2.8 mmol/L), the multivariable-adjusted HR for recurrent cardiovascular events was 10.2 (95%CI, 1.1-100.3; $P = .04$) for the intermediate genetic risk category and was 20.7 (2.4-181.0; $P = .006$) for the high-risk GRS compared with the low-risk GRS category. In contrast, the genetic risk category did not contribute to the prediction of recurrences when LDL-C was < 110 mg/dL (2.8 mmol/L). There were no significant differences in absolute or relative LDL-C reduction at 6 months based on GRS tertile (table 5 of the supplementary data).

The addition of the GRS to the final multivariate clinical Cox model (which included GRACE risk score and LDL-C) showed an improvement in the area under the curve (0.83 vs 0.78) (figure 3A). The C-statistic for the clinical multivariate Cox model was 0.710, while the addition of the GRS increased it to 0.796 (Δ -statistic = 0.086; 95%CI, 0.006-0.187). The cNRI was 30% at 3 years (95%CI, 0-52%, $P = .05$) while the IDI showed a substantial incremental predictive ability (0.05) when the GRS was added to the clinical multivariate model (figure 3B and table 4).

Cardiac computed tomography

Cardiac CT was performed in 50 patients (62%). The CAC score was high (117 ± 27), with only 30% of patients free of additional coronary calcification. More than two thirds showed a CAC percentile above 75, and 42% above 90. Extensive calcification (CAC score > 400) was observed in 14% of patients. Cardiac CT quality was considered optimal in most patients and only 9% were deemed nondiagnostic. Lesions that originated stenosis $\geq 25\%$ were analyzed, resulting in a mean of 5.5 lesions per patient (median 4). Regarding plaque characteristics, only 29% of these lesions were considered "soft" or

Table 2
Baseline patient characteristics according to their genetic risk score tercile (n=81)

