

TESIS DOCTORAL

**Estudios de expresión génica en la muerte
súbita cardíaca de origen isquémico en tejido
miocárdico, sangre y líquido pericárdico**



Departamento de Medicina Legal, Toxicología y
Antropología Física
Universidad de Granada

Lucas González Herrera
Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Lucas González Herrera
D.L.: GR 1870-2014
ISBN: 978-84-9083-054-3



Universidad de Granada

Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física

**Estudios de expresión génica en la muerte súbita cardiaca
de origen isquémico en tejido miocárdico, sangre y
líquido pericárdico**

Memoria de TESIS DOCTORAL realizada bajo la dirección de los Doctores Enrique Villanueva Cañadas, Catedrático Emérito de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Granada, y Aurora Valenzuela Garach y José Antonio Lorente Acosta, Catedráticos de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Granada, presentada por el licenciado Lucas González Herrera para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Granada.

Granada, 24 de enero de 2014.

Fdo.: Lucas González Herrera

Vº Bº Directores de Tesis

Fdo.: Dr. Enrique Villanueva Cañadas

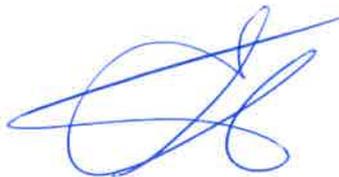
Fdo.: Dra. Aurora Valenzuela Garach

Fdo.: Dr. José Antonio Lorente Acosta

El doctorando, Lucas González Herrera, y los directores de la tesis D. Enrique Villanueva Cañadas, D^a. Aurora Valenzuela Garach y D. José Antonio Lorente Acosta, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 24 de enero de 2014

Doctorando

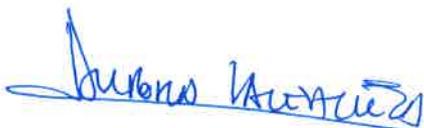


Fdo.: Lucas González Herrera

Directores de Tesis



Fdo.: Dr. Enrique Villanueva Cañadas



Fdo.: Dra. Aurora Valenzuela Garach



Fdo.: Dr. José Antonio Lorente Acosta

La presente Tesis Doctoral está avalada hasta la fecha de su lectura por el artículo:

Gonzalez-Herrera L, Valenzuela A, Marchal J.A., Lorente J.A., Villanueva E.
Studies on RNA integrity and gene expression in human myocardial tissue,
pericardial fluid and blood, and its postmortem stability. *Forensic Science
International* 232 (2013) 218–228

DOI: 10.1016/j.forsciint.2013.08.001

Esta Tesis Doctoral ha sido subvencionada por el Consorcio para la Excelencia en Investigación Forense en Andalucía (CEIFA), en el que participan la Junta de Andalucía y Universidad de Granada, dentro del Proyecto “Diagnóstico bioquímico y molecular de la lesión miocárdica precoz en la muerte súbita cardíaca”, del cual el Investigador Responsable es el Profesor Enrique Villanueva Cañadas,

**QUE SE LIBRE A MIS
RESTOS DE UNA
SACRILEGA AUTOPSIA; QUE
SE AHORREN DE BUSCAR
EN MI HELADO CEREBRO Y
EN MI APAGADO CORAZÓN
EL MISTERIO DE MI SER. LA
MUERTE NO REVELA LOS
SECRETOS DE LA VIDA.
Chateaubriand. Memorias**

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	9
1. LA MUERTE SÚBITA	11
1.1 Concepto de muerte súbita	11
1.2 Aspectos médico-legales de la muerte súbita	12
1.2.1 Conceptos de muerte natural, muerte violenta y muerte sospechosa de criminalidad	12
1.2.2 Problemas médico-legales de la muerte súbita	13
1.2.3 Estudio médico-legal de la muerte súbita	14
1.3 Etiología y epidemiología de la muerte súbita	15
2. LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA	17
2.1 Epidemiología de la muerte súbita cardíaca	17
2.2 Etiología de la muerte súbita cardíaca	18
2.3 Fisiopatología de la muerte súbita cardíaca	19
2.4 Factores de riesgo de la muerte súbita cardíaca	20
2.5 Estudio médico-legal de la muerte súbita cardíaca	21
3. LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA DE ORIGEN ISQUÉMICO	31
3.1 La cardiopatía isquémica	31
3.1.1 Concepto de cardiopatía isquémica	31
3.1.2 Epidemiología de la cardiopatía isquémica	31

3.1.3 Factores de riesgo de la cardiopatía isquémica	32
3.1.4 Etiopatogenia de cardiopatía isquémica	32
3.1.5 Clasificación de la cardiopatía isquémica	35
3.1.6 Fisiopatología de la isquemia miocárdica y del infarto agudo de miocardio	36
3.1.7 Diagnóstico bioquímico del infarto agudo de miocardio	41
3.2 Epidemiología de la muerte súbita cardíaca de origen isquémico	43
3.3 Factores de riesgo de la muerte súbita cardíaca de origen isquémico	44
3.4 Fisiopatología de la muerte súbita cardíaca de origen isquémico	45
3.5 Diagnóstico postmortem de la cardiopatía isquémica y del infarto agudo de miocardio	49
3.5.1 Métodos morfológicos	50
3.5.2 Métodos histoquímicos	54
3.5.3 Métodos inmunohistoquímicos	55
3.5.4 Métodos bioquímicos	59
3.5.5 Métodos moleculares	64

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	73
III. MATERIAL Y MÉTODOS	79
1. MUESTRAS	81
2. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA	85
2.1 Extracción de ARNm	85
2.2 Determinación de la cantidad, calidad e integridad de ARNm	86
2.3 Síntesis de ADNc y PCR cuantitativa en tiempo real	87
3. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS	91
4. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS	92
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	93
IV. RESULTADOS	95
1. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA	97
1.1 Cantidad, calidad e integridad postmortem del ARNm en tejido cardíaco, sangre y líquido pericárdico	97
1.2 Expresión génica: aspectos generales	102
1.2.1 Selección del gen endógeno o gen de referencia	102
1.2.2 Expresión génica: Influencia del rendimiento, la calidad y la integridad del ARNm. Influencia de la data de la muerte, el sexo, y la edad.	106

1.2.3	Expresión génica. Comparación de resultados entre muestras de tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico.	111
1.3	Expresión génica y causas de muerte	113
2.	ESTUDIOS BIOQUÍMICOS: TROPONINA T CARDÍACA ULTRASENSIBLE (CTNTHS) EN SANGRE Y LÍQUIDO PERICÁRDICO	120
3.	EXPRESIÓN GÉNICA Y ESTUDIOS BIOQUÍMICOS: ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE ELLOS	124
V.	DISCUSIÓN	125
1.	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA	127
1.1	Cantidad, calidad e integridad postmortem de ARNm, en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico	127
1.2	Expresión génica: Aspectos generales	138
1.2.1	Selección del gen endógeno o gen de referencia	138
1.2.2	Expresión génica. Influencia del rendimiento, la calidad y la integridad del ARNm. Influencia de la data de la muerte, el sexo y la edad.	141
1.2.3	Expresión génica. Comparación de resultados entre muestras de tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico.	146
1.3	Expresión génica y causas de muerte	150
2.	ESTUDIOS BIOQUÍMICOS: TROPONINA T CARDÍACA ULTRASENSIBLE (CTNTHS) EN SANGRE Y LÍQUIDO PERICÁRDICO	165

3. EXPRESIÓN GÉNICA Y ESTUDIOS BIOQUÍMICOS: ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE ELLOS	173
4. VALORACIÓN FISIOPATOLÓGICA DEL MECANISMO DE LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA ISQUÉMICA CON Y SIN INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EN CASOS INDIVIDUALES	174
VI. CONCLUSIONES	183
VII. BIBLIOGRAFÍA	189

I. INTRODUCCIÓN

1. La muerte súbita

1.1 Concepto de muerte súbita

La muerte súbita (MS) está definida por tres criterios fundamentales: su etiología **natural**, la **rapidez** con que se presenta, y el carácter **inesperado** de la misma. De este modo, siempre, para poder hablar de MS esta debe ser consecuencia de un proceso morboso de causa natural, quedando por tanto excluidas las muertes violentas [1-4].

