

## Índice

1. <b>Resumo</b> .....	2
2. <b>Palavras-Chave</b> .....	2
3. <i>Abstract</i> .....	3
4. <i>Key Words</i> .....	3
5. <b>Lista de abreviaturas</b> .....	4
6. <b>Introdução</b> .....	6
7. <b>Material e Métodos</b> .....	9
8. <b>Desenvolvimento</b> .....	10
A. A biologia dos <i>microRNAs</i> .....	11
B. Os <i>microRNAs</i> terão um papel como biomarcadores?.....	13
C. Os <i>microRNAs</i> na fisiopatologia do EAM .....	14
D. O papel no diagnóstico do EAM.....	23
9. <b>Discussão e Conclusão</b> .....	31
A. Discussão .....	31
B. Conclusão.....	33
10. <b>Agradecimentos</b> .....	34
11. <b>Bibliografia</b> .....	35

## 1. Resumo

O enfarte agudo do miocárdio (EAM) é a principal causa de morte a nível mundial. Por este motivo, compreende-se a necessidade de aperfeiçoamento dos métodos atuais de diagnóstico e de desenvolvimento de métodos com maior acuidade diagnóstica. Os *microRNAs* são pequenas sequências com 20 a 25 nucleótidos, cuja principal função é a regulação de diversas moléculas após transcrição. Estas moléculas encontram-se envolvidas em processos celulares como por exemplo a proliferação, a apoptose ou a diferenciação celular de miócitos cardíacos, de células endoteliais e de fibroblastos. Durante o EAM, diversos *microRNAs* são libertados para a corrente sanguínea, onde são detetados através de várias técnicas laboratoriais. Os *microRNAs* podem por isso ser considerados biomarcadores do EAM.

Este trabalho pretende, à luz dos recentes avanços e descobertas na área dos *microRNAs*, discutir o papel destas moléculas no diagnóstico do EAM.

## 2. Palavras-Chave

Enfarte agudo do miocárdio (EAM); doença aterosclerótica coronária; *microRNAs*; biomarcadores; diagnóstico; prognóstico.

### **3. Abstract**

*Acute myocardial infarction (AMI) is the foremost cause of death worldwide. For this reason, it is not only necessary to improve the currently methods used in AMI diagnosis, but also to develop tools with higher diagnostic accuracy.*

*MicroRNAs are short nucleotide sequences, which main purpose is post-transcriptional regulation. These molecules are involved in a variety of celular mechanisms such as proliferation, apoptosis or cell differentiation (cardiomyocytes, endothelial cells and fibroblastos). Simultaneously, during AMI, numerous microRNAs are delivered into circulation, where they can be detected by different technics (PCR and microarrays). Therefore, microRNAs can be used as biomarkers.*

*This review discusses the role of these molecules in AMI diagnosis.*

### **4. Key Words**

*Acute myocardial infarction (AMI); Coronary heart disease; microRNAs; biomarkers; diagnosis; prognosis.*

## 5. Lista de abreviaturas

**ABCA1:** *ATP binding cassette, subfamily a, member 1;*

**akt:** ver **PKB**;

**APAF1:** *Apoptotic protease activating factor;*

**ARC:** *Apoptosis repressor with caspase recruitment domain;*

**ASC:** *Área sob a curva;*

**BMP:** *Bone morphogenetic proteins;*

**cTnT:** *cardiac troponin T;*

**cTnI:** *cardiac troponin I;*

**CXCR4:** *Chemokine receptor type 4;*

**EAM:** *Enfarte agudo do miocárdio;*

**EAM com supraST:** *Enfarte agudo com supradesnivelamento do segmento ST;*

**EAM sem supraST:** *Enfarte Agudo do miocárdio sem supradesnivelamento ST;*

**EDTA:** *ethylenediaminetetraacetic acid;*

**ELISA:** *enzyme-linked immunosorbent assay;*

**GJA1:** *Gap junction alpha-1 protein; Connexin 43;*

**JNK:** *c-Jun N-terminal kinases;*

**KCNJ2:** *Potassium channel, subfamily J, member 2;*

**Kir 2.1:** *inward-rectifier potassium ion channel;*

**LDL:** *low density lipoprotein;*

**mRNA:** *messenger ribonucleic acid;*

**microRNA:** *micro ribonucleic acid;*

**PKB:** *Protein kinase B;*

**pré-microRNA:** *microRNA precursor;*

**pri-microRNA:** *microRNA primário;*

**PTEN:** *Phosphatase and tensin homolog;*

**PUMA:** *p53 upregulated modulator of apoptosis;*

**qRT-PCR:** *quantitative real time polymerase chain reaction;*

**RISC:** *RNA induced silencing complex;*

**ROC:** *Receiver operating characteristic;*

**SMAD1:** *mothers against decapentaplegic homolog 1;*

**TGF $\beta$ R1:** *transforming growth factor beta receptor 1;*

**VCAM-1:** *vascular cell adhesion protein 1;*

**VEGF:** *vascular endotelial growth factor;*

## 6. Introdução

De acordo com a organização mundial de saúde, o enfarte agudo do miocárdio é a principal causa de morte, a nível mundial, sendo responsável pela morte de mais de sete milhões de pessoas por ano (1). De acordo com as características eletrocardiográficas, o enfarte agudo do miocárdio (EAM) pode ser classificado em EAM com supradesnivelamento ST (EAM com supraST) ou EAM sem supradesnivelamento de ST (EAM sem supraST). Relativamente à prevalência, nos últimos anos realça-se a diminuição dos EAM com supraST, e pelo contrário um aumento do número de EAM sem supraST (2). O género masculino é o mais frequentemente afetado. No que diz respeito ao prognóstico, o EAM sem supraST apresenta uma menor taxa de mortalidade a curto prazo comparativamente ao EAM com supraST. Contudo, quando se estabelece essa comparação a longo prazo a diferença é mitigada (2).

Os *micro ribonucleic acids (microRNAs)* são sequências de nucleótidos, com uma extensão entre 20 a 25 nucleótidos, que exercem a sua função através da sinalização para degradação de moléculas de *messenger ribonucleic acids (mRNA)* (3). A primeira molécula descrita como *microRNA* foi encontrada no nemátode *C. Elegans* em 1993 (4). No entanto, só sete anos mais tarde se constatou a presença de *microRNAs* no ser humano (5). Esta observação só foi possível após a constatação de que a molécula de *RNA let-7* é essencial para o desenvolvimento da forma adulta de *C. elegans* (6). Nos anos seguintes, acumulou-se evidência sobre a identificação de dezenas de *microRNAs* nos vermes, nas moscas e no ser humano (7). Em 2002, dada a descoberta de novos *microRNAs*, foi criada a base de dados “*microRNABase*”. Esta base tem como intuito englobar a nomenclatura, as sequências e os *mRNAs* alvo de

todos os *microRNAs* conhecidos (6). Atualmente, esta base contém mais de 35828 entradas de *microRNAs* relativos a 223 espécies (8). Até ao ano de 2013 tinham sido identificadas 2000 moléculas de *microRNA* humano, sendo responsáveis pela regulação de cerca de 30% do genoma (3). Atualmente, as moléculas de *microRNA* correspondem a um total de 2603.

Os *microRNAs* intervêm em diversos fenómenos celulares, mais especificamente, na embriogénese, diferenciação celular, proliferação celular, apoptose e hematopoiese (9). Por tal motivo, se depreende que associadamente a situações de desregulação destas moléculas se desenvolvam processos fisiopatológicos manifestados através de doenças, como por exemplo, doenças cardiovasculares. A primeira associação entre a ação de *microRNAs* e o desenvolvimento de doença foi estabelecida, no ano de 2002, entre os *microRNAs*-15a e os *microRNAs*-16-1 e a patogénese de leucemia crónica mielóide (6). Durante o ano de 2007, foram realizados os primeiros estudos de deteção de *microRNAs* desregulados, em indivíduos afetados por diferentes patologias cardiovasculares (cardiopatía isquémica, cardiomiopatía dilatada não isquémica e estenose aórtica) numa análise global do genoma (10).

Desde a sua descoberta, a investigação no campo dos *microRNAs* tem-se adensado, de tal forma que a informação gerada nestes estudos necessita de ser reunida e sistematizada. Por outro lado, tendo em consideração a elevada percentagem de mortalidade por EAM a nível mundial, apesar dos avanços terapêuticos, o aprimoramento das ferramentas diagnósticas atuais e o desenvolvimento de novos instrumentos são encarados como um imperativo categórico na Medicina do século XXI.

Este trabalho pretende sistematizar e responder a questões pertinentes como “Qual o papel dos *microRNAs* na fisiopatologia do EAM?”, “Qual o papel destes *microRNAs* no diagnóstico do EAM?” e “Terão os *microRNAs* importância diagnóstica superior aos marcadores de referência?”. Para tal, faz-se uma revisão sobre o biomarcador ideal, à qual se segue a referência à ação dos *microRNAs* na fisiopatologia do EAM, culminando na menção do papel dos mesmos no diagnóstico do EAM.



## 7. Material e Métodos

A pesquisa foi efetuada no período de janeiro de 2015 a Janeiro de 2016, através da base de dados da *US National Library of Medicine National Institutes of Health*. As palavras-chave foram “*microRNAs and myocardial infarction*”, “*microRNAs and detection methods*” e “*microRNAs and biomarkers*”.

Relativamente aos critérios utilizados na pesquisa de artigos citados neste trabalho, os critérios de inclusão englobam artigos publicados nos últimos dez anos, na língua inglesa, e artigos com acesso através da *Virtual Private Network* - Universidade de Coimbra.