| | Total cohort | Low-risk GRS tercile | Intermedium-risk GRS tercile | High-risk GRS tercile | P |
|---------------------------------------|--------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|-----|
| <i>Index event</i> | | | | | |
| GRS | 7.2 ± 1.7 | 5.5 ± 0.8 | 7.4 ± 0.6 | 9.5 ± 0.7 | |
| Age, y | 48 ± 6 | 49 ± 6 | 47 ± 7 | 48 ± 6 | .50 |
| Male sex | 71 (89) | 27 (90) | 28 (90) | 16 (84) | .77 |
| BMI, kg/m ² | 28.6 ± 5.3 | 30.4 ± 6.7 | 28.0 ± 4.1 | 26.8 ± 3.4 | .15 |
| Previous CAD | 6 (7) | 2 (7) | 3 (10) | 1 (5) | .82 |
| Hypertension | 30 (38) | 14 (47) | 10 (32) | 6 (32) | .42 |
| Dyslipidemia | 27 (33) | 14 (47) | 5 (16) | 8 (42) | .03 |
| Current smoking | 53 (65) | 18 (60) | 22 (71) | 13 (68) | .64 |
| Family history of premature CAD | 23 (29) | 10 (33) | 11 (36) | 2 (11) | .15 |
| <i>AMI index event</i> | | | | | |
| ST-segment elevation AMI | 57 (71) | 22 (73) | 21 (68) | 14 (74) | .85 |
| Heart rate, bpm | 78 ± 19 | 77 ± 19 | 81 ± 19 | 76 ± 18 | .68 |
| Successful revascularization (TIMI 3) | 76 (95) | 29 (97) | 28 (90) | 19 (100) | .27 |
| Killip class ≥ II | 11 (14) | 2 (7) | 5 (16) | 4 (21) | .32 |
| GRACE risk score | 117 ± 27 | 115 ± 23 | 118 ± 30 | 119 ± 24 | .83 |
| <i>Laboratory parameters</i> | | | | | |
| Hemoglobin, g/L | 15.1 ± 1.6 | 15.2 ± 1.8 | 15.0 ± 1.4 | 14.9 ± 1.5 | .78 |
| GFR, mL/min/1.73 m ² | 97 ± 24 | 94 ± 25 | 98 ± 25 | 103 ± 20 | .40 |
| Maximum troponin I, ng/mL | 48 ± 68 | 46 ± 83 | 51 ± 58 | 45 ± 61 | .95 |
| Total cholesterol, mg/dL | 188 ± 45 | 194 ± 45 | 178 ± 45 | 197 ± 44 | .27 |
| LDL-C, mg/dL | 119 ± 41 | 126 ± 40 | 116 ± 44 | 113 ± 34 | .45 |
| HDL-C, mg/dL | 38 ± 11 | 39 ± 10 | 37 ± 9 | 38 ± 12 | .79 |
| Triglycerides, mg/dL | 145 ± 96 | 144 ± 78 | 134 ± 67 | 173 ± 155 | .45 |
| MMP-1 | 97 ± 12 | 94 ± 12 | 99 ± 12 | 99 ± 11 | .22 |
| MMP-2 | 12 ± 8 | 12 ± 8 | 11 ± 9 | 14 ± 9 | .43 |
| MMP-7 | 27 ± 3 | 28 ± 3 | 27 ± 3 | 27 ± 2 | .69 |
| MMP-9 | 184 ± 77 | 181 ± 69 | 183 ± 84 | 191 ± 81 | .91 |
| MMP-10 | 552 ± 431 | 594 ± 590 | 568 ± 358 | 450 ± 158 | .55 |
| TIMP-1 | 190 ± 120 | 183 ± 108 | 197 ± 131 | 187 ± 123 | .90 |
| <i>Cardiac CT (n=50)</i> | | | | | |
| CAC score | 117 ± 27 | 162 ± 232 | 417 ± 881 | 178 ± 276 | .40 |
| CAC percentile above 90 ¹⁷ | 40 | 40 | 38 | 42 | .97 |
| Number of coronary plaques | 5.5 ± 4.9 | 4.7 ± 4.6 | 6.6 ± 5.5 | 5.3 ± 4.6 | .55 |
| Multivessel disease | 71 | 71 | 69 | 75 | .93 |
| <i>Echocardiographic findings</i> | | | | | |
| LVEF at discharge, % | 57 ± 11 | 58 ± 11 | 55 ± 10 | 58 ± 11 | .59 |
| Longitudinal strain, % | 13.0 ± 3.4 | 11.2 ± 3.5 | 14.1 ± 2.7 | 14.2 ± 3.8 | .06 |
| Radial strain, % | 27.7 ± 9.6 | 26.1 ± 7.1 | 28.4 ± 10.3 | 25.9 ± 11.1 | .77 |
| Circumferential strain, % | 26.7 ± 6.1 | 26.2 ± 6.5 | 26.3 ± 6.0 | 29.4 ± 6.4 | .58 |
| <i>Medications at discharge</i> | | | | | |
| β-blocker | 69 (86) | 28 (93) | 27 (87) | 14 (74) | .14 |
| ACEI inhibitor or ARB | 60 (75) | 22 (73) | 26 (84) | 12 (63) | .25 |
| Diuretic | 8 (10) | 2 (7) | 3 (10) | 3 (16) | .58 |
| High intensity statin therapy | 76 (95) | 28 (93) | 31 (100) | 17 (90) | .22 |

ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; AMI, acute myocardial infarction; ARB, angiotensin-II receptor blocker; BMI, body mass index; CAC, coronary artery calcium; CAD, coronary artery disease; CT, computed tomography; GFR, glomerular filtration rate; GRS, genetic risk score; HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; LVEF, left ventricular ejection fraction; MMP, metalloproteinase; TIMI, Thrombolysis in Myocardial Infarction; TIMP-1, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1.

Values are expressed as mean ± standard deviation for continuous variables and No. (%) for categorical variables.

Table 3
Cox regression analysis between GRS tertiles and recurrent risk of events

| GRS | Univariate analysis | | Multivariate analysis ^a | |
|------------------|---------------------|-----|------------------------------------|------------------|
| | HR (95%CI) | P | HR (95%CI) | P ^b |
| Low GRS | 1 | | 1 | |
| Intermediate GRS | 2.0 (0.7-5.8) | .21 | LDL-C ≤ 110 mg/dL (≤ 2.8 mmol/L) | 1.0 (0.3-4.0) |
| | | | >110 mg/dL (≥ 2.8 mmol/L) | 10.2 (1.1-100.3) |
| High GRS | 3.0 (1.0-9.2) | .05 | LDL-C ≤ 110 mg/dL (≤ 2.8 mmol/L) | 0.3 (0.1-1.9) |
| | | | > 110 mg/dL (≥ 2.8 mmol/L) | 20.7 (2.4-181.0) |

95%CI, 95% confidence interval; GRACE, Global Registry of Acute Coronary Events; GRS, genetic risk score; HR, hazard ratio; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol. ^a In the multivariate model with GRS, the other covariates included were GRACE risk score, LDL-C and interaction between GRS tertiles and LDL-C. There was a strong interaction between GRS tertiles and LDL-C levels ($P < .01$).