Para que una muerte sea considerada una MS, además de ser de causa natural, debe producirse rápidamente, esto quiere decir que el tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y el momento de la muerte ha de ser corto. Sobre cuál debe ser la duración de este intervalo, no existe un acuerdo unánime, aunque en la actualidad el lapso de tiempo considerado más adecuado es el de 1 hora [1, 2, 4-18]. Otros autores como Virmani *et al* amplían el plazo hasta las 6 horas [19]. La OMS define la MS con un criterio más amplio, como la que ocurre dentro de las primeras 24 horas desde el comienzo de los síntomas [2, 11, 18]. Fijar un intervalo de tiempo dentro de las primeras 24 horas tras el inicio de los síntomas resulta más práctico, ya que en este periodo se ponen en evidencia los cambios bioquímicos, fisiológicos, morfológicos (macro y microscópicos) que conducen a un daño celular irreversible que pone fin a la vida del paciente. En cuanto a en qué momento se debe considerar el inicio de los síntomas, lo aceptado es que será en el instante en que estos impidan al individuo continuar con su vida normal, en caso contrario se considerarían pródromos [1, 13].

El carácter inesperado que toda MS debe tener para poder ser considerada como tal, se basa en que ésta acontece sobre una persona sana, o sobre un enfermo cuya gravedad no hacía pensar en que esa persona pudiese fallecer en ese momento, siendo, por tanto, una muerte totalmente imprevista [1, 2, 4].

Especial consideración tienen las muertes inesperadas y no presenciadas, en las que no se puede precisar el momento exacto en que se produjo la muerte.

Podremos clasificar este tipo de muertes como MS siempre y cuando el fallecido haya sido visto con vida, y en situación estable, en un periodo de tiempo menor o igual a 24 horas antes de haberlo hallado muerto [2, 4, 7-9, 11, 14, 17].

El concepto de MS debe diferenciarse del de muerte repentina, la cual se caracteriza por producirse también de manera muy rápida, pero acontece en una persona con antecedentes patológicos que explican esa muerte [2].

1.2 Aspectos médico-legales de la muerte súbita

1.2.1 Conceptos de muerte natural, muerte violenta y muerte sospechosa de criminalidad

Una muerte natural es aquella que tiene un origen interno, siendo esta el resultado de un proceso morboso intrínseco, en el que por tanto no han participado fuerzas externas ajenas al propio organismo. Por ello en este tipo de muertes no puede existir responsabilidad por parte de terceras personas. Con el Certificado Médico de Defunción (CMD) se llevará a cabo la inscripción en el Registro Civil de la persona fallecida de forma natural, permitiendo la inhumación del cadáver, previa autorización de Juez del Registro Civil [20].

La muerte violenta se define como aquella que tiene un origen externo, en ella existe una participación de fuerzas externas ajenas al propio organismo, que han podido ser puestas en marcha por una tercera persona, que por tanto puede ser responsable de la muerte. Según el origen de esa fuerza externa, una muerte violenta puede ser accidental, homicida o suicida.

La muerte sospechosa de criminalidad es aquella muerte en la que, por la existencia de algún indicio, *a priori* no se puede descartar el origen criminal de la misma. La Ley de Enjuiciamiento Criminal dispone, en los artículos 340 y 343 [21], que en los casos de muerte violenta o muerte sospechosa de criminalidad se deberá practicar una autopsia médico-legal, una vez esta sea ordenada por el Juez del Juzgado de Instrucción correspondiente.

1.2.2 Problemas médico-legales de la muerte súbita

Desde la perspectiva médico-legal en la MS, en primer lugar, debemos considerar los problemas que esta plantea en relación a la emisión del CMD. Teniendo en cuenta el parámetro cronológico que define a la MS, la rapidez con que se presenta la muerte desde que se inician los síntomas es crucial. Cuanto mayor sea el lapso de tiempo, mayor probabilidad existirá de alcanzar algún diagnóstico, por tanto de que conozcamos la causa de la muerte, y de que podamos disponer de un CMD, al poderse clasificar la muerte como natural. Por otro lado la MS constituye un problema para el médico asistencial, cuando en ocasiones se le plantea tomar la decisión de emitir o no un CMD. Cuando se trata del médico que habitualmente atendía al fallecido, este puede, en numerosas ocasiones, y a partir de una historia clínica ya conocida, precisar cuál ha sido la causa de la muerte y emitir un CMD, aunque se encuentre ante una MS. El problema se plantea cuando, aunque sea el médico habitual, este no había visitado el fallecido recientemente, y no digamos si se trata de cualquier otro médico. De igual modo el médico debe tener especial cuidado con la certificación de complacencia, que puede ocultar una muerte con implicaciones judiciales.

En la determinación de la causa de la muerte la MS plantea con frecuencia problemas en la diferenciación con las muertes violentas, como es el caso de una muerte que se produce en el contexto de un accidente (de tráfico, laboral) y que realmente tiene su origen en una causa natural como puede ser fallo cardíaco súbito, siendo primero la muerte y luego el accidente [22, 23]. En estos casos será fundamental determinar la causa de la muerte, y ésta tendrá una importante trascendencia médico-legal, por ejemplo en relación a seguros de vida, laborales, o de vehículos.

La MS es considerada el ejemplo característico de muerte sospechosa de criminalidad, porque debido a su rápida presentación, y sobre todo por su carácter inesperado, no permite que se conozca la causa de la muerte, no pudiéndose descartar por tanto el origen violento o criminal de la misma, debiéndose practicar, como establece la ley en estos casos, una autopsia médico-legal. De este

modo, siempre, ante una MS se deberá practicar autopsia judicial, a pesar de que por definición una MS para ser considerada como tal, ha de ser de origen natural, aspecto que no se conocerá hasta que no se descubra la causa de la muerte. Por tanto no se podrá clasificar una muerte como súbita hasta que haya finalizado el estudio médico-legal de la misma.

1.2.3 Estudio médico-legal de la muerte súbita

Como ya hemos considerado, la MS se estudia en el ámbito médico-legal por su carácter sospechoso de criminalidad, por la imposibilidad de deducción lógica de la causa de la muerte debido a una falta de antecedentes personales. De este modo, prácticamente todos los casos de MS son finalmente objeto de estudio médico-legal, siendo el objetivo principal la determinación de la causa de la muerte por medio de la autopsia, siempre entendida en un sentido amplio, comenzando en el lugar de los hechos, e incluyendo todos los exámenes complementarios. La primera fase de la autopsia es el levantamiento del cadáver, momento en el que se puede obtener información de gran relevancia [8], como si la muerte fue presenciada o no, síntomas previos al fallecimiento, circunstancias perimortem (como el estrés o el ejercicio físico) y, junto con todo esto, antecedentes, tanto familiares como personales. En este sentido será de gran interés conocer la presencia de factores de riesgo cardiovascular, padecimiento de enfermedades cardiovasculares, o no cardiovasculares (asma, epilepsia, diabetes), tratamiento habitual y hábitos tóxicos. Junto con esto, y una vez explorado el cadáver, realizar una entrevista con familiares, allegados, y otras personas que presenciaron la muerte puede aportar mucha información, que podemos completar al revisar toda la documentación clínica disponible. La gran dificultad para obtener información clínica previa, es una de las causas que ha llevado a un aumento del número de autopsias médico-legales en casos de muerte natural, pudiendo alcanzar en cifras el 35% de las autopsias realizadas en un Instituto de Medicina Legal [1], siendo siempre muertes sospechosas de poder tener un origen no natural, en muchas ocasiones por falta de información.