## 8. Desenvolvimento

De acordo com a definição universal de EAM, o diagnóstico é estabelecido através da evidência de necrose do miocárdio associada a um quadro clínico sugestivo de isquemia do miocárdio (11). A necrose do miocárdio é evidenciada pela elevação dos marcadores de necrose dos miócitos cardíacos, preferencialmente, das troponinas, ou através de alterações eletrocardiográficas, nomeadamente, a elevação do segmento ST, o bloqueio de ramo esquerdo *de novo* ou as ondas Q patológicas. O quadro clínico sugestivo é indicado por sintomatologia isquémica, nomeadamente, dor retroesternal (do tipo aperto, com irradiação para o pescoço, mandíbula ou braço esquerdo, com duração de pelo menos vinte minutos, não aliviada pela ação da nitroglicerina) ou por quadros menos típicos incluindo dispneia, síncope, palpitações, náuseas e vômitos (11).

Um diagnóstico de EAM atempado e correto, possibilita a implementação de terapêutica adequada (11). Apesar do doseamento das troponinas ser considerado o teste padrão bioquímico para o diagnóstico de EAM, existem alguns aspetos a considerar na sua interpretação, especialmente nos casos sem alterações eletrocardiográficas. Uma elevação dos níveis de troponinas não é sinónimo de EAM, traduz, unicamente, a existência de lesão dos miócitos cardíacos (12). Por exemplo, verifica-se a elevação dos níveis de troponinas na tromboembolia pulmonar, na perimiocardite, na miocardiopatia de *Takotsubo*, na insuficiência cardíaca aguda, e insuficiência renal crónica, dando origem a falsos positivos para o diagnóstico de EAM (12). Por este motivo, o desenvolvimento de novos biomarcadores diagnósticos com maior acuidade e que possibilitem o diagnóstico diferencial entre diferentes patologias constitui uma área intensa de investigação.

## A. A biologia dos *microRNAs*

Os *microRNAs* são moléculas endógenas de *RNA* não codificante, com cerca de 20-25 bases de comprimento, cuja função é a regulação pós-transcrição de *mRNA* através da sua degradação ou da inibição da sua tradução (3). Estas moléculas são responsáveis não só pela regulação de mecanismos fisiológicos, tais como a diferenciação, proliferação ou apoptose, mas também pela adaptação da célula a condições fisiopatológicas como isquémia, hipertrofia e arritmias (13).

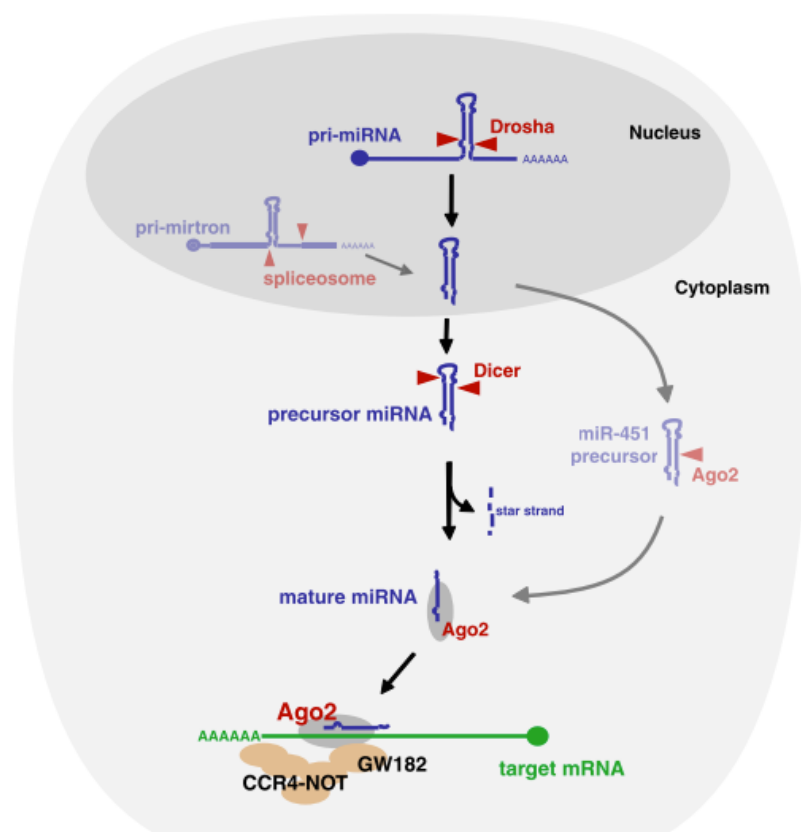
Os genes responsáveis pela codificação dos *microRNAs* apresentam diversas localizações genómicas, englobando genes não codificadores, intrões ou regiões não traduzidas de genes codificadores de proteínas (14).

Na maioria dos casos, a transcrição é feita através da *RNA* polimerase II, resultando na formação do *microRNA* primário. De seguida, este *microRNA* sofre um processo de maturação (*splicing*), ao qual se segue um processo de *capping* culminando num processo de poliadenilação (14).

A etapa ulteriora é a fase de processamento, levada a cabo pelas enzimas *Drosha* e *Dicer*. Ainda no núcleo, a enzima *Drosha* cliva o *microRNA* primário, resultando na formação de *microRNA* precursor. Esta molécula é transportada para o citoplasma, onde é sujeita à ação da *Dicer*, produzindo a molécula final de *microRNA* (14).

Por fim, o *microRNA* é acoplado a um complexo proteico (*RISC*), constituído em parte pela proteína Argonauta, encontrando-se pronto para executar a repressão da molécula de *mRNA* alvo (14).

Este processo é regulado em três etapas principais: na transcrição (14), durante a fase de processamento do *microRNA* primário no núcleo, no processamento do pré-*microRNA* no citoplasma e através da sua degradação (15) (ver figura 1).



**Figura 1** - Etapas da biossíntese da molécula de *microRNA*. Imagem retirada de: Hammond SM. *An overview of microRNAs. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;87:3–14.*

Nos últimos anos, foi introduzido o conceito de *isomicroRNA* (*isomicroRNA*). Os *isomicroRNAs* são pequenas variações nas sequências de *microRNAs*, quer na extremidade 3', quer na extremidade 5' (16). Estes *microRNAs* resultam, principalmente, da ação indeterminada das enzimas *Drosha* e *Dicer*, entre outras (17). Os estudos mais recentes apontam como funções fisiológicas, o aumento da estabilidade dos *microRNAs* e da carga suportada pelo complexo *RISC* (17).

Os *microRNAs* podem ser libertados em vários fluidos corporais, nomeadamente, no plasma. A maioria dos *microRNAs* extracelulares são encontrados acoplados a um complexo proteico Argonauta 2, enquanto os restantes são incluídos em vesículas

extracelulares, exossomas ou em partículas de *HDL* (18). Estes complexos funcionam como veículos de transporte, impedindo a sua degradação por *RNAses*, contribuindo, por isso, para a sua estabilidade (18).

### **B. Os *microRNAs* terão um papel como biomarcadores?**

Desde a sua descoberta, os *microRNAs* têm gerado uma intensa discussão e constante investigação. Uma das suas hipotéticas aplicações é como biomarcador em diversas condições patológicas, como no carcinoma colorretal (19), na epilepsia (20), na diabetes *mellitus* tipo 1 e 2 (21) e (22) e nas doenças cardiovasculares, nomeadamente, no enfarte agudo do miocárdio (23).

Um biomarcador é qualquer substância, estrutura, processo ou seus derivados passível de ser mensurável no organismo, com a capacidade de prever a incidência da patologia e/ou suas complicações (24). Características inerentes à biologia dos *microRNAs* como a acessibilidade fácil das amostras (soro, plasma, urina, e outros fluidos corporais) para análise laboratorial (25), a grande estabilidade *in vitro*, a inalterabilidade em contexto de insuficiência renal, como acontece com o *microRNA*-499 (26) e a especificidade para tecidos, como se verifica com o *microRNA*-133a para as células musculares (27) satisfazem as condições supramencionadas. A estas características biológicas somam-se características técnicas, nomeadamente, a existência de ferramentas laboratoriais como *qRT-PCR*, que possibilitam a deteção de pequenos níveis de *microRNAs* (9). Estes atributos biológicos e técnicos constituem argumentos a favor da utilização dos *microRNAs* como biomarcadores.

Contudo, ainda é necessária uma maior investigação, nomeadamente ao nível da especificidade incompleta para doenças (28), da variabilidade quantitativa e qualitativa entre fluidos corporais (plasma e soro, por exemplo) (29), do efeito de

diferentes anticoagulantes (*EDTA*, citrato e heparina) (30), da existência de um possível ritmo circadiano de secreção de *microRNAs*, da variabilidade entre estados pós-prandiais e jejum (28), da contaminação por *microRNAs* com origem em células hematopoiéticas (31) e da circulação acoplada a diferentes estruturas proteicas ou lipídicas (18).

Além das considerações fisiológicas e moleculares supracitadas existem, ainda variáveis técnicas a ter em conta, como é o caso da necessidade de controlos de normalização na técnica de *qRT-PCR* (28). Comparando as técnicas de doseamento dos *microRNAs* (*qRT-PCR*) com as técnicas de doseamento dos marcadores de referência (*ELISA*) no diagnóstico do EAM, verifica-se que as técnicas de *qRT-PCR*, são mais demoradas que as técnicas de *ELISA* (32).

Considerando os pontos a favor e contra a utilização de *microRNAs* como biomarcadores constata-se, que apesar de poderem ser considerados biomarcadores, não apresentam vantagem relativamente aos biomarcadores de referência.