Table 4
Evaluation of the incremental value of GRS to the multivariate model

| | Estimate | 95%CI | P |
|---|----------|-----------|------|
| C-statistic multivariate Cox model | 0.710 | 0.62-0.79 | - |
| C-statistic multivariate Cox model with GRS | 0.796 | 0.70-0.89 | - |
| ΔC-statistic | 0.086 | 0.01-0.19 | .04 |
| cNRI, % | 30 | 0-52 | .05 |
| IDI index | 0.05 | 0.00-0.16 | .049 |

95%CI, 95% confidence interval; cNRI, continuous net reclassification index; IDI, integrated discrimination improvement; GRS, genetic risk score.

The Table shows the c-statistic and the IDI index and the cNRI for comparing the 2 multivariate Cox regression models with vs without the GRS with censored survival data.

fibrous, whereas lesions with calcification constituted the majority, including mixed (26%) and purely calcified or “hard” plaques (45%). We found no association between the GRS profile and CAC score, the number of coronary stenosis assessed by CT, or multivessel disease by invasive coronary angiography.

There was an interesting trend between multivessel disease as assessed by CT and recurrent cardiovascular events (HR, 2.1; 95%CI, 0.9-4.8; $P = .07$), which was not detected with CAC score or multivessel significant stenosis assessed by invasive angiography.

Markers of extracellular matrix metabolism

Patients with a more severe myocardial infarction, as determined by Killip-Kimbal class II or above, showed higher values of MMP-7 and TIMP-1 in the acute phase than those with Killip I (30.1 ± 5.1 vs 26.6 ± 1.9 ; $P = .04$ and 322 ± 221 vs 166 ± 72 ; $P = .04$, respectively). In addition, there was a significant negative correlation between left ventricular ejection fraction and MMP-7, MMP-10 and TIMP-1. However, we found no association between MMPs and other clinical variables indicating a more extensive atherosclerosis by calcium score, number of coronary segments with stenosis or with the GRS. In the multivariate Cox model, MMPs were not independent predictors of recurrent cardiovascular events.

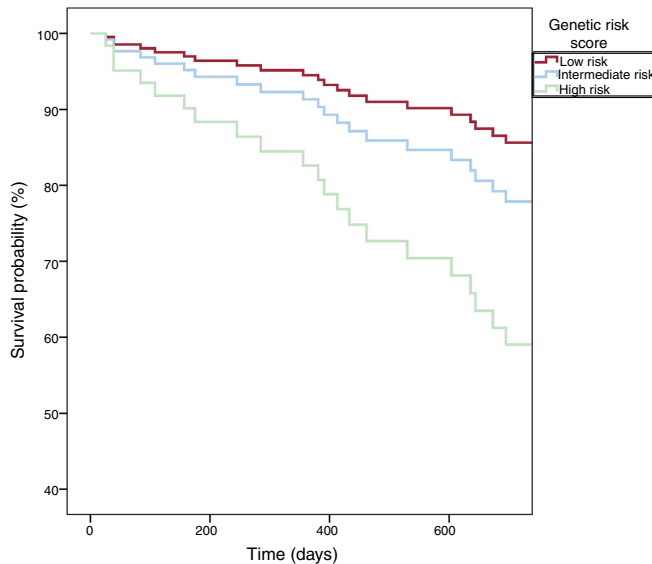


Figure 2. Incidence of recurrent events over time with the Kaplan-Meier method for low, intermediate and high-risk genetic risk score (GRS).