El siguiente paso en el estudio de la MS será la autopsia propiamente dicha. Ésta se llevará a cabo siguiendo las recomendaciones de la Unión Europea para la armonización metodológica de las autopsias médico-legales [4, 24]. Aunque la técnica para la práctica de la autopsia médico-legal en los casos de MS será explicada más adelante, en este punto debemos considerar que este procedimiento debe ser siempre lo más minucioso posible, incluyendo un examen externo completo y detallado, estudio macroscópico de todas las vísceras, y exhaustivo del corazón, y la realización de una amplia batería de pruebas complementarias, que incluyen el estudio histopatológico del corazón y otros órganos, y estudio toxicológico.

Una vez que finaliza el estudio médico-legal la MS se puede clasificar como [1, 2]:

- MS Lesional: cuando existe un hallazgo macroscópico, histopatológico o bioquímico suficiente para explicar la muerte.
- MS Funcional con substrato patológico: Cuando se detectan alteraciones que podrían explicar la muerte, pero que no son incompatibles con la vida.
- MS Funcional: Cuando aparecen hallazgos inespecíficos que en modo alguno explican la causa por la que la persona ha fallecido. Se tratan de *autopsias negativas o autopsias blancas*.

1.3 Etiología y epidemiología de la muerte súbita

Multitud de causas pueden ser origen de una MS, sin embargo más del 90% de todas las MS son de origen cardiaco [2, 5, 12-14, 18, 25], por ello hablar de MS es casi sinónimo de hablar de Muerte Súbita Cardíaca (MSC), a la que haremos referencia específicamente en el siguiente capítulo. Como causas de muerte súbita no cardiaca, destacar, entre las enfermedades pulmonares, el embolismo pulmonar y el asma, y entre las patologías cerebrales la hemorragia cerebral (subaracnoidea e intraparenquimatosa) y la epilepsia. Considerar que en un 5% de los casos de muertes rápidas e inesperadas, tras finalizar el estudio médico-legal completo no

es posible determinar la causa de la muerte, y si se trata de menores de 35 años este porcentaje sube al 20-30% de los casos [17, 26, 27].

Al representar la MSC el 90% de los casos de MS, nos encontramos, cuando se investiga la MS, que su epidemiología es realmente la de la MSC, ocurriendo lo mismo cuando estudiamos los factores de riesgo de MS. En este punto cabe destacar una serie de datos epidemiológicos generales para la MS, como es que, en nuestro medio, aproximadamente en torno a un 15% de todas las muertes naturales ocurren de forma súbita [2, 5, 13, 25, 28], que la incidencia de MS aumenta gradualmente con la edad, y de forma muy significativa a partir de los 35-40 años [7, 15], y que los individuos que sobreviven a una MS presentan una alta tasa de recurrencia, entre el 45 y el 65%, en los 2 años siguientes [29].

2. La muerte súbita cardíaca

2.1 Epidemiología de la muerte súbita cardíaca

A pesar de los importantes y recientes avances en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares en general, y de las arritmias en particular, la MSC sigue siendo en la actualidad un importante problema para el médico, para la medicina legal y para la salud pública. Se estima que la incidencia anual de MSC en todo el mundo oscila entre los 4 y 5 millones de casos al año. En Estados Unidos la incidencia anual se encuentra entre 180.000 y 450.000 casos, aproximadamente el 0.1-2% de la población fallece por MSC [5, 11, 13, 14, 17, 26, 30-32]. Por número de habitantes, en Norte América y en el norte de Europa la incidencia de MSC es de 20-40/100.000 habitantes, con una incidencia global de 1-2/1000 habitantes/año. Sin embargo algunos estudios han descrito una menor incidencia de MSC en países del sur de Europa [2-4, 15, 25, 33]. Particularmente España tiene una incidencia de MSC de las más bajas de los países industrializados, lo que se ha asociado a los hábitos alimenticios asociados a la cultura mediterránea [13, 25]. En España fallecen por MSC unas 30.000 personas al año, unas 10 veces más que los fallecidos por accidente de tráfico [6]. Si acotamos entre los 25 y 74 años estaríamos hablando de casi 10.000 fallecidos por MSC en España al año [13].

En relación a la edad, la incidencia de MSC aumenta con la edad, existiendo un pico entre los 45 y los 65 años, y otro en la fase senil, entre los 75 y los 85 años [5, 6, 11, 13, 17, 32]. La tasa de incidencia de MSC aumenta de forma muy significativa a partir de los 55 años [13].

Respecto al sexo, el riesgo de MSC es casi 4 veces más alto en varones que en mujeres, con una proporción mayor de 1/3 [7, 32]. Esta diferencia es debida a que la causa más frecuente de MSC es la cardiopatía isquémica, como veremos a continuación, y a que las mujeres están protegidas frente a esta patología durante su época fértil [11, 17].

2.2 Etiología de la muerte súbita cardíaca

Cuando un individuo fallece por una MSC en el 90-95% de los casos encontraremos una cardiopatía de tipo estructural [28].

La causa más común de MSC es la cardiopatía coronaria de origen isquémico, que representa el 80% de todas las MSC [2, 5, 6, 8, 15, 17, 18, 26, 28, 29, 32]. Entre un 10-15% de los todos los casos de MSC se producen en pacientes con miocardiopatías, tipo miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada, displasia arritmogénica de ventrículo derecho, fibrosis ventricular izquierda idiopática, y enfermedades infiltrativas miocárdicas (sarcoïdosis, amiloidosis) [5, 7, 8, 32], especialmente en presencia de insuficiencia cardíaca [15], El 5-10% restante está integrado por enfermedades cardíacas congénitas con corazón estructuralmente anormal (anomalías coronarias, estenosis aórtica, tetralogía de Fallot, trasposición de grandes arterias, obstrucción vascular pulmonar), y por pacientes con un corazón estructuralmente normal pero eléctricamente anormal [2, 5, 8, 32].

Este último grupo que tiene un corazón estructuralmente normal corresponde a un conjunto de enfermedades eléctricas primarias, determinadas genéticamente, como son el Síndrome de QT largo, el Síndrome de Brugada, el Síndrome de QT corto y la taquicardia ventricular familiar catecolaminérgica. En los últimos años se han identificado múltiples defectos genéticos, principalmente en los genes codificantes de canales iónicos (sodio, potasio o calcio), como responsables de estas enfermedades conocidas como canalopatías. En ellas la MS se produce como consecuencia de una arritmia (fibrilación ventricular), encontrando en la autopsia un corazón estructuralmente normal, siendo lo habitual en estos casos una autopsia blanca, clasificándose este tipo de muertes, casi en la totalidad de los casos, en el grupo de MS de etiología inexplicada [34]. Considerar que entre sujetos jóvenes que mueren de forma súbita, hasta en un 30% de los casos se encuentra un corazón estructuralmente normal, siendo clasificada la autopsia como negativa, y en la mayoría de estos casos la enfermedad subyacente es un trastorno arritmogénico de origen genético debido a una canalopatía.