### **C. Os *microRNAs* na fisiopatologia do EAM**

A maioria dos EAM resultam da rotura de placa aterosclerótica (33). A patogénese da placa aterosclerótica é dividida em duas grandes fases: fase de iniciação e fase de evolução. Na fase de iniciação, a acumulação de lipoproteínas, sujeitas a processos de oxidação, é considerada a primeira etapa. Ainda na fase de iniciação, verificam-se fenómenos de recrutamento e de retenção leucocitários. Estes leucócitos são, maioritariamente, macrófagos que fagocitam as partículas de *LDL* resultando na formação de células espumosas. A localização das lesões ateromatosas encontra-se relacionada com as forças de cisalhamento sobre o endotélio, de tal modo que o endotélio sujeito a baixas forças de cisalhamento, apresenta maior risco de

desenvolver lesões ateroscleróticas. Na fase de evolução, constata-se fenômenos de migração, proliferação e apoptose de células musculares lisas, associados a angiogénese dentro da lesão ateromatosa e a calcificação do ateroma (34).

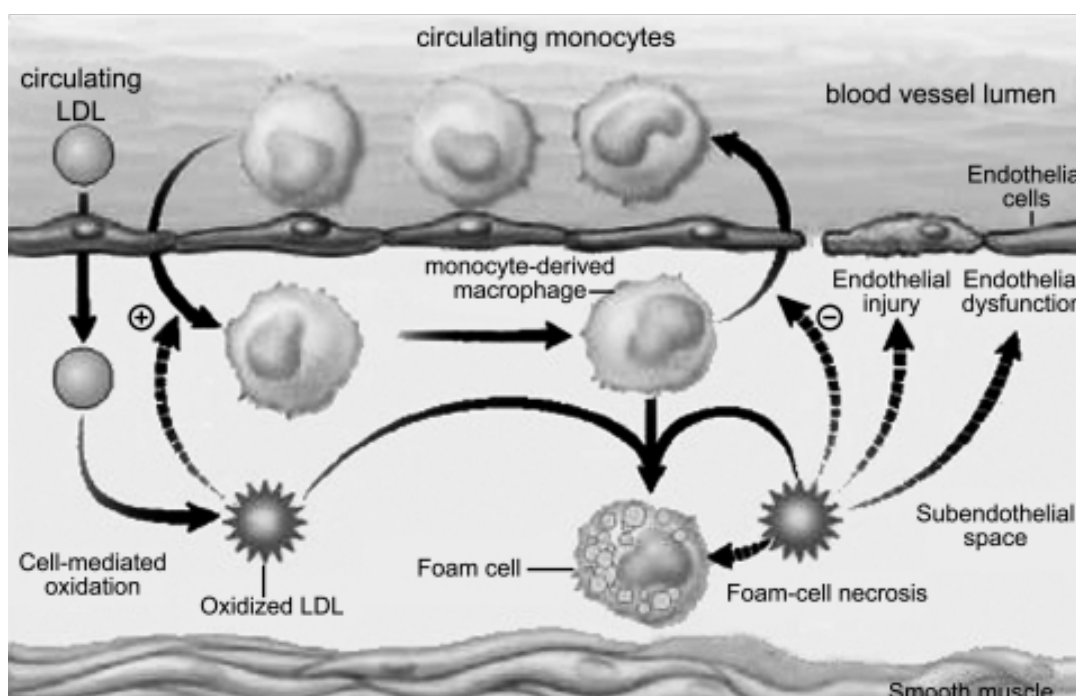
Vários estudos realizados em humanos apontam diferenças significativas nos níveis de determinados *microRNAs* entre os doentes com doença coronária e o grupo de controlo. Os *microRNAs* -206 e -574-5p são alguns exemplos (35).

Adicionalmente, existe também, evidência molecular das diversas interações entre *microRNAs* e a patogénese da doença aterosclerótica coronária.

A acumulação de lipoproteínas e o processo de oxidação (ver figura 2), parecem ser regulados pela ação de alguns *microRNAs*, nomeadamente, o *microRNA-144-3p* e *microRNA-146a*. O *microRNA-144-3p* é responsável pela diminuição dos níveis de *ABCA1*, uma proteína responsável pelo transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado. Esta observação aponta para o papel patológico do *microRNA-144-3p* na acumulação de lipoproteínas (36). Por outro lado, o *microRNA-146a* encontra-se associado à diminuição da integração de partículas oxidadas de *LDL* em macrófagos, inibindo assim a formação de células espumosas (37).

O recrutamento leucocitário é outra etapa envolvida na patogénese da aterosclerose. A ação dos *microRNAs* reflete-se na expressão de moléculas de adesão, que por sua vez, influenciam o recrutamento leucocitário. Um exemplo é o *microRNA-126*, que inibe a expressão de *VCAM-1*, e conseqüentemente, inibe o recrutamento leucocitário (5).

O efeito de forças de cisalhamento é mediado pela ação de alguns *microRNAs*, como o *microRNA-21*. A biogénese deste *microRNA* é estimulada por forças de cisalhamento, resultando na diminuição da apoptose e ativação da síntese de óxido nítrico em células endoteliais (38).



**Figure 2-** A patogénese da doença aterosclerótica (108). (*Foam cells* = células espumosas). Retirado de *N(epsilon)-(Carboxymethyl)lysine and Coronary Atherosclerosis-Associated Low Density Lipoprotein Abnormalities in Type 2 Diabetes: Current Status. J Clin Biochem.*

A ação dos *microRNAs* também se constata na fase de evolução da placa ateromatosa. A título de exemplo, menciona-se o *microRNA-19b*. Este *microRNA* está associado à diminuição da apoptose de células endoteliais, através da inibição de *mRNA* de proteínas pró-apoptóticas (*APAF1* e caspase 7) (39). A relação molecular não se limita à inibição da apoptose, aplicando-se também à proliferação de células endoteliais e células musculares lisas, através da estimulação do *microRNAs-135b-5p* e do *microRNA-499a-3p* (40).

A forma de atuação dos *microRNAs* na angiogénese apresenta um carácter divalente, pois apresenta efeitos pró-angiogénicos e antiangiogénicos.



A antiangiogénese é mediada através da ação de *microRNAs* como o *microRNA-206* e o *microRNA-214* (41) e (42). Os efeitos pró-angiogénicos devem-se à ação de *microRNAs* como o *let-7* e *microRNA-17-92* (5).

O sistema da endotelina intervém na evolução e rotura da placa através da proliferação de macrófagos e fibroblastos. Sabe-se que os *microRNA-155*, *-125-5p*, *-199 a/b-3p* inibem a tradução de *mRNA* responsável pela codificação da endotelina-1 em células endoteliais. Estas observações são suportadas pelos níveis diminuídos dos *microRNAs-155*, *-125-5p* e *-199 a/b-3p* em doentes com doença coronária aterosclerótica (43).

No EAM, após 2 horas de isquémia, ocorrem alterações celulares irreversíveis. Estas alterações incluem a necrose de coagulação e a necrose em bandas. Nos primeiros dias após enfarte, segue-se um período de recrutamento de granulócitos, seguido por um período quimiotáxico de monócitos pró-inflamatórios. A partir do 3º dia os monócitos recrutados apresentam características menos inflamatórias (pró-angiogénicas e pró-fibrogénicas). Durante a fase de proliferação após enfarte ocorrem os fenómenos de angiogénese e recrutamento de células mesenquimatosas (34).

Os *microRNAs* estão associados à regulação da necrose. Esta regulação é levada a cabo por *microRNAs* como o *microRNA-2861* e o *microRNA-874*. O *microRNA-2861* é responsável pela inibição de *ANT 1*, uma proteína da membrana interna da mitocôndria, que funciona como um inibidor da necrose dos miócitos cardíacos (44). O *microRNA-874* é responsável pela inibição da caspase 8, resultando num efeito pró-necrótico (45).

Outra forma de morte celular dos miócitos cardíacos é a apoptose. Os *microRNAs* encontram-se também envolvidos na regulação deste mecanismo celular.

O *microRNA-499* encontra-se associado a apoptose induzida por espécies reativas de oxigénio. Os mecanismos moleculares envolvidos englobam a ativação da *JNK* (*c-jun N-terminal kinases*) e fosforilação de *c-jun* (46). Para além da atividade individual de cada *microRNA*, a atividade conjunta de *microRNAs* apresenta, também, uma influência sinérgica. A título de exemplo, destaca-se a atividade do *microRNA-1* e *microRNA-21*. Esta atividade resulta na inibição da apoptose de miócitos cardíacos, através da ativação de *Akt* (47). Outro estudo, relativo apenas ao *microRNA-21* reitera estes resultados, quer em situações de lesão por hipoxia/reperfusão ou isquémia reperfusão (48). O *microRNA-21* está associado aos mecanismos de proteção por pré-condicionamento, através da via *PTEN/Akt* (49).

A existência de polimorfismos contribui para a existência de indivíduos com maior ou menor propensão para a apoptose. Um exemplo de polimorfismo é a substituição de A para G, na molécula de pré-*microRNA-149*, que se encontra associada um incremento da atividade apoptótica através da ativação da proteína *PUMA* (50). Outros *microRNAs* foram associados à regulação da apoptose como é evidenciado pela tabela abaixo (Tabela 1).

A autofagia é outra forma de morte celular associado à isquémia do miocárdio. O *microRNA-325* foi associado a um aumento da autofagia, através da inibição de *ARC* (51).

Relativamente ao recrutamento leucocitário, os *microRNAs* desempenham um papel divalente. O *microRNA-155* associa-se a um efeito pró-inflamatório com diminuição do recrutamento leucocitário após lesão de reperfusão (52).

Por outro lado, o *microRNA-150* encontra-se associado a um efeito anti-inflamatório, exercendo a sua ação através da inibição do recetor *CXCR4* (53).