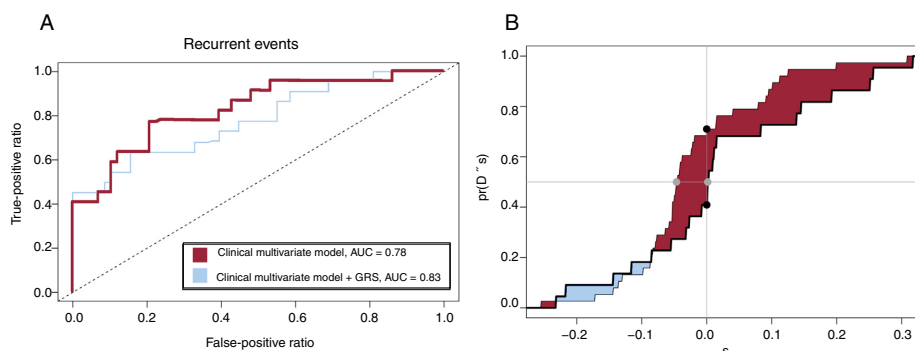


Figure 3. A: receiver operating characteristic curves for the multivariate Cox model (including GRACE risk score and LDL-C) in red and for the multivariate model with the addition of the GRS in blue. B: empirical distribution function of ΔD for $T^0 \leq t_0$ (thick solid line) and $T^0 > t_0$ (thin solid line) for assessing IDI and cNRI, as described by Uno et al.¹⁸. T^0 denotes event time, while t_0 reflects a particular time point. Patients who have an event by t_0 can be defined as cases (ie, $T^0 \leq t_0$) and those who do not as controls (ie, $T^0 > t_0$). ΔD denotes the change between the 2 models and visually assesses improvement in risk prediction systems (see [methods of the supplementary data](#)). AUC, area under the curve; cNRI, continuous net reclassification improvement; GRACE, Global Registry of Acute Coronary Events; GRS, genetic risk score; IDI, integrated discrimination improvement; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol.

DISCUSSION

The major finding of our study is that the implementation of a GRS after an AMI in young nondiabetic patients may have clinical utility for the prediction of recurrent cardiovascular events independently of other clinical variables. Remarkably, the relevance of a moderate or high-risk GRS was limited to patients with high LDL-C, which acted as modifier. Conversely, among patients with high LDL-C, a poor genetic background could boost their recurrence risk compared with a more favorable genetic score. Therefore, patients with elevated LDL-C could benefit most from genetic testing, validating for the first time a hypothesis that remained unconfirmed.¹⁹ Hence, the possibility to detect individuals at higher risk represents an actionable goal to tailor more aggressive secondary therapy.

Genetics

In our analysis, a well validated GRS composed of 11 genetic variants, including 8 SNPs and 1 haplotype was predictive of recurrent cardiovascular events during a 4.1 year follow-up after an AMI in young nondiabetic patients. A poor genetic background was associated with a higher risk of the primary endpoint, which was markedly increased when LDL-C levels were raised, a hypothesis that has been recently proposed.¹⁹ Inclusion of the GRS improved the C-statistic (ΔC -statistic = 0.086) in a model adjusted for GRACE risk score and LDL-C. The population undergoing genetic testing had a high likelihood of genetic susceptibility for CAD, reflected in the almost 2-fold higher prevalence of most of the risk alleles variants analyzed compared with the general population of the same ethnicity. While the clinical usefulness of this GRS for prediction of incident CAD had already been tested, its use in secondary prevention was mainly unknown.

SNPs arising from large-scale GWAS are primarily related to atherosclerotic disease mediated through risk factors, and, to a lesser degree, directly to AMI.²⁰ Pathophysiological findings underlying CAD and AMI differ, with a greater influence of thrombosis in AMI.² This might partially explain the different results seen in primary and secondary prevention. The SNPs included in our study act either independently of classic risk factors or their mechanism was unknown.³

Studies evaluating the use of individual SNPs for the prediction of recurrent cardiovascular events after an ACS initially showed good predictive capacity but they usually lacked subsequent confirmation. In one study,²¹ an individual SNP in the 9p21 locus was initially associated with recurrences after AMI, but a later meta-analysis excluded any significant influence for the risk of recurrence.²² Another single risk variant identified in the ABO gene weakly improved a clinical risk prediction model for recurrences in a different study,²³ but this finding has not been subsequently replicated.²⁴

SNPs associated with CAD are common, and individually they only account for a small increase in risk. This has led to the development of GRS composed of multiple SNPs. Only a few studies have tested GRS for secondary prevention with conflicting evidence. Labos et al.²⁵ were unable to find an association between a 30-SNP GRS and early recurrent events (< 1 year after ACS). Although these authors conclude that the etiology of early events may differ from that of later events, limiting the use of genetic testing, there are some possible explanations for this outcome: a) the variants that composed this GRS mainly covered genes associated with atherothrombosis, which is one of the main targets of drugs used after AMI; it is plausible that once specific therapy has been established, the variant-associated risk might be subjugated²⁰; b) the GRS lacked a previous validation in the general population, and all the SNPs were derived from GWAS studies, which may account for only 10% of genetic susceptibility.² In our study, we intentionally used a GRS previously validated for CAD but initially unrelated to risk factors. Mega et al.¹⁹ found an association between genetic risk categories based on a 27-SNP GRS and incident and recurrent events among patients included in statin clinical trials. The benefits of statins were greater in patients with intermediate or high genetic risk. These authors suggest that a high genetic burden should constitute a distinct focus of attention, since their risk of recurrences is increased and their benefit from therapy is greater. Our results are in line with these findings, and they replicate for the first time the ability of GRS to predict recurrent cardiovascular events linking the effect with dyslipidemia. Finally, Vaara et al.²⁴ evaluated 2 GRS based on 47 and 153 SNPs respectively; whereas GRS47 showed some positive results, GRS153 did not, none of them were associated with the composite endpoint, and they did not substantially improve risk prediction models; these authors mention as a limitation the reduced number of young patients in whom the association might be stronger.