En este sentido cada vez más se plantea la importancia de la “*Autopsia Molecular*”, como aquella en las que los estudios genéticos entran a formar parte de las exploraciones complementarias propias de la autopsia [2, 7, 34-36]. La identificación positiva de la causa genética de la MSC no sólo nos responde a cuál es la causa de la muerte, si no que ayuda a identificar a los miembros de la familia del fallecido que son portadores de la alteración genética.

Si analizamos las causas de MSC por grupos de edad, en la población adulta mayor de 35 años, la cardiopatía coronaria de origen isquémico es la causa más frecuente (más del 60% de los casos), seguida de la miocardiopatía hipertrófica (20%), la miocardiopatía dilatada (10%), la enfermedad valvular, las anomalías del sistema his-purkinje (7,5%), la displasia arritmogénica de ventrículo derecho (4%), la estenosis aórtica y la enfermedad coronaria no arteriosclerótica. En los menores de 35 años la MSC se debe básicamente a enfermedades orgánicas del corazón, como la miocardiopatía hipertrófica (enfermedad genética, que representa casi el 40% de las MSC en este grupo de edad), la anomalía de arterias coronarias (19%), la displasia arritmogénica de ventrículo derecho (enfermedad genética), las anomalías congénitas de las arterias coronarias, y prácticamente todas las cardiopatías congénitas. Junto con todas estas causas, las canalopatías, son también propias de este grupo de edad [6, 15, 17, 26, 27, 36-38]. En adultos jóvenes la MSC también se relaciona con frecuencia con el abuso de drogas, fundamentalmente la cocaína, potente simpaticomimético que favorece la vasoconstricción coronaria, la isquemia miocárdica y el infarto. Además provoca alteraciones del sistema nervioso autónomo, y modifica la homeostasis de las catecolaminas [7, 13, 34].

2.3 Fisiopatología de la muerte súbita cardíaca

La MSC es el estadio final de una cadena de eventos que conducen a una parada cardíaca, consecuencia generalmente de una arritmia tipo fibrilación ventricular en más del 90% de los casos [12, 14-18, 29], y menos a menudo de una bradiarritmia. En todos los casos de MSC existen una serie de factores que actúan como moduladores y/o desencadenantes, que sobre un miocardio vulnerable precipitan la MSC. Entre estos factores debe incluirse un entorno

genético y ambiental, que junto con un aumento de la actividad simpática, como consecuencia de un estrés físico o psíquico, puede actuar como desencadenante de una MSC en situaciones particulares, como ante una isquemia aguda, o ante enfermedades hereditarias, como miocardiopatías (miocardiopatía hipertrófica, displasia arritmogénica de ventrículo derecho), y canalopatías. De este modo los tres factores que con más frecuencia hacen vulnerable al miocardio para sufrir una arritmia y en consecuencia una MSC son la isquemia, la disfunción del ventrículo izquierdo y la predisposición genética [15]. El mecanismo principal de las arritmias es la reentrada, favorecida por diferentes circunstancias como son la isquemia, el estiramiento de fibras musculares, alteraciones en el equilibrio del sistema nervioso autónomo y la fibrosis intramiocárdica [14]. En un número mucho menor de casos la MSC no se produce por una arritmia si no por un fallo mecánico del corazón, es decir por una insuficiencia cardíaca aguda.

2.4 Factores de riesgo de la muerte súbita cardíaca

La estrecha relación que la cardiopatía isquémica (CI) tiene con la MSC (el 80% de las MSC son por CI) da lugar a que los factores de riesgo cardiovascular sean también factores de riesgo de MSC [5, 13, 29]. La hipertensión arterial, el tabaquismo (2.5 veces más riesgo de MSC en los fumadores), la obesidad, la diabetes, son factores de riesgo modificables no sólo para la enfermedad coronaria, sino también para la MSC.

Otros factores de riesgo de MSC no modificables, como la edad, el sexo, o la herencia (enfermedades cardíacas genéticas) tienen también un papel muy importante en la MSC. En cuanto a la edad ya hemos mencionado que existe un pico de incidencia de MSC entre los 45 y los 75 años, que en adultos la incidencia de MSC aumenta con la edad. En relación al sexo la MSC es más frecuente en varones, de 2 a 7 veces mayor en éstos, con una proporción 7/1 en la población de 55-64 años, y 2/1 en la población de 64-74 años. Se calcula que el 75-90% de las MSC se presentan en varones [13, 17]. Junto con todo lo anterior considerar que la función del ventrículo izquierdo y los síntomas de insuficiencia cardíaca son también factores predictivos de gran relevancia para la MSC [7, 12, 28]. Otros factores como la actividad física o ciertas sustancias como fármacos (que pueden

inducir arritmias) y drogas (como la cocaína) pueden actuar como factores desencadenantes de MSC [5, 13], constituyéndose así como factores de riesgo en personas predisuestas.

2.5 Estudio médico-legal de la muerte súbita cardíaca

Ya hemos visto que la MSC es una de las formas de muerte más importantes en todos los países industrializados, y actualmente, el diagnóstico de la MSC solo se puede hacer a través de una autopsia completa [18], siendo los patólogos los responsables de determinar la causa exacta de la MSC. El problema surge cuando al analizar cómo se maneja la MSC comparando distintos centros de trabajo incluso dentro de un mismo país, se observa que existen diferencias considerables en el modo en que se aborda esta entidad, que es cada vez más compleja. Para dar solución a este problema, de falta de uniformidad en el estudio de la MSC y su gran interés para los patólogos, los médicos y para la salud pública, la tendencia en los últimos años ha sido la de elaborar diferentes libros, artículos, guías o protocolos para la práctica de la autopsia médico-legal en casos de MSC [2, 4, 9, 18, 37, 39-43]. Entre ellas destaca la Guía para la práctica de la autopsia en casos de muerte súbita cardíaca de la Asociación Europea de Patología Cardiovascular elaborada en el año 2010 [4]. El objetivo de estas guías y protocolos, aplicables a centros médicos universitarios, a hospitales regionales y locales, y a todo tipo de Institutos de Medicina Forense, es establecer un estándar mínimo exigible en la práctica habitual de la autopsia para la adecuada valoración de la MSC en la población general. Esto supondrá una evidente mejora en la práctica habitual; permitirá hacer comparaciones significativas entre diferentes regiones, y además posibilitará que se monitoricen los patrones de las enfermedades que causan la MSC [4].

Los patólogos forenses son los encargados de llevar a cabo el estudio médico-legal de la MS, y en este estudio, la autopsia tiene un papel fundamental, permitiendo aportar datos histopatológicos y toxicológicos que no se pueden obtener con otros métodos [8]. Con la realización de la autopsia los objetivos fundamentales que se persiguen son establecer o considerar [4, 9]:

- Si la muerte es atribuible a una patología cardíaca u a otra causa de MS.

- La naturaleza de la enfermedad cardíaca, y si el mecanismo de muerte fue mecánico o arrítmico.
- Si la patología cardíaca causante de la MS puede ser hereditaria, requiriendo en tal caso la realización de un screening y consejo a los familiares en primer grado.
- La posibilidad de consumo de drogas tóxicas o ilegales así como de muertes no naturales.