Durante a fase proliferativa, decorre a promoção de angiogénese. Durante este processo, o *microRNA-130a* encontra-se envolvido através do aumento dos níveis de *VEGF* (54). Ao invés, o *microRNA-26a* está associado à inibição da angiogénese através da via *BMP/SMAD1* (55). O *microRNA-92* é outra molécula com efeitos anti-angiogénicos, contribuindo para os fenómenos que constituem a remodelação cardíaca (56). A inibição do *microRNA-92a* está associada a uma diminuição da zona de necrose e a uma diminuição da disfunção cardíaca através do efeito pró-angiogénico e anti-inflamatório (57). Durante esta fase ocorre também a diferenciação fibroblástica, na qual se envolvem *microRNAs*, como o *microRNA-145*. Este *microRNA* encontra-se associado à promoção da diferenciação de fibroblastos cardíacos em miofibroblastos (58).

Durante a fase de cicatrização decorre a fibrogénese. Neste processo estão envolvidos *microRNAs* tais como o *microRNAs-208a* e o *microRNA-101a*. O *microRNA-208a* está associado a uma estimulação da fibrogénese após EAM, através da atividade da endogлина (59). Por outro lado, o *microRNA-101a* está relacionado com a diminuição da fibrogénese, através da *TGF $\beta$ RI*, resultando na diminuição da fibrose cardíaca (60).

As arritmias supra-ventriculares e ventriculares surgem, com frequência, na sequência do evento de necrose dos miócitos cardíacos. Os *microRNAs* também estão envolvidos neste processo. A diminuição nos níveis de *let7e* está associada a um aumento dos efeitos arrítmicos em ambientes celulares após EAM. Este mecanismo é desencadeado pela ativação dos recetores adrenérgicos  $\beta$ 1 (61).

A diminuição dos níveis de *microRNA-151-5p* está associada a um aumento dos fenómenos arrítmicos após EAM, em situações com reduzidos níveis estrogénicos (62).

O silenciamento do *microRNA*-181a está associado à diminuição da arritmogénese em ratos sujeitos a transplante de mioblastos do esqueleto (63). Outro *microRNA* associado a fenómenos arrítmicos é o *microRNA*-1, exercendo a sua ação através da inibição dos genes *KCNJ2* e *GJA1* responsáveis pela codificação de *Kir 2.1* e *conexina 43*, respetivamente (64).

<b>Autor</b>	<b>Ano de publica.</b>	<b>microRNA</b>	<b>Via molecular</b>	<b>Efeito</b>
<i>Kun et al.</i> (44)	2015	2861	<i>ANT1</i>	Pró-necrótico
<i>Chen et al.</i> (65)	2015	130a	<i>PI3/Akt</i>	Pró-angiogénico, antiapoptótico
<i>Yingqi et al.</i> (47)	2015	1 e 21	<i>Akt/p53</i>	Antiapoptótico
<i>Qiong et al.</i> (48)	2014	21	<i>PTEN/Akt</i>	Antiapoptótico
<i>Jincheng et al.</i> (66)	2014	140	<i>Mfn1</i>	Pró-apoptótico
<i>Jiaji et al.</i> (46)	2014	499	<i>Bid</i>	Antiapoptótico
<i>Xiaohui et al.</i> (67)	2014	125b	Inibição das vias intrínseca e extrínseca	Antiapoptótico
<i>Yuliang et al.</i> (68)	2014	22	<i>Mecp2</i>	Antiapoptótico
<i>Li et al.</i> (69)	2014	24	Inibição da via intrínseca	Antiapoptótico
<i>Su-Ling et al.</i> (50)	2013	149	<i>PUMA</i>	Antiapoptótico
<i>Bo et al.</i> (70)	2013	761	<i>MFF(mitochondrial fission factor)</i>	Pró-apoptótico
<i>Kou-Gi et al.</i> (59)	2015	208a	endoglina	Pró-fibrótico
<i>Xin et al.</i> (60)	2015	101a	<i>TGFβRI</i>	Antifibrótico
<i>Eva et al.</i> (71)	2008	29	Inibição de <i>mRNA</i> do colagénio	Antifibrótico
<i>Yao et al.</i> (58)	2014	145	<i>KLF5</i> e miocardina	Pró-fibrótico

<i>Steffen et al.</i> (52)	2015	155	<i>JAK/STAT</i>	Pró-inflamatório
<i>Ha et al.</i> (72)	2009	210	<i>FLASH/casp8ap2</i>	Antiapoptótico
<i>Yi et al.</i> (63)	2009	181	<i>HOX A11</i>	Próarritmico
<i>Alberto et al.</i> (73)	2014	133a	<i>Bim /Bmf</i>	Antiapoptótico
<i>Zhili et al.</i> (54)	2014	377	<i>VEGF</i>	Antiangiogénico
<i>Basak et al.</i> (55)	2013	26a	<i>BMP/SMAD1</i>	Antiangiogénico
<i>Yaqi et al.</i> (74)	2015	30	<i>CSE/H2S</i>	Pró-apoptótico
<i>Wang et al.</i> (45)	2013	874	Caspase 8	Pró-necrótico
<i>Xin et al.</i> (61)	2014	<i>let7e</i>	$\beta$ 1 adrenérgica	Antiarrítmico
<i>Ying et al.</i> (62)	2013	151-5p	<i>PLM/canal iónico</i>	Antiarrítmico
<i>Bo et al.</i> (51)	2014	325	<i>ARC</i>	Pró-autofágico
<i>Chuanyu et al.</i> (75)	2013	30b	<i>BCL-2</i>	Pró-apoptótico
<i>Jianqiang et al.</i> (76)	2013	23a	Caspase 7	Antiapoptótico

**Tabela 1** - Vias moleculares e efeitos celulares de diferentes *microRNAs*

## D. O papel no diagnóstico do EAM

Os *microRNAs* têm sido alvo de intensa investigação, sendo notória a sua associação a entidades patológicas, nomeadamente, doenças autoimunes, inflamatórias, neurodegenerativas e cardiovasculares (77). Enquanto biomarcadores, a sua potencialidade diagnóstica é conhecida em patologias como neoplasias e lesões hepáticas induzidas por fármacos (78). Vários estudos avaliaram a sua acuidade diagnóstica no EAM (Ver tabela 2).

Vários estudos de análise de *microarrays*, em modelos animais e em peças de cadáver (79), (80) e (81), foram determinantes para a deteção e construção de perfis *microRNAs* envolvidos no EAM. *Emanuela et al.* compararam a expressão dos *microRNAs* em corações de fetos e de doentes com antecedentes de enfarte com a expressão em corações de indivíduos saudáveis. Os autores deste estudo sugerem que alguns padrões de expressão dos *microRNAs* são semelhantes no coração enfartado e no coração fetal. Além disso, este estudo permitiu associar 10 novos *microRNAs* à doença cardiovascular e constatar a presença de 5 novos *microRNAs* no coração humano enfartado (79). *Shimin et al.* constataram, em ratos, níveis de *microRNAs* distintos entre a zona não enfartada, enfartada e de transição. Adicionalmente, os mesmos autores verificaram ainda, que apesar da maioria dos *microRNAs* se expressar de forma semelhante na zona não enfartada e nos controlos *sham*, alguns apresentaram níveis significativamente diferentes (81). Esta observação, de acordo com os autores, poderá sugerir um papel fisiopatológico dos *microRNAs* no desenvolvimento do EAM.

Os estudos seguintes visaram confirmar a desregulação dos *microRNAs* no ser humano, em contexto de doença cardiovascular.

Estes estudos apresentaram como premissa a proposição de que os *microRNAs* são libertados para o sangue após lesão celular. No espectro das doenças cardiovasculares, inclui-se não só o EAM, mas também a miocardite, a insuficiência cardíaca aguda (82), a angina estável, a angina instável (83), a cardiomiopatia de *Takotsubo* (84) e a doença aterosclerótica coronária (85).

De acordo com a literatura, está descrito que o *microRNA-1* se encontra aumentado em zonas distantes do foco de necrose, em indivíduos com EAM (86). Além da sua localização cardíaca, este *microRNA* é encontrado, também, em fluidos corporais como o sangue e urina (87).

*Ai et al.* isolaram *microRNA-1* de plasma de 93 doentes com EAM, recorrendo a *qRT-PCR* (78). Estes autores compararam os níveis do *microRNA*, em indivíduos com EAM e em indivíduos saudáveis, observando a existência de níveis elevados de *microRNA-1* no primeiro grupo. Estes investigadores calcularam uma  $ASC=0,77$  (0,71–0,84) e constataram a existência de uma correlação positiva com o alargamento do complexo QRS (78). Esta correlação positiva é facilmente compreendida tendo em conta a ação pró-arrítmica despoletada por este *microRNA*, através da inibição de genes como *KCNJ2* e *GJA1* (64). A relevância diagnóstica reportada neste estudo é suportada por estudos de outros autores, nomeadamente, *Guangwen et al.* (77) e *Li-ming et al.* (88). O primeiro destes atestou, em doentes com EAM, a correlação positiva entre a elevação dos níveis de *microRNA-1* e *cTnT*. Adicionalmente, o mesmo estudo correlacionou, negativamente, os níveis de *microRNA-126* com os níveis de *cTnT*. O segundo estudo para além de constatar a elevação dos níveis deste *microRNA*, comparou a  $ASC$  do *microRNA-1* e das *cTnT* e concluiu que o *microRNA-1* [ $ASC=0,85$  (0,81-0,89)] apresenta eficácia diagnóstica inferior às *cTnT* ( $ASC = 0,96$ ).