Several factors may have influenced the different outcomes: first, the heterogeneity of populations and variable follow-up; second, GRS composed of a higher number of variants cover a larger proportion of genetic predisposition, but they have consistently shown worse predictive ability³ and, finally, although most studies have used a composite outcome, they vary in their definition of recurrences, which limits comparisons.

Similar to prior studies, we found no association between a family history of CAD and GRS, which reflects the value of genomic data beyond self-reported family history.³

Cardiac computed tomography

Calcification and multisegment and/or multivessel disease were higher than previously reported in this population compared with other studies using invasive coronary angiography to characterize nonculprit lesions. This may reflect the fact that even in young patients with an acute clinical onset, subclinical atherosclerosis has a long-standing course. The clinical value of cardiac CT for patients with ACS is limited: while the number of coronary plaques showed a trend toward a higher risk of events, the calcium score did not. This probably reflects the usual pathway of ACS, with plaque rupture of lipid-rich nonstenotic lesions rather than chronic and calcified lesions. We found no association between the number of risk alleles and baseline coronary calcium score or number the plaques detected by CT in the first common description in the literature among patients with AMI.

Extracellular matrix metabolism

MMPs are mediators of plaque rupture and atherothrombosis. They are increased after myocardial infarction and have been proposed as predictors of heart failure and adverse remodeling.²⁶ In our study, MMP-7, MMP-10 and TIMP-1 were associated with a more severe myocardial infarction in the acute phase but did not predict left ventricular recovery or recurrences during follow-up.

The strengths of our study include a homogeneous population with a high likelihood of genetic predisposition, comprehensive clinical and biochemical information, and complete follow-up. Cardiac CT with calcium score and plaque analysis offers an unprecedented vehicle for characterization of underlying disease linked to patients' genetic profile.

Limitations

This study has some limitations. First, because of the highly restrictive selection criteria, the number of patients is relatively low; selection was based on previous observations that younger individuals are more prone to have genetic contributors to their recurrence risk²⁷; therefore the results may not be generalizable to the whole spectrum of ages, diabetic population, or different ethnicities. Second, we used a composite endpoint, similar to comparable studies, but exposed to include events not genetically-driven. Third, the high use of optimal medical therapy resulted in fewer follow-up events than expected.

CONCLUSIONS

A GRS that combined 11 SNPs identified individuals at highest risk of long-term recurrences among young nondiabetic patients with myocardial infarction and improved clinical risk stratification models. Patients with high LDL-C may derive the greatest benefit from genetic testing. Cardiac CT detected a calcified substrate with

numerous atherosclerotic plaques but had limited value in long-term risk prediction.

FUNDING

This study was supported by the *Instituto de Salud Carlos III* (P112/0564, P114/01152 and P115/00667), the *CIBERCV* (CB16/11/00250), the Spanish Society of Cardiology (2015/*Cardiología clínica*) and *Fundación Eugenio Rodríguez Pascual*.

CONFLICTS OF INTEREST

None declared.

WHAT IS KNOWN ABOUT THE TOPIC?

- Dozens of common genetic variants are associated with CAD, each leading to a small increase in risk. GRS have been generated as a summation of multiple loci to provide an estimate of individual-level risk. GRS have been positively tested in the general population to assess the risk of a first cardiovascular event. However, the usefulness of genetic risk markers for the prediction of recurrent events among patients with a prior myocardial infarction remains largely unknown.

WHAT DOES THIS STUDY ADD?

- This is the first series in the Spanish population to study a multilocus GRS in a homogeneous group of young patients with a high likelihood of a genetic predisposition to recurrence who had already had a myocardial infarction. The implementation of the GRS was clinically useful for the prediction of recurrent cardiovascular events independently of other variables and improved clinical risk stratification models. This study serves as a proof of concept for the use of genetic tools in secondary prevention after a myocardial infarction.