La investigación médico-legal de la MSC implica llevar a cabo cuatro pasos fundamentales:

- a. Recoger toda la información posible sobre la circunstancias de la muerte y sobre el historial clínico del fallecido
- b. Autopsia médico-legal completa y minuciosa, con toma de muestras para estudios complementarios posteriores.
- c. Estudios complementarios, histopatológicos, bioquímicos, toxicológicos, microbiológicos, genéticos, y otros que puedan ser de interés al caso.
- d. Elaboración de un diagnóstico y establecimiento de la causa de la muerte.

A continuación estudiaremos con detalle estos cuatro puntos:

a. Circunstancias de la muerte e información clínica relevante para la autopsia en casos de muerte súbita.

En la práctica, la información de que podemos disponer antes de la autopsia es muy variable, y debemos tener en cuenta que cualquier fuente de información debería ser entrevistada (familiares, testigos, médico general, etc.), lo que no siempre es posible. La información de mayor interés en este momento sería [2-4]:

- Sexo, edad, profesión, hábitos y estilo de vida del fallecido, siendo de gran interés el conocer hábitos tóxicos y su patrón habitual de actividad física y estrés

- Circunstancias que han rodeado a la muerte: fecha, intervalo de tiempo (instantánea o en menos de 1 hora), lugar de la muerte (en casa, en el trabajo, en el hospital), circunstancias (en reposo, durante el sueño, durante el ejercicio o bajo un estrés emocional), presencia o no de testigos, y cualquier otra circunstancia sospechosa.
- Historial médico del fallecido: estado general de salud, enfermedades y sintomatología previa de interés (especialmente síncope, dolor precordial y palpitaciones, particularmente durante el ejercicio, infarto de miocardio, hipertensión, trastornos respiratorios e infecciones recientes, epilepsia, asma, etc.), intervenciones quirúrgicas previas, registros electrocardiográficos y radiografías de tórax anteriores, resultados de exámenes cardiovasculares, análisis de laboratorio (especialmente pruebas lipídicas, enzimas cardíacas, etc.).
- Medicación habitual que tomaba el fallecido
- Historia clínica familiar: prestando especial atención a la cardiopatía isquémica y muerte súbita, arritmias y enfermedades cardíacas congénitas.

b. Procedimiento de autopsia en la muerte súbita. Estudios complementarios: Toma, envío y análisis de muestras.

Todas las autopsias en los casos de MS deben seguir un desarrollo secuencial y totalmente estructurado, dirigiendo el examen específicamente hacia las causas principales de muerte súbita cardíaca y no cardíaca que ya conocemos. Todo el procedimiento de autopsia deberá además ajustarse a los principios y normas establecidos en las Recomendaciones para la Armonización de las Autopsias Médico-Legales emitidas por el Comité de Ministros del Consejo Europeo [24]. Tener en cuenta que siempre, este procedimiento debe ser lo más sencillo y lógico posible, siendo sus fases las que continuación se describen [2-4]:

- Examen externo del cadáver en casos de muerte súbita

El examen externo del cadáver debe ir dirigido a la búsqueda de signos de enfermedad y de posibles lesiones traumáticas, debiendo ser exhaustivo y completo. Además es de gran importancia en este momento no olvidar anotar la talla y el peso del fallecido, para así conocer su índice de masa corporal, y el

perímetro abdominal como medida de la obesidad visceral, para poder así valorar ya un importante factor de riesgo cardiovascular. Además, después podremos correlacionar la talla y el peso del cadáver con el peso del corazón (el 0.45% del peso total para varones y el 0.40% para mujeres), y con el grosor de sus paredes. Junto con esto en este momento debemos buscar la presencia de marcas de vías venosas recientes, intubación, parches de ECG, quemaduras eléctricas y por desfibrilador, drenajes, y revisar la existencia de marcapasos o desfibrilador automático implantable.

- Examen interno del cadáver en casos de muerte súbita

Cualquier MS puede ser considerada como de origen cardíaco después de que queden excluidas las causas no cardíacas, y por ello ante una MS lo primero será descartar una patología extra-cardíaca como origen de la muerte. El examen interno se efectúa tras evisceración completa en bloque, lo que permitirá el estudio de los distintos órganos con la finalidad de descartar, en un primer lugar, causas no cardíacas de MS, como son las causas encefálicas (entre las que destacan la hemorragia subaracnoidea e intraparenquimatosas), respiratorias (asma, neumonía, embolia pulmonar), hemorragias de origen diverso, shock anafiláctico, shock séptico (Síndrome de Waterhouse Friderichsen) o shock hipovolémico (roturas de aneurismas de aorta, úlcera péptica), enfermedades digestivas y renales, entre otras. Se debe prestar especial atención al estudio del pulmón. Un fracaso ventricular izquierdo, por fibrilación, puede tener como expresión morfológica un edema agudo de pulmón. De otra parte, una embolia masiva puede producir una fibrilación y una parada cardíaca, lo que los clásicos denominaban corazón agudo pulmonar.

Una vez descartado el origen extra-cardíaco de la MS, debemos centrarnos en el estudio macroscópico del corazón, teniendo en cuenta que muchas enfermedades cardíacas pueden causar MS, ya sea a través de un mecanismo eléctrico (MSC eléctrica, el 90% de los casos [12, 14-16, 29]), o bien comprometiendo la función mecánica del corazón (MSC mecánica). El examen macroscópico estándar del corazón en caso de MS se debe efectuar como sigue [2, 4, 9, 38, 44]:

- Inspeccionar el pericardio, abrirlo y explorar la cavidad pericárdica, comprobando la existencia de adherencias fibrosas o de derrames intrapericárdicos, determinando su tipo (seroso, hemático, purulento), y su cantidad.
- Inspeccionar la anatomía de las grandes arterias, antes de seccionarlas 3 cm por encima de las válvulas aórtica y pulmonar
- Examinar y seccionar las venas pulmonares. Cortar la vena cava superior 2 cm sobre el punto donde ésta se une a la cresta de la orejuela derecha (para preservar el nodo sinusal). Seccionar la vena cava inferior cerca del diafragma.
- Un vez que hemos extraído el corazón valorar el aspecto del pericardio y la cantidad y distribución de la grasa epicárdica.
- Abrir la aurícula derecha desde la vena cava inferior hasta el ápex de la orejuela. Abrir la aurícula izquierda entre las venas pulmonares y desde ahí hacia la orejuela auricular. Examinar las cavidades auriculares, el tabique interauricular y determinar si el foramen oval está íntegro. Valorar las válvulas mitral y tricúspide (o las prótesis valvulares) desde arriba y determinar la integridad de los músculos papilares y las cuerdas tendinosas.
- Inspeccionar la aorta, la arteria pulmonar y las válvulas aórtica y pulmonar (o las prótesis valvulares) desde arriba.
- Examinar las arterias coronarias:
 - Valorar tamaño, forma, posición, número y permeabilidad de los ostium coronarios.

 - Evaluar tamaño, curso y dominancia de las arterias epicárdicas principales, para ello deben examinarse siempre las coronarias derecha, izquierda, descendente anterior y circunfleja, anotando la dominancia (derecha, izquierda, balanceada o codominancia)
 - Realizar múltiples cortes transversales a intervalos de 2-3 mm a lo largo del curso de las principales arterias epicárdicas y sus ramas como la diagonal o la marginal, y determinar la permeabilidad. El

grado de estenosis se clasifica en ligera (25-50%), moderada (50-75%), severa (>75%) y oclusiva (100%). Hay que especificar su localización (proximal, media o distal).

- Las arterias coronarias severamente calcificadas habitualmente se abren de forma adecuada con tijeras afiladas. Si esto no es posible, deberían ser disecadas intactas, descalcificadas (con ácido nítrico al 7%, por ejemplo) y abiertas transversalmente.
 - Los segmentos coronarios que contienen un stent metálico deberían derivarse íntegros a laboratorios con medios para fijación en resina y posterior procesado y tallado.
 - las arterias coronarias con bypass (venas safenas, arterias mamarias internas, arterias radiales, etc.) deberían ser examinadas atentamente mediante cortes transversales. Las anastomosis proximal y distal requieren un examen particularmente cuidadoso. Las grapas o suturas junto al vaso facilitan su identificación, sobre todo cuando se trata de injertos de la mamaria interna.
- Practicar un corte transversal completo (eje corto) del corazón a nivel de mesocardio, seguido de cortes paralelos de los ventrículos a intervalos de 1 cm hacia el ápex y evaluar detenidamente la morfología de las paredes y cavidades en dichos cortes.
 - Una vez esté el corazón exangüe, debemos registrar las siguientes medidas:
 - Peso total del corazón: valorar el peso del corazón frente a tablas de pesos normales según edad, sexo y peso corporal [45, 46].
 - Espesor de la pared: examinar el endocardio, medir el grosor de la región media de la pared libre del ventrículo izquierdo, del ventrículo derecho y del tabique (excluyendo las trabéculas) comparando con tablas de espesor normal según edad, sexo y peso corporal [45, 46]. Si el grosor del ventrículo izquierdo es mayor de 15 mm se considera hipertrofia, y habrá que valorar si es concéntrica o asimétrica. El espesor del ventrículo derecho es de 3-4 mm.

- Dimensiones del corazón: el eje transversal se calcula adecuadamente como la distancia desde el margen obtuso al agudo en el surco aurículo-ventricular posterior. El eje longitudinal se obtiene midiendo la distancia entre la *crux-cordis* y el ápex del corazón por la cara posterior.
- Disecar la mitad basal del corazón siguiendo la corriente sanguínea y realizar un examen completo del tabique interauricular e interventricular, las válvulas aurículo-ventriculares, tractos de entrada y de salida de los ventrículos, y las válvulas semilunares. En el caso de existir un cuadro de pre-excitación ventricular documentado en un registro ECG, los anillos aurículo-ventriculares deben mantenerse intactos.
- Estudios complementarios: Toma, envío y análisis de muestras en casos de muerte súbita cardíaca.

Para la toma de muestras y su análisis, es debemos tener en cuenta la orden ministerial que se publicó en España, en el año 2010, por del Ministerio de Justicia (JUS/1291/2010). En ella se recogen las normas para la preparación y remisión de muestras que van a ser objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses [39]. También se deben considerar las recomendaciones de otros autores [2, 4, 9, 38, 44].

Para estudio histopatológico, en casos de MS del adulto, se han de considerar muestras de encéfalo en caso de sospecha de enfermedad neurológica, corazón, pulmón (muestras de los 5 lóbulos), hígado, bazo, páncreas, glándula suprarrenal, riñón, y otros según los hallazgos de autopsia y antecedentes clínicos del fallecido. En el caso del corazón se recomienda que se envíe completo (aunque también se dan otras alternativas) incluyendo la totalidad de las aurículas, siendo este el procedimiento óptimo, sobre todo cuando se envían a centros especializados en el estudio del corazón, (no a simples centros de estudios de anatomía patológica general, ya que privar al patólogo del análisis inmediato del corazón puede ser más negativo que positivo), prefiriéndose que no se haga el estudio estándar del corazón descrito con anterioridad en la sala de autopsias. Otra opción sería enviar el corazón seccionado en dos, mediante corte transversal por la

mitad del cono ventricular por debajo de los músculos papilares y de la válvula mitral para preservar el aparato valvular. El cono ventricular también puede enviarse en varias secciones transversales obtenidas mediante cortes paralelos al surco aurículo-ventricular posterior. La base cardíaca, opcionalmente, puede enviarse abierta siguiendo la dirección de la corriente sanguínea. La aurícula derecha debe abrirse desde la desembocadura de la vena cava inferior a la orejuela derecha, para preservar el nodo sinusal del sistema de conducción. Los corazones operados, prótesis valvulares, o bypass, deben enviarse completos y sin corte alguno. En caso de cirugía coronaria, tratar de preservar los injertos aorto-coronarios y buscar posibles injertos pediculados de arteria mamaria interna. Los corazones con cardiopatías congénitas, si es posible, deben enviarse completos, sin cortes. En casos en los que no se pueda enviar el corazón completo (ya sea integro o con cortes) se deben tomar bloques etiquetados de un corte transversal de los ventrículos que resulte representativo, incluyendo la pared libre del ventrículo izquierdo (región anterior, lateral y posterior), el tabique interventricular (región anterior y posterior), junto con una muestra de tracto de salida de ventrículo derecho, y de cada una de las aurículas. Además debe muestrearse cualquier otra área con alteraciones macroscópicas significativas. Estas muestras deben enviarse en formol tamponado al 4%, de modo que las piezas queden totalmente cubiertas. A estas muestras se les realizará un estudio de hematoxilina-eosina y tinciones de tejido conectivo (*Van Gieson*, *tricroómico*, *Sirius red*) que son las estandarizadas. Otras tinciones especiales y estudios de inmunohistoquímica se realizarán en casos necesarios. En caso de que exista enfermedad en las arterias coronarias debe hacerse estudio histológico de las lesiones focales más severas del mismo modo que se ha descrito con anterioridad.

Para estudios bioquímicos, en casos de MS se debe enviar, para la determinación de glucosa, urea, creatinina, y cloruros, muestras de humor vítreo (0.5 ml en un tubo estéril sin ninguna sustancia), y sangre (1 ml con heparina como anticoagulante). Para el estudio de glucosa en sangre, esta se mandará en tubos de fluoruro sódico-oxalato potásico. En sangre y en líquido pericárdico será de gran utilidad, en casos de MSC, el estudio de enzimas cardíacas, fundamentalmente la troponina I y T cardíaca. El líquido pericárdico se recoge en un tubo estéril.

Para estudio toxicológico, en casos de MS se debe tomar sangre periférica (10 ml tomada de las venas femorales), sangre cardíaca (25 ml), ambas en tubos con fluoruro sódico y oxalato potásico), orina por punción (30-50 ml), humor vítreo (todo el posible de los dos ojos; bilis (20-30 ml), contenido gástrico, y un fragmento de cerebro, hígado, riñón y pulmón, estos es fresco. También se podrá tomar cabello de la región occipital y en un tubo sin conservante. En estas muestras se podrá determinar cocaína y metabolitos, anfetaminas, opioides, alcohol y medicamentos con efecto cardiotóxico como son los neurolépticos.

Si existe sospecha de un proceso infeccioso como causa de la MSC, como es el caso de una miocarditis infecciosa, se deben tomar muestras en fresco de sangre con EDTA, suero y corazón en fresco (una porción de 3 a 5 g de punta de miocardio en envase estéril y preferentemente en medio de transporte viral). También ante la sospecha de otros procesos infecciosos se pueden tomar hisopos faríngeos y nasofaríngeos recogidos con medio de transporte preferentemente viral, y pulmón, líquido pleural y aspirado bronquial si hubiera existido sintomatología respiratoria. En caso de diarrea los días previos a la muerte, se tomarán heces en recipiente estéril o hisopo rectal con medio de transporte preferentemente viral. En el caso de que sólo se disponga de muestras fijadas es prioritario que este análisis se efectúe con la mayor rapidez desde que se establece el diagnóstico histológico. Se tomarán secciones de parafina de miocardio, procedentes de dos zonas del corazón seleccionadas según los hallazgos histopatológicos (una zona con infiltrado inflamatorio y otra de una zona control con celularidad normal). De cada una de ellas se tomarán 5-6 cortes, cada uno de ellos de 5 micras, que se dispondrán en tubo de microcentrífuga estéril y se mantendrán refrigeradas hasta su análisis.