Outro *microRNA* envolvido em vários estudos é o *microRNA-499*. *Maarten et al.* constataram a existência de níveis deste *microRNA* significativamente diferentes entre quatro grupos de indivíduos: doentes com EAM, doentes com miocardite viral, doentes com insuficiência cardíaca aguda e doentes com disfunção diastólica. Os autores concluíram que o *microRNA-499* se encontrava mais elevado no grupo de doentes com EAM comparativamente aos outros grupos, seguido pelo grupo de doentes com miocardite viral. Para a avaliação da acuidade diagnóstica do *microRNA-499*, *Lizhu et al.* utilizaram uma amostra de 227 indivíduos com toracalgia atendidos no serviço de urgência. A acuidade diagnóstica deste *microRNA* foi avaliada através da construção de curvas *ROC*, tendo-se calculado uma *ASC* de 0,86 (0,81-0,91). De acordo com os mesmos autores, esta acuidade diagnóstica é inferior à acuidade diagnóstica dos marcadores de referência de EAM (*cTnI*). Este estudo permitiu ainda constatar o potencial diagnóstico deste *microRNA* em patologias como miocardite ou *angina pectoris* e observar a elevação dos níveis deste *microRNA* uma hora após início de sintomatologia (26). Além da avaliação da acuidade diagnóstica, alguns autores correlacionaram, positivamente, os níveis deste *microRNA* com a gravidade e extensão do EAM, quer através do número de artérias envolvidas, quer através da gravidade da estenose (89). Adicionalmente, este *microRNA* foi estudado no âmbito do diagnóstico de EAM após cirurgia de revascularização miocárdica (90). Os autores deste estudo calcularam as *ASC* para o *microRNA-499*, *microRNA-133a* e *cTnI* 6H após cirurgia, tendo obtido os seguintes resultados: *ASC* do *microRNA-499*=0,94 (0,88-0,98), *ASC* do *microRNA-133a*=0,85 (0,77-0,91) e *ASC* de *cTnI*=0,79 (0,70-0,86). Tendo em consideração estes resultados, o *microRNA-499* foi apontado como o melhor biomarcador no diagnóstico de EAM após cirurgia cardíaca.

Relativamente ao valor prognóstico, *Fabiolla et al.* associaram os níveis elevados do *microRNA-499* a um risco duas vezes superior de morte após EAM sem supraST, em indivíduos idosos (91). *Olof et al.* avaliaram a capacidade prognóstica deste *microRNA* tendo concluído que apesar de existir uma correlação entre a elevação dos níveis deste *microRNA* e o *endpoint* primário (morte até 30 dias de internamento), esta correlação é dissipada pela correção com as troponinas. Este estudo conclui, por isso, que relativamente ao valor prognóstico, este *microRNA* não apresenta valor superior ao biomarcador de referência (92).

Outro *microRNA* alvo de investigação diagnóstico é o *microRNA-133*. *Liu et al.* realizaram um estudo de fase IIa, tendo como objetivo a avaliação da acuidade diagnóstica deste *microRNA*, através do cálculo de ASC. Estes investigadores constatarão uma  $ASC=0,91$  e registaram diferença estatística significativa entre os níveis do *microRNA-133* antes e após realização de angioplastia coronária, propondo a utilização deste *microRNA* como biomarcador no diagnóstico do EAM (93). *Ying et al.* realizaram um estudo de fase IIb tendo comparado a eficácia diagnóstica deste *microRNA* com cTnT, tendo concluído que o primeiro não apresenta eficácia diagnóstica superior (94). *Ingo et al.* avaliaram a capacidade prognóstica deste *microRNA*, tendo concluído que apesar de existir uma correlação entre os níveis de *microRNA* e os *endpoints*, este instrumento não adiciona valor aos já existentes. Para além da sua potencial utilização enquanto marcador diagnóstico do EAM, o *microRNA-133* foi também apontado por *Feng et al.* como marcador diagnóstico de doença aterosclerótica coronária e como indicador do grau de estenose coronária. Estes autores calcularam uma ASC para o diagnóstico de doença aterosclerótica de 0,92 (0,88-0,96) (27).

O *microRNA-208* é outro *microRNA* investigado. *Zhijun et al.* observaram níveis deste *microRNA* significativamente diferentes entre os grupos de doentes com EAM, angina instável e indivíduos saudáveis. Além desta diferença estatística significativa, foi constatada uma correlação positiva entre os níveis deste *microRNA* e os níveis de *cTnI*. Estes autores verificaram, também uma relação entre o número de artérias envolvidas e os níveis do *microRNA-208* (95). A diferença estatística significativa foi corroborada por *Xian et al.*. Estes autores elaboraram, adicionalmente, uma meta-análise, cujos resultados indicam uma acuidade diagnóstica superior para os *microRNAs* específicos do miocárdio (*microRNA-208* e *microRNA-499*) (96). *Pin et al.* estabeleceram uma correlação entre os níveis do *microRNA-208* e os *endpoints*, após EAM. Estes autores observaram uma correlação entre os níveis aumentados do *microRNA-208* e a remodelação cardíaca e constataram, também, que os níveis aumentados de *microRNA-208* se encontram associados a um aumento da mortalidade ou a insuficiência cardíaca num período de 6 meses após EAM (97).

A utilização de técnicas de análise exploratória de dados possibilitaram a criação de perfis de *microRNAs* que providenciam maior acuidade diagnóstica (98). *Britta et al.* recorreram a uma abordagem “*whole genome microRNANA*”, tendo-se focado, *a posteriori*, num perfil de 7 *microRNAs*. Estes autores sugerem a utilização de um perfil de 7 *microRNAs* (*microRNA-636*, *microRNA-7-1*, *microRNA-380*, *microRNA-1254*, *microRNA-455-3p*, *microRNA-566*, *microRNA-1291*) para incrementar a acuidade diagnóstica do EAM. Além disso, este estudo revelou, também, dois novos *microRNAs* (*microRNA-1915* e *microRNA-181c*) com potencialidade diagnóstica (98). Para além dos *microRNAs* até agora referidos, existem muitos outros, cujos níveis se apresentam desregulados em doentes com EAM.

Um exemplo é o estudo elaborado por *Hsu et al.*, no qual se constatou níveis de *microRNA-486-3p*, *microRNA-191-5p*, *microRNA-126-3p*, *microRNA-26a-5p* e *microRNA-150-3p* significativamente diferentes da amostra de controlo (99). Outro exemplo é o estudo conduzido por *Huang et al.* que demonstrou a diminuição dos níveis plasmáticos de *microRNA-320* e *microRNA-125* em doentes com EAM (100). *Zhenci et al.* sugerem a utilização de *microRNA-497* como potencial marcador do EAM (25). Outros autores propõem a utilização de outros perfis de *microRNAs* para o diagnóstico de EAM, como é o caso de *Feng et al.*. Estes autores sugerem a utilização dos níveis circulantes de *microRNA-21-5p*, *microRNA-361-5p* e *microRNA-519c-5p* para efetuar o diagnóstico de EAM (85). *Jingyi et al.* estabeleceram um perfil de *microRNAs* capaz de diagnosticar doença coronária (101). A tabela abaixo (tabela 2) discrimina as ASC para alguns dos *microRNAs* até agora analisados na investigação aplicada ao diagnóstico do EAM.

Além da acuidade diagnóstica, alguns *microRNAs* foram avaliados quanto à capacidade discriminadora entre patologias cardíacas. Um exemplo é o diagnóstico diferencial entre Miocardiopatia de *Takotsubo* e EAM. *Milosz et al.* observaram um padrão distinto de quatro *microRNAs* (*microRNA-1*, *microRNA-16*, *microRNA-26a*, *microRNA-133a*) (84). *Yuri et al.* tentaram averiguar a existência de um padrão de *microRNAs* que permitisse distinguir angina estável de angina instável. Tal padrão não foi estabelecido (83). *Chunjian et al.* identificaram um perfil de seis *microRNAs* (*microRNA-1*, *microRNA-134*, *microRNA-186*, *microRNA-208*, *microRNA-223*, *microRNA-499*) que possibilita o diagnóstico diferencial entre angina e EAM (102).

<b>Autor</b>	<b>Ano de Publica.</b>	<b>microRNA</b>	<b>Resultado</b>	<b>Fase de estudo (103)</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>ASC</b>
<i>Li Ming et al.</i> (88)	2014	1	aumentado	IIC	EAM: 56 / C: 26	0,85 (0,81-0,90)
<i>Chunjian et al.</i> (102)	2013	1	aumentado	IIC	EAM: 117 / AP: 182 / C: 100	0,70 (0,60-0,80)
<i>Jing et al.</i> (78)	2009	1	aumentado	IIa	EAM: 93 / C: 60	0,74 (0,71-0,84)
<i>Xian et al.</i> (96)	2015	1	aumentado	IIa	EAM: 70 / C: 72	0,81 (0,74-0,89)
<i>Fucheng et al.</i> (104)	2014	134	aumentado	IIC	EAM: 349 / C: 30	0,82 (0,76-0,88)
<i>Chunjian et al.</i> (102)	2013	134	aumentado	IIC	EAM: 117 / AP: 182 / C: 100	0,66 (0,55-0,76)
<i>Chunjian et al.</i> (102)	2013	186	aumentado	IIC	EAM: 117 / AP: 182 / C: 100	0,72 (0,61-0,82)
<i>Chencheng et al.</i> (105)	2015	191	diminuído	IIa	EAM: 87 / C: 87	0,67 (0,59-0,75)
<i>Chunjian et al.</i> (102)	2013	208	aumentado	IIC	EAM: 117 / AP: 182 / C: 100	0,78 (0,69-0,87)
<i>Xian et al.</i> (96)	2015	208	aumentado	IIa	EAM: 70 / C: 72	0,72 (0,64-0,81)
<i>Chunjian et al.</i> (102)	2013	223	aumentado	IIC	EAM: 117 / AP: 182 / C: 100	0,74 (0,65-0,84)
<i>Fucheng et al.</i> (104)	2014	328	aumentado	IIC	EAM: 349 / C: 30	0,89 (0,84-0,93)
<i>Lizhu et al.</i> (26)	2015	499	aumentado	IIa	EAM: 142 / Sem EAM: 85 / C: 100	0,86 (0,81-0,91)
<i>Youxiu et al.</i> (90)	2014	499	aumentado	IIC	120 indivíduos sujeitos a circulação extracorpórea	0,94 (0,88-0,98)
<i>Chunjian et al.</i>	2013	499	aumentado	IIC	EAM: 117 / AP: 182 / C: 100	0,76 (0,66-0,85)