APPENDIX. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version available at <https://doi.org/10.1016/j.rec.2019.08.006>

REFERENCES

1. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137:e67–e492.
2. Roberts R. Genetic Risk Stratification. *Circulation*. 2018;137:2554–2556.
3. Iribarren C, Lu M, Jorgenson E, et al. Clinical Utility of Multimarker Genetic Risk Scores for Prediction of Incident Coronary Heart Disease: A Cohort Study among over 51 000 Individuals of European Ancestry. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016;9:531–540.
4. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*. 2016;37:2315–2381.
5. Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2018;39:119–177.

6. Doughty M. Acute myocardial infarction in the young – The University of Michigan experience. *Am Heart J*. 2002;143:56–62.
7. Malmberg K, Båvenholm P, Hamsten A. Clinical and biochemical factors associated with prognosis after myocardial infarction at a young age. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:592–599.
8. Rubin JB, Borden WB. Coronary heart disease in young adults. *Curr Atheroscler Rep*. 2012;14:140–149.
9. Fox KAA, FitzGerald G, Puymirat E, et al. Should patients with acute coronary disease be stratified for management according to their risk? Derivation, external validation and outcomes using the updated GRACE risk score. *BMJ Open*. 2014;4:e004425.
10. Ganna A, Magnusson PKE, Pedersen NL, et al. Multilocus genetic risk scores for coronary heart disease prediction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:2267–2272.
11. Brautbar A, Pompeii LA, Dehghan A, et al. A genetic risk score based on direct associations with coronary heart disease improves coronary heart disease risk prediction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC), but not in the Rotterdam and Framingham Offspring, Studies. *Atherosclerosis*. 2012;223:421–426.
12. Cole JH, Miller JI, Sperling LS, Weintraub WS. Long-term follow-up of coronary artery disease presenting in young adults. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:521–528.
13. Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet*. 2004;36:233–239.
14. Huang H, Zeng Z, Li J, Zhang L, Chen Y. Variants of arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) gene and risk of coronary heart disease: A meta-analysis. *Arch Med Res*. 2010;41:634–641.
15. Tsai AK, Li N, Hanson NQ, Tsai MY, Tang W. Associations of genetic polymorphisms of arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein with risk of coronary artery disease in a European-American population. *Atherosclerosis*. 2009;207:487–491.
16. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet*. 2005;76:887–893.
17. Carr JJ, Nelson JC, Wong ND, et al. Calcified coronary artery plaque measurement with cardiac CT in population-based studies: standardized protocol of Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) and Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Radiology*. 2005;234:35–43.
18. Uno H, Tian L, Cai T, Kohane IS, Wei LJ. A unified inference procedure for a class of measures to assess improvement in risk prediction systems with survival data. *Stat Med*. 2013;32:2430–2442.
19. Mega JL, Stitziel NO, Smith JG, et al. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: An analysis of primary and secondary prevention trials. *Lancet*. 2015;385:2264–2271.
20. Assimes TL, Roberts R. Genetics: Implications for Prevention and Management of Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:2797–2818.
21. Buyschaert I, Carruthers KF, Dunbar DR, et al. A variant at chromosome 9p21 is associated with recurrent myocardial infarction and cardiac death after acute coronary syndrome: The GRACE genetics study. *Eur Heart J*. 2010;31:1132–1141.
22. Gong Y, Beitelshes AL, Cooper-DeHoff RM, et al. Chromosome 9p21 haplotypes and prognosis in white and black patients with coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:169–178.
23. Wauters E, Carruthers KF, Buyschaert I, et al. Influence of 23 coronary artery disease variants on recurrent myocardial infarction or cardiac death: The GRACE Genetics Study. *Eur Heart J*. 2013;34:993–1001.
24. Vaara S, Tikkanen E, Parkkonen O, et al. Genetic Risk Scores Predict Recurrence of Acute Coronary Syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016;9:172–178.
25. Labos C, Martínez SC, Leo Wang RH, et al. Utility of a genetic risk score to predict recurrent cardiovascular events 1 year after an acute coronary syndrome: A pooled analysis of the RISCA, PRAXY, and TRIUMPH cohorts. *Atherosclerosis*. 2015;242:261–267.
26. DeLeon-Pennell KY, Meschiari CA, Jung M, Lindsey ML. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;75–100.
27. Topol EJ, McCarthy J, Gabriel S, et al. Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin genes may be associated with familial premature myocardial infarction. *Circulation*. 2001;104:2641–2644.