Para estudio genético las muestras que se deben recoger son 10 ml de sangre con EDTA como anticoagulante, y 5 g de miocardio y de bazo sin fijar, y deben mantenerse congelados a -80°C . Los estudios moleculares incluyen la detección del genoma viral en casos de MSC por miocardiopatías inflamatorias, y el análisis de mutaciones genéticas en enfermedades cardíacas estructurales (miocardiopatía hipertrófica y displasia arritmogénica de ventrículo derecho), y no estructurales (canalopatías) determinadas genéticamente. Estos últimos procedimientos

constituirían la llamada Autopsia Molecular, recomendada en casos de enfermedades cardíacas estructurales genéticas, pero sobre todo ante una autopsia negativa o blanca (sobre todo en menores de 35 años), en la que no se han encontrado anomalías cardíacas estructurales, y en las que la causa más probable de la MS es una arritmia ventricular primaria genéticamente determinada por una canalopatía primaria, debida a un Síndrome de QT largo, Síndrome de Brugada, Síndrome de QT corto, o a una taquicardia familiar catecolaminérgica [5].

c. Elaboración de un diagnóstico en casos de muerte súbita.

Una vez integrada toda la información obtenida de un minucioso análisis médico-legal de la MS, en la mayoría de los casos de MSC puede identificarse una causa patológica evidente, aunque con grados variables de certeza [4]. Las muertes que a pesar de todo, y después de una cuidadosa investigación, no puedan explicarse deben clasificarse como *Síndrome de Muerte Súbita Arrítmica*, ya que cada vez existen más evidencias de que las MSC en estos casos inexplicados se deben a anomalías congénitas de los canales iónicos en los miocardiocitos, es decir a las llamadas canalopatías [4, 9, 15, 26, 34, 37].

Finalmente recordar que para alcanzar un diagnóstico, ante una MSC no es suficiente el hacer un estudio del corazón, sino que es necesario un examen minucioso del lugar de los hechos, un estudio clínico detallado que incluya antecedentes personales y familiares, y una autopsia completa, con todos los estudios complementarios que sean necesarios, y solo así se podrá realizar una correcta interpretación de la causa y el mecanismo de una muerte que ha acontecido de manera rápida e inesperada. Además las autopsias que se hacen a sujetos que fallecen por MSC en los Servicios de Patología Forense de los Institutos de Medicina Legal, por orden judicial, tienen una finalidad pericial, y sin embargo la importancia que tiene la MSC a nivel tanto clínico como social trasciende mucho más allá dicho ámbito. Por ello los Servicios de Patología Forense de los Institutos de Medicina Legal pueden y deben dar un apoyo al estudio de esta frecuente entidad que es la MSC, permitiendo un estudio multidisciplinar de la misma, sin que por ello se vea interferida la función pericial.

3. La muerte súbita cardíaca de origen isquémico

3.1 La cardiopatía isquémica

3.1.1 Concepto de cardiopatía isquémica

La cardiopatía isquémica (CI) [47-49] es el conjunto de enfermedades cardíacas, y de las complicaciones que de éstas derivan, que se producen como consecuencia de las alteraciones fisiopatológicas que conllevan la aparición de un desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno al músculo cardíaco, en detrimento de aquel (isquemia miocárdica).

3.1.2 Epidemiología de la cardiopatía isquémica

La enfermedad cardiovascular arterioesclerótica es la primera causa de muerte en España, suponiendo el 37% del total, siendo aproximadamente la tercera parte de estos casos secundarios a enfermedad coronaria arterioesclerótica y a isquemia cardíaca. En números, la enfermedad cardiovascular arterioesclerótica produce en España unas 125.000 muertes al año, siendo la cardiopatía isquémica la primera causa de muerte en los varones, seguida de la enfermedad cerebrovascular, mientras que en las mujeres es a la inversa. En nuestro medio, la enfermedad coronaria es actualmente la primera causa de muerte en varones por encima de los 45 años y en mujeres por encima de los 65 años [49]. Desde mediados de la década de los setenta se ha producido en nuestro país un descenso de la tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular ajustada por la edad, fundamentalmente a expensas de la mortalidad cerebrovascular, y en menor medida al descenso de la mortalidad por cardiopatía isquémica. Este descenso se asocia a intervenciones comunitarias sobre los factores de riesgo cardiovasculares, y a las mejoras en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo debido al envejecimiento de la población el número de muertes por cardiopatía isquémica sigue aumentando.

A pesar de esto, España ha sido una tradicionalmente uno de los países industrializados con menos incidencia de enfermedad coronaria, siendo esto

debido a factores genéticos y a otros adquiridos, como la tradicional dieta mediterránea [13, 48].

También destacar que la enfermedad cardiovascular y especialmente la enfermedad coronaria, es la causa más frecuente de muerte prematura en todo el mundo, supone el 42% de todas las muertes en mujeres europeas menores de 75 años, y el 38% en varones menores de 75 años [47].

3.1.3 Factores de riesgo de la cardiopatía isquémica

Los factores de riesgo de la CI, son los factores de riesgo cardiovascular, los cuales están integrados por cualquier hábito, característica o rasgo que aumente la probabilidad de que un individuo desarrolle una enfermedad cardiovascular o alguna de sus complicaciones. Existen factores de riesgo no modificables, como el sexo y la edad. La edad es el factor de riesgo con mayor valor predictivo. La enfermedad cardiovascular aumenta con la edad con independencia del sexo, siendo excepcional antes de los 40 años. En relación al sexo, el riesgo de cardiopatía isquémica es 4 veces mayor en el hombre que en la mujer para el mismo nivel de colesterol, y la edad de aparición se retrasa en la mujer 10-15 años, aumentando la incidencia en las mujeres tras la menopausia, aunque no llega a sobrepasar al varón en ningún momento. Entre los factores de riesgo modificables destacar el tabaquismo, la hipertensión arterial, la dislipemia, la diabetes mellitus, el sedentarismo y la obesidad [12, 30, 47-49].

3.1.4 Etiopatogenia de cardiopatía isquémica

La causa más frecuente de CI es la enfermedad coronaria que supone más del 90% de los casos, y que es debida a la arterioesclerosis de las arterias coronarias epicárdicas, [47-49]. Desde un punto de vista patológico la enfermedad coronaria es aquella que aparece cuando un corazón muestra al menos una de las tres arterias coronarias principales con una estenosis del 75% o mayor, por una placa arterioesclerótica y/o una trombosis coronaria [9].

La arterioesclerosis es un proceso inflamatorio crónico que afecta a la íntima, media y adventicia de las arterias de mediano y gran calibre de diferentes lechos

vasculares, y que se caracteriza por producir un engrosamiento de la capa íntima y media de estos vasos, con pérdida de elasticidad y endurecimiento de los mismos [47-49]. Este proceso inflamatorio busca reparar un daño producido en la pared arterial, y se inicia con la disfunción del endotelio inducida por la alteración en las partículas de LDL colesterol, las fuerzas de estrés sobre la pared vascular, la hipertensión arterial, el tabaquismo, las infecciones y otros procesos que generan una respuesta inflamatoria [50]. Este proceso es el que genera la lesión básica de la arterioesclerosis que es la placa de ateroma, la cual está compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias. Así pues las placas de ateroma se caracterizan por el depósito de lípidos en la zona subendotelial, fundamentalmente de colesterol no esterificado. El núcleo lipídico central de la placa (*core*) está compuesto básicamente por ésteres de colesterol, y está rodeado por tejido conectivo con células espumosas (macrófagos cargados de lípidos), linfocitos, células musculares lisas y fibroblastos que sintetizan una matriz fibrocolágena extracelular, que está tapizada por endotelio hacia la luz vascular [49].