(102)						
<i>Xian et al.</i> (96)	2015	499	aumentado	IIa	EAM: 70 / C: 72	0,88 (0,83-0,92)
<i>Zhao et al.</i> (106)	2015	499	aumentado	IIc	EAM: 59 / C: 60	0,92 (0,83-1,00)
<i>Suli et al.</i> (107)	2014	125b	diminuído	IIa	EAM: 150 / C:150	0,87 (0,84-0,90)
<i>An et al.</i> (99)	2014	126-3p	diminuído	IIa	EAM: 31 / C: 31	0,69 (0,62-0,76)
<i>Feng et al.</i> (27)	2013	133a	aumentado	IIa	EAM: 13 / AP: 176 / C: 127	0,92 (0,88-0,96)
<i>Youxiu et al.</i> (90)	2014	133a	aumentado	IIc	120 indivíduos sujeitos a circulação extracorpórea	0,85 (0,77-0,91)
<i>An et al.</i> (99)	2014	150-3p	aumentado	IIa	EAM: 31 / C: 31	0,72 (0,65-0,78)
<i>Chencheng et al.</i> (105)	2015	208b	aumentado	IIa	EAM: 87 / C:87	0,67 (0,59-0,76)
<i>Chencheng et al.</i> (105)	2015	26a	diminuído	IIa	EAM: 87 / C: 87	0,75 (0,67-0,82)
<i>Suli et al.</i> (107)	2014	320b	diminuído	IIa	EAM: 150 / C: 150	0,82 (0,83- 0,89)

**Tabela 2** - Níveis, fase de estudo, tamanho das amostras e ASC para diferentes *microRNAs*. Abreviaturas: EAM: Grupo com enfarte agudo do miocárdio; C: grupo controle; AP: grupo com *angina pectoris*; ASC: área sob a curva.

## 9. Discussão e Conclusão

### A. Discussão

Desde a sua descoberta, estas pequenas sequências de nucleótidos suscitaram interesse e geraram muitas questões, nomeadamente, no que diz respeito ao seu papel na fisiopatologia de diversas doenças. Nos últimos dez anos tem-se assistido a um aumento crescente de investigação nesta área, traduzido pelo número de estudos publicados. O conhecimento da biologia dos *microRNAs* e do seu papel na fisiopatologia da doença aterosclerótica coronária e do EAM possibilitou uma melhor interpretação de estudos de diagnóstico. Os *microRNAs* estão associados a vários processos biológicos, que incluem a apoptose, a necrose, a angiogénese, fibrose e a autofagia. Além destas observações, constata-se, ainda, que a ação dos *microRNAs* faz-se quer no sentido da promoção dos processos supramencionados, quer no sentido da inibição dos mesmos. A título de exemplo, atente-se na ação dos *microRNAs* na angiogénese. Os *microRNAs*-206 (41) e *microRNA*-214 (42) despoletam efeitos antiangiogénicos, enquanto o *microRNAs let 7* e o *microRNA*-17-92 medeiam efeitos pró-angiogénicos (5).

No que diz respeito ao envolvimento dos *microRNAs* nas diferentes etapas de desenvolvimento de aterosclerose, verifica-se um evidente envolvimento. Este envolvimento manifesta-se, por exemplo, nas fases iniciais através da acumulação de lipoproteínas e oxidação das mesmas. O *microRNA*-143-3p está associado a um aumento da acumulação de lipoproteínas, através da inibição de *ABCI*, predispondo à oxidação das mesmas. Adicionalmente, o *microRNA*-146a encontra-se associado à inibição da integração de partículas de *LDL* oxidadas pelos macrófagos, inibindo a formação de células espumosas.

O recrutamento leucocitário, observado na patogénese da aterosclerose é também influenciado pela ação dos *microRNAs*, nomeadamente, do *microRNA-126* (5). Para além do envolvimento dos *microRNAs* na patogénese da aterosclerose, verifica-se também, a sua participação no desenvolvimento do EAM. Os fenómenos de necrose observados durante o EAM estão associados à ação de *microRNAs* como o *microRNA-874* e *microRNA-2861*. Para além da necrose de miócitos cardíacos, a apoptose também é regulada pela ação de *microRNAs*, nomeadamente, o *microRNA-499*. Outro exemplo é a ação sinérgica dos *microRNA-1* e *microRNA-21*, cujo resultado final é a inibição da apoptose. Além da sua associação a fenómenos de morte celular, os *microRNAs* encontram-se também relacionados com fenómenos de fibrose. Um exemplo é o *microRNA-208a* que se encontra associado a um aumento da fibrose (59), enquanto o *microRNA-101a* se encontra associado ao efeito contrário (60).

Os estudos de diagnóstico realizados até ao momento são na sua maioria estudos de fase IIa e IIc. Os estudos de fase IIa são dirigidos à avaliação da acuidade diagnóstica do teste índice, enquanto os estudos de fase IIc comparam o teste índice com o teste de referência. Dos estudos de fase IIc até agora realizados apenas um refere uma acuidade diagnóstica superior dos *microRNAs* em relação à dos marcadores de referência (troponinas cardíacas). Importa esclarecer, que o único estudo que atribui maior acuidade diagnóstica aos *microRNAs* foi realizado em indivíduos submetidos a circulação extracorpórea, durante cirurgia cardíaca. Para avaliação da acuidade diagnóstica estes estudos basearam-se no cálculo da sensibilidade, da especificidade e da ASC.



## **B. Conclusão**

Tendo em consideração os mecanismos e os efeitos desenvolvidos pela ação dos *microRNAs* nos processos patológicos que acompanham o EAM, deduz-se que a sua desregulação sirva de substrato científico para o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas. Além do envolvimento dos *microRNAs* na fisiopatologia da doença aterosclerótica coronária e do EAM, as características biológicas e a existência de técnicas laboratoriais que possibilitam a sua deteção permitem considerar estas moléculas como biomarcadores do EAM.

Contudo, quando se compara a velocidade de obtenção de resultados laboratoriais e a acuidade diagnóstica dos *microRNAs* com os marcadores de referência (troponinas cardíacas) verifica-se que as técnicas de deteção dos *microRNAs* são mais demoradas e que a sua acuidade diagnóstica é inferior. Por este motivo, os *microRNAs* não suplantam o papel desempenhado pelas troponinas cardíacas na prática clínica.

## **10. Agradecimentos**

Aproveito este espaço para endereçar uma nota de agradecimento ao Professor Doutor Lino Gonçalves pela ajuda na escolha do tema, pela orientação prestada na elaboração deste trabalho assim como pelo seu olhar crítico. Agradeço, também, à Dra. Liliana Reis por toda a orientação prestada, assim como pela capacidade de resposta face às várias questões que foram surgindo ao longo da elaboração deste trabalho.

## 11. Bibliografia

1. White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. *Lancet*. 2008;372(9638):570–84.
2. Valgimigli M, Germany UL, Germany JM. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* [Internet]. 2015;ehv320. Available from: <http://eurheartj.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehv320>
3. Xiao J, Shen B, Li J, Lv D, Zhao Y, Wang F, et al. Serum microRNA-499 and microRNA-208a as biomarkers of acute myocardial infarction. *Ijcem*. 2014;7(1):136–41.
4. Bronze-da-Rocha E. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 Jan; 2014:985408.
5. Haver VG, Slart RHJA, Zeebregts CJ, Peppelenbosch MP, Tio RA. Rupture of vulnerable atherosclerotic plaques: microRNAs conducting the orchestra? *Trends Cardiovasc Med*. Elsevier Inc.; 2010;20(2):65–71.
6. Sambasivarao S V. *NIH Public Access*. 2013;18(9):1199–216.
7. Kim Y-K. Extracellular microRNAs as Biomarkers in Human Disease. *Chonnam Med J*. 2015;51(2):51–7.
8. The miRBase Sequence Database -- Release 21.
9. Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X. MicroRNA : Function , Detection , and Bioanalysis. *Chemical reviews*. 2013; 113; 6207-6233.
10. Notari M, Pulecio J, Raya Á. Update on the Pathogenic Implications and

- Clinical Potential of microRNAs in Cardiac Disease. Hindawi publishing corporation; 2015;2015.
11. Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Lundqvist CB, Borger MA, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2012;33(20):2569–619.
  12. Agewall S, Giannitsis E, Jernberg T, Katus H. Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease. *Eur Heart J.* 2011;32(4):404–11.
  13. Vogel B, Keller A, Frese KS, Kloos W, Kayvanpour E, Sedaghat-Hamedani F, et al. Refining diagnostic microRNA signatures by whole-miRNome kinetic analysis in acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 2013 Feb;59(2):410–8.
  14. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev.* Elsevier B.V.; 2015;87:3–14.
  15. Tran N, Hutvagner G. Biogenesis and the regulation of the maturation of miRNAs. *Essays Biochem.* 2013;54:17–28.
  16. Starega-Roslan J, Witkos T, Galka-Marciniak P, Krzyzosiak W. Sequence Features of Drosha and Dicer Cleavage Sites Affect the Complexity of IsomiRs. *Int J Mol Sci.* 2015;16:8110–27.
  17. Guo L, Chen F. A challenge for miRNA: Multiple isomiRs in miRNAomics. *Gene.* Elsevier B.V.; 2014;544(1):1–7.
  18. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(12):5003–8.

19. Thomas J, Ohtsuka M, Pichler M, Ling H. MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):28063–76.
20. Dogini DB, Avansini SH, Vieira AS, Lopes-Cendes I. MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy. *Front Cell Neurosci.* 2013;7(October):1–8.
21. Osipova J, Fischer D-C, Dangwal S, Volkmann I, Widera C, Schwarz K, et al. Diabetes-associated microRNAs in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus: a cross-sectional cohort study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(9):E1661–5.
22. Luo M, Li R, Deng X, Ren M, Chen N, Zeng M, et al. Platelet-derived miR-103b as a novel biomarker for the early diagnosis of type 2 diabetes. *Acta Diabetol [Internet]. Springer Milan;* 2015;943–9.
23. Economou EK, Oikonomou E, Siasos G, Papageorgiou N, Tsalamandris S, Mourouzis K, et al. The role of microRNAs in coronary artery disease: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Atherosclerosis. Elsevier Ltd;* 2015;241(2):624–33.
24. Strimbu K, Tavel J a. NIH Public Access. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011;5(6):463–6.
25. Li Z, Lu J, Luo Y, Li S, Chen M. High association between human circulating microRNA-497 and acute myocardial infarction. *ScientificWorldJournal. Hindawi Publishing Corporation;* 2014 Jan;2014:931845.
26. Zhang L, Chen X, Su T, Li H, Huang Q, Wu D, et al. Circulating miR-499 are novel and sensitive biomarker of acute myocardial infarction. *J Thorac Dis.* 2015 Mar [cited 2015 Sep 28];7(3):303–8.

27. Wang F, Long G, Zhao C, Li H, Chaugai S, Wang Y, et al. Plasma microRNA-133a is a new marker for both acute myocardial infarction and underlying coronary artery stenosis. *J Transl Med. Journal of Translational Medicine*; 2013 Jan [cited 2015 Oct 17];11(1):222.
28. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med*. 2014;18(3):371–90.
29. Wang K, Yuan Y, Cho J-H, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA Spectrum between Serum and Plasma. *PLoS One*. 2012;7(7):e41561.
30. Gallo A, Alevizos I. *Circulating MicroRNAs*. Springer. 2013;1024:183–90.
31. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of Cellular miRNAs on Circulating miRNA Biomarker Signatures. *PLoS One*. 2011;6(6):14.
32. Deddens JC, Colijn JM, Oerlemans MIFJ, Pasterkamp G, Chamuleau S a, Doevendans P a, et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for the early diagnosis of acute coronary syndrome. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013 Dec;6(6):884–98.
33. Virmani R. Atherosclerotic Plaque Progression and Vulnerability to Rupture: Angiogenesis as a Source of Intraplaque Hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2054–61.
34. Braunwald E, Mann D, Zipes D, Peter L, Bonow R. *Braunwald's Heart Disease*. 10th ed. Elsevier Saunders; 2015.

35. Foley K, Young P. *ce pte d Ma rip ce pte d*. 2013;3.
36. Hu Y-W, Hu Y-R, Zhao J-Y, Li S-F, Ma X, Wu S-G, et al. An Agomir of miR-144-3p Accelerates Plaque Formation through Impairing Reverse Cholesterol Transport and Promoting Pro-Inflammatory Cytokine Production. *PLoS One*. 2014;9(4):e94997.
37. Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, et al. MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies*; 2011;585(6):854–60.
38. Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun. Elsevier Inc.*; 2010;393(4):643–8.
39. Tang Y, Zhang Y, Chen Y, Xiang Y, Shen C, Li Y. The role of miR-19b in the inhibition of endothelial cell apoptosis and its relationship with coronary artery disease. *Sci Rep. Nature Publishing Group*; 2015;5(February):15132.
40. Xu Z, Han Y, Liu J, Jiang F, Hu H, Wang Y, et al. MiR-135b-5p and MiR-499a-3p Promote Cell Proliferation and Migration in Atherosclerosis by Directly Targeting MEF2C. *Sci Rep*. 2015;5(July):12276.
41. Tang Y, Zhang Y, Chen Y, Xiang Y, Xie Y. Role of the microRNA, miR-206, and its target PIK3C2 $\alpha$  in endothelial progenitor cell function - potential link with coronary artery disease. *FEBS J*. 2015;282(19):3758–72.
42. Jin Y, Yang C-J, Xu X, Cao J-N, Feng Q-T, Yang J. MiR-214 regulates the pathogenesis of patients with coronary artery disease by targeting VEGF. *Mol*

- Cell Biochem. 2015;402(1-2):111–22.
43. Hao L, Wang XG, Cheng JD, You SZ, Ma SH, Zhong X, et al. The up-regulation of endothelin-1 and down-regulation of miRNA-125a-5p, -155, and -199a/b-3p in human atherosclerotic coronary artery. *Cardiovasc Pathol*. Elsevier Inc.; 2014;23(4):217–23.
  44. Wang K, Long B, Li N, Li L, Liu C-Y, Dong Y-H, et al. MicroRNA-2861 regulates programmed necrosis in cardiomyocyte by impairing adenine nucleotide translocase 1 expression. *Free Radic Biol Med*. 2016;91:58–67.
  45. Wang K, Liu F, Zhou L-Y, Ding S-L, Long B, Liu C-Y, et al. miR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. *Cell Death Dis*. 2013;4:e709.
  46. Wang J, Jia Z, Zhang C, Sun M, Wang W, Chen P, et al. miR-499 protects cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via its effects on Pcdcd4 and Pacs2. *RNA Biol*. 2014;11(4):1–12.
  47. Xu Y, Zhu W, Wang Z, Yuan W, Sun Y, Liu H, et al. Combinatorial MicroRNAs Suppress Hypoxia-Induced Cardiomyocytes Apoptosis. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(3):921–32.
  48. Yang Q, Yang K, Li A. microRNA-21 protects against ischemia-reperfusion and hypoxia-reperfusion-induced cardiocyte apoptosis via the phosphatase and tensin homolog/Akt-dependent mechanism. *Mol Med Rep*. 2014;9(6):2213–20.
  49. Tu Y, Wan L, Fan Y, Wang K, Bu L, Huang T, et al. Ischemic Postconditioning-Mediated miRNA-21 Protects against Cardiac ischemia/reperfusion Injury via PTEN/Akt Pathway. *PLoS One*. 2013;8(10):1–



- 14.
50. Ding S-L, Wang J-X, Jiao J-Q, Tu X, Wang Q, Liu F, et al. A pre-microRNA-149 (miR-149) genetic variation affects miR-149 maturation and its ability to regulate the Puma protein in apoptosis. *J Biol Chem*. 2013;288(37):26865–77.
51. Bo L, Su-Ling D, Fang L, Lu-Yu Z, Tao a, Stefan D, et al. Autophagic program is regulated by miR-325. *Cell Death Differ*. 2014;21(6):967–77.
52. Eisenhardt SU, Weiss JBW, Smolka C, Maxeiner J, Pankratz F, Bemtgen X, et al. MicroRNA-155 aggravates ischemia–reperfusion injury by modulation of inflammatory cell recruitment and the respiratory oxidative burst. *Basic Res Cardiol*. Springer Berlin Heidelberg; 2015;110(3).
53. Liu Z, Ye P, Wang S, Wu J, Sun Y, Zhang a., et al. MicroRNA-150 Protects the Heart From Injury by Inhibiting Monocyte Accumulation in a Mouse Model of Acute Myocardial Infarction. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;8(1):11–20.
54. Wen Z, Huang W, Feng Y, Cai W, Wang Y, Wang X, et al. MicroRNA-377 Regulates Mesenchymal Stem Cell-Induced Angiogenesis in Ischemic Hearts by Targeting VEGF. *PLoS One*. 2014;9(9):e104666.
55. Icli B, Wara AKM, Moslehi J, Sun X, Plovie E, Cahill M, et al. NIH Public Access. 2014;113(11):1231–41.
56. Bellera N, Barba I, Rodriguez-Sinovas A, Ferret E, Asin MA, Gonzalez-Alujas M, et al. Single Intracoronary Injection of Encapsulated Antagomir-92a Promotes Angiogenesis and Prevents Adverse Infarct Remodeling. *J Am Heart Assoc [Internet]*. 2014;3(5):e000946–e000946.

57. Hinkel R, Penzkofer D, Zühlke S, Fischer A, Husada W, Xu Q, et al. Inhibition of MicroRNA-92a Protects Against Ischemia / Reperfusion Injury in a Large-Animal Model. 2013;1066–75.
58. Wang Y-S, Li S-H, Guo J, Mihic A, Wu J, Sun L, et al. Role of miR-145 in cardiac myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;66:94–105.
59. Shyu K-G, Wang B-W, Cheng W-P, Lo H-M. MicroRNA-208a increases myocardial endoglin expression and myocardial fibrosis in acute myocardial infarction. *Can J Cardiol*. Canadian Cardiovascular Society; 2014;31(5):679–90.
60. Zhao X, Wang K, Liao Y, Zeng Q, Li Y, Hu F, et al. MicroRNA-101a inhibits cardiac fibrosis induced by hypoxia via targeting TGFbetaRI on cardiac fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(1):213–26.
61. Li X, Wang B, Cui H. Let-7E Replacement Yields Potent Anti-Arrhythmic Efficacy Via Targeting Beta 1-Adrenergic Receptor in Rat Heart. *J. Cell Mol*. 2014;18(7):1334–43.
62. Zhang Y, Wang R, Du W, Wang S, Yang L, Pan Z, et al. Downregulation of miR-151-5p contributes to increased susceptibility to arrhythmogenesis during myocardial infarction with estrogen deprivation. *PLoS One*. 2013;8(9):1–10.
63. Li YG, Zhang PP, Jiao KL, Zou YZ. Knockdown of microRNA-181 by lentivirus mediated siRNA expression vector decreases the arrhythmogenic effect of skeletal myoblast transplantation in rat with myocardial infarction. *Microvasc Res*. Elsevier Inc.; 2009;78(3):393–404.
64. Lu Y, Zhang Y, Shan H, Pan Z, Li X, Li B, et al. MicroRNA-1 downregulation