La arterioesclerosis coronaria, con la formación de placas de ateroma, puede provocar isquemia miocárdica por la reducción del calibre de la luz vascular, lo que disminuye el flujo de sangre hacia el miocardio, y también por la capacidad trombogénica de las placas de ateroma [49]. En el primer caso, la reducción del calibre del vaso se produce por las conocidas como placas estables, las cuales se caracterizan por tener un importante desarrollo de la capa fibrosa (incluso con calcificación), lo que les confiere una alta resistencia a la ruptura, incluso en casos en que la estenosis sea muy importante. La angina estable generalmente es producida por lesiones de este tipo. Por otro lado la isquemia miocárdica puede ser consecuencia de la formación de un trombo sobre una placa de ateroma que se rompe, en este caso hablaríamos de una placa vulnerable o inestable [47, 49]. Este tipo de placas se caracterizan por un predominio del componente lipídico sobre la fibrosis, por los que son mucho más susceptibles a sufrir complicaciones, es decir se pueden convertir en una placa complicada, con las consecuencias que esto conlleva. Estudios angiográficos y necrópsicos demuestran que este tipo de placas arterioescleróticas, son las que con mayor frecuencia inducen el desarrollo de Síndromes Coronarios Agudos (SCA), estos son la angina inestable, infarto agudo

de miocardio (IAM) (con o sin elevación del segmento ST), y la muerte súbita cardíaca de origen isquémico [49]. En estos casos el riesgo de rotura de la placa arterioesclerótica depende más de su composición y vulnerabilidad, que del grado de estenosis, de modo que diferentes estudios han demostrado que más del 75% de los IAM ocurren en áreas donde las arterias coronarias presentan estenosis moderada (menos del 50%). Los factores más importantes que afectan a la estabilidad de una placa son su composición celular y la proporción entre matriz extracelular y concentración lipídica. Las placas inestables y con alto riesgo de rotura tienen un importante núcleo lipídico, rico en ésteres de colesterol y pobre en colágeno, y con reducido número de células musculares lisas, además de inflamación dentro de la cápsula y un elevado grado de neovascularización. Además destacar que en las lesiones iniciales, las células musculares lisas son el 90-95% del componente celular, mientras que en placas avanzadas sólo representan el 50%, hecho que indica que con el tiempo las placas se hacen más vulnerables. De este modo gran parte de los SCA, incluidos los casos de MSC de origen isquémico, se desarrollan sobre lesiones moderadamente estenóticas que sufren una ruptura exponiendo el gran núcleo lipídico de la placa al torrente sanguíneo, generando un estado de hipercoagulabilidad local que da lugar a la formación de un trombo [47-49]. La ruptura de la placa se puede producir de manera espontánea o inducida por diversos factores desencadenantes, como pueden ser el ejercicio, el estrés, en el contexto de taquicardia, hipertensión, y otros factores, con frecuencia presentes en los casos de MSC, que condicionan un aumento del flujo sanguíneo y la génesis de turbulencias en la zona de estenosis, hechos que a su vez precipitan la ruptura de la placa, y por tanto el SCA. En ocasiones puede no producirse la ruptura completa de la placa, si no simplemente una erosión superficial o fisura de la misma, sobre todo en placas altamente estenóticas y fibróticas. En estos casos, que también son origen de un SCA, desempeñan un papel fundamental en la formación del trombo diversos factores sistémicos como el tabaco, la hiperlipidemia, hiperglucemia, y alteraciones de la hemostasia que generan un estado hipertrombogénico [49].

Considerar que episodios sucesivos de trombosis no oclusiva sobre una placa (generalmente estable que se fisura) en la que se ponen en marcha procesos de reparación cicatricial con fibrosis y organización del trombo, aportan estabilidad a

la placa de ateroma, pero producen una reducción de la luz del vaso por crecimiento de la placa que disminuye el flujo de sangre hacia el miocardio de manera crónica. Este es el mecanismo que subyace en una parte de los síndromes coronarios crónicos, como es la angina estable, en la que también puede existir, como ya hemos mencionado, una placa estable que por su tamaño es estenótica, sin que en ningún momento se haya tenido que inestabilizar. En la angina estable, una reducción del 70-75% de la luz del vaso ocasiona incapacidad del mismo para aumentar el flujo de sangre hacia el miocardio ante un incremento de demanda, y estenosis mayores del 80% comprometen el flujo en reposo. Cuando existe un síndrome coronario crónico que produce síntomas hablamos de angina estable, si es asintomático estaríamos ante una isquemia silente.

3.1.5 Clasificación de la cardiopatía isquémica

La cardiopatía isquémica se clasifica según su fisiopatología, como ya hemos visto en síndromes coronarios agudos (SCA) y síndromes coronarios crónicos (angina estable e isquemia silente).

Los SCA, caracterizados por ser consecuencia de la inestabilidad de una placa que se rompe o fisura, con la consiguiente formación de un trombo, y en estos se incluye la angina inestable, el IAM y la MSC de origen isquémico [51]. En la actualidad las patologías que integran el SCA se dividen en dos grupos [47, 49]:

- SCA sin elevación del segmento ST: En este grupo encontramos la angina inestable y el IAM sin elevación del segmento ST o subendocárdico. En estos la obstrucción de la luz coronaria por el trombo en general es importante pero no completa. Estas dos entidades se diferencian según la gravedad de la isquemia generada, si esta es lo bastante intensa como para causar daño isquémico miocárdico y liberar cantidades detectables de un marcador de lesión miocárdica como son las troponinas cardiacas T o I (cTnT y cTnI), o la creatinfosfoquinasa en su fracción MB (CK-MB). Si el nivel de CK-MB en sangre duplica su valor normal se habla de IAM sin elevación del segmento ST, y si no se alcanza ese nivel de angina inestable.

- SCA con elevación del segmento ST: Este se refiere al IAM clásico, subepicárdico o transmural, y en estos casos existe una oclusión coronaria trombótica completa. El IAM se define clásicamente como la necrosis celular irreversible de una zona del miocardio producida por la isquemia grave y prolongada del mismo, siendo la causa más habitual la rotura de una placa de ateroma complicada con la trombosis coronaria subsecuente [49].

3.1.6 Fisiopatología de la isquemia miocárdica y del infarto agudo de miocardio

Tras la rotura o fisura de la placa de ateroma en una arteria coronaria y la consiguiente trombosis, se produce un SCA (angina inestable, IAM o MSC) que trae consigo una isquemia/necrosis del tejido miocárdico. Cuando la obstrucción completa del flujo sanguíneo persiste durante tan solo 20 minutos, se puede observar una necrosis miocárdica, sin embargo, en circunstancias en que la reperfusión miocárdica se restablece con gran rapidez, la función mecánica puede retomar unos niveles casi basales. Desde el primer momento, la interrupción básica del flujo sanguíneo provoca al mismo tiempo la puesta en marcha de mecanismos homeostáticos, tratando de limitar la lesión resultante y de rescatar el miocardio dañado. El proceso de isquemia y de necrosis, con la liberación del contenido intracelular, y el aumento en el estrés mecánico de la pared, desencadenan