- by propranolol in a rat model of myocardial infarction: a new mechanism for ischaemic cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2009 Dec 1;84(3):434–41.
65. Lu C, Wang X, Ha T, Hu Y, Liu L, Zhang X, et al. Attenuation of cardiac dysfunction and remodeling of myocardial infarction by microRNA-130a are mediated by suppression of PTEN and activation of PI3K dependent signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89:87–97.
66. Li J, Li Y, Jiao J, Wang J, Li Y, Qin D, et al. Mitofusin 1 is Negatively Regulated by miR-140 in Cardiomyocyte Apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2014;34(10):1788–99.
67. Wang X, Ha T, Zou J, Ren D, Liu L, Zhang X, et al. MicroRNA-125b protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via targeting p53-mediated apoptotic signalling and TRAF6. *Cardiovasc Res.* 2014;102(3):385–95.
68. Feng Y, Huang W, Wani M, Yu X, Ashraf M. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22. *PLoS One.* 2014;9(2):1–8.
69. Wang L, Qian L. miR-24 regulates intrinsic apoptosis pathway in mouse cardiomyocytes. *PLoS One.* 2014;9(1):e85389.
70. Long B, Wang K, Li N, Murtaza I, Xiao J-Y, Fan Y-Y, et al. miR-761 regulates the mitochondrial network by targeting mitochondrial fission factor. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:371–9.
71. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 2008;105(35):13027–32.
72. Kim HW, Haider HK, Jiang S, Ashraf M. Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2. *J Biol Chem*. 2009;284(48):33161–8.
  73. Izarra A, Moscoso I, Levent E, Canon S, Cerrada I, Diez-Juan A, et al. MiR-133a enhances the protective capacity of cardiac progenitors cells after myocardial infarction. *Stem Cell Reports*. 2014;3 :1029–42.
  74. Shen Y, Shen Z, Miao L, Xin X, Lin S, Zhu Y, et al. miRNA-30 Family Inhibition Protects Against Cardiac Ischemic Injury by Regulating Cystathionine- $\gamma$ -Lyase Expression. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(3):224–40.
  75. Wei C, Li L, Gupta S. NF- $\kappa$ B-mediated miR-30b regulation in cardiomyocytes cell death by targeting Bcl-2. *Mol Cell Biochem*. 2014;387(1-2):135–41.
  76. Mao J, Lv Z, Zhuang Y. MicroRNA-23a is involved in tumor necrosis factor- $\alpha$  induced apoptosis in mesenchymal stem cells and myocardial infarction. *Exp Mol Pathol*. Elsevier B.V.; 2014;97(1):23–30.
  77. Long G, Wang F, Duan Q, Chen F, Yang S, Gong W, et al. Human circulating microRNA-1 and microRNA-126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction. *Int J Biol Sci*. 2012 Jan;8(6):811–8.
  78. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. Elsevier Inc.; 2010 Jan 1;391(1):73–7.
  79. Bostjancic E, Zidar N, Glavac D. MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction. *Dis Markers*. 2009 Jan [cited 2015 Oct

- 27];27(6):255–68.
80. Shi B, Guo Y, Wang J, Gao W. Altered expression of microRNAs in the myocardium of rats with acute myocardial infarction. 2010;
  81. Dong S, Cheng Y, Yang J, Li J, Liu X, Wang X, et al. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biol Chem*. 2009 Oct 23 [cited 2015 Oct 27];284(43):29514–25.
  82. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Dec;3(6):499–506.
  83. D’Alessandra Y, Carena MC, Spazzafumo L, Martinelli F, Bassetti B, Devanna P, et al. Diagnostic potential of plasmatic MicroRNA signatures in stable and unstable angina. *PLoS One*. 2013 Jan;8(11):e80345.
  84. Jaguszewski M, Osipova J, Ghadri J-R, Napp LC, Widera C, Franke J, et al. A signature of circulating microRNAs differentiates takotsubo cardiomyopathy from acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2014 Apr;35(15):999–1006.
  85. Wang F, Long G, Zhao C, Li H, Chaugai S, Wang Y, et al. Atherosclerosis-related circulating miRNAs as novel and sensitive predictors for acute myocardial infarction. *PLoS One*. 2014 Jan;9(9):e105734.
  86. Zidar N. Original Article MicroRNA miR-1 is Up-regulated in Remote Myocardium in Patients with Myocardial Infarction. 2010;31:27–31.
  87. Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, Göteborg M, Erlinge D. Cardiospecific microRNA Plasma Levels Correlate with Troponin and Cardiac Function in Patients with ST Elevation Myocardial Infarction, Are Selectively Dependent

- on Renal Elimination, and Can Be Detected in Urine Samples. *Cardiology*. 2011;118(4):217–26.
88. Li L, Cai W, Ye Q, Liu J, Li X, Liao X. Comparison of plasma microRNA-1 and cardiac troponin T in early diagnosis of patients with acute myocardial infarction. *J Cell. Mol.* 2014;5(3):182–6.
89. Chen X, Zhang L, Su T, Li H, Huang Q, Wu D, et al. Kinetics of plasma microRNA-499 expression in acute myocardial infarction. 2015;7(5):890–6.
90. Yao Y, Du J, Cao X, Wang Y, Huang Y, Hu S, et al. Plasma levels of microRNA-499 provide an early indication of perioperative myocardial infarction in coronary artery bypass graft patients. *PLoS One*. 2014 Jan [cited 2015 Aug 20];9(8):e104618.
91. Olivieri F, Antonicelli R, Spazzafumo L, Santini G, Rita M, Galeazzi R, et al. Admission levels of circulating miR-499-5p and risk of death in elderly patients after acute non-ST elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol.* Elsevier Ireland Ltd; 2014;172(2):e276–8.
92. Gidlöf O, Smith JG, Miyazu K, Gilje P, Spencer A, Blomquist S, et al. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord.* 2013;13:12.
93. Peng L, Chun-guang Q, Bei-fang L, Xue-zhi D, Zi-hao W, Yun-fu L, et al. Clinical impact of circulating miR-133, miR-1291 and miR-663b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *Diagn Pathol.* 2014;9(1):89.
94. Li Y, Zhang M, Wen H, Hu C, Liu R, Wei H, et al. Comparing the diagnostic

- values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. *Clinics*. 2013;68(1):75–80.
95. Han Z, Zhang L, Yuan L, Liu X, Chen X, Ye X, et al. Change of plasma microRNA-208 level in acute myocardial infarction patients and its clinical significance. 2015;3(20):1–5.
96. Liu X, Fan Z, Zhao T, Cao W, Zhang L, Li H, et al. Plasma miR-1, miR-208, miR-499 as potential predictive biomarkers for acute myocardial infarction: An independent study of Han population. *Exp Gerontol*. 2015;72:230–8.
97. Lv P, Zhou M, He J, Meng W, Ma X, Dong S, et al. Circulating miR-208b and miR-34a are associated with left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):5774–88.
98. Vogel B, Keller A, Frese KS, Kloos W, Kayvanpour E, Sedaghat-Hamedani F, et al. Refining diagnostic microRNA signatures by whole-miRNome kinetic analysis in acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 2013 Feb;59(2):410–8.
99. Hsu A, Chen S-J, Chang Y-S, Chen H-C, Chu P-H. Systemic approach to identify serum microRNAs as potential biomarkers for acute myocardial infarction. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2014 Jan;2014:418628.
100. Huang S, Chen M, Li L, He M, Hu D, Zhang X, et al. Circulating MicroRNAs and the occurrence of acute myocardial infarction in Chinese populations. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014 Apr [cited 2015 Aug 24];7(2):189–98.
101. Ren J, Zhang J, Xu N, Han G, Geng Q, Song J, et al. Signature of circulating microRNAs as potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease.

- PLoS One. 2013 Jan;8(12):e80738.
102. Li C, Fang Z, Jiang T, Zhang Q, Liu C, Zhang C, et al. Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris. *BMC medical genomics*; 2013;
  103. Colli A, Fraquelli M, Casazza G, Conte D, Nikolova D, Duca P, et al. The architecture of diagnostic research: from bench to bedside--research guidelines using liver stiffness as an example. *Hepatology*. 2014;60(1):408–18.
  104. He F, Lv P, Zhao X, Wang X, Ma X, Meng W, et al. Predictive value of circulating miR-328 and miR-134 for acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 2014 Sep;394(1-2):137–44.
  105. Li C, Chen X, Huang J, Sun Q, Wang L. Clinical impact of circulating miR-26a, miR-191, and miR-208b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *Eur J Med Res. European Journal of Medical Research*; 2015;20(1):58.
  106. Zhao CH, Cheng GC, He RL, Hong Y, Wan QL, Wang ZZ, et al. Analysis and clinical significance of microRNA-499 expression levels in serum of patients with acute myocardial infarction. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):4027–34.
  107. Huang S, Chen M, Li L, He M, Hu D, Zhang X, et al. Circulating MicroRNAs and the occurrence of acute myocardial infarction in Chinese populations. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014 Apr;7(2):189–98.
  108. Ahmed KA, Muniandy S, Ismail IS. N(epsilon)-(Carboxymethyl)lysine and Coronary Atherosclerosis-Associated Low Density Lipoprotein Abnormalities in Type 2 Diabetes: Current Status. *J Clin Biochem Nutr*. 2009;44(1):14–27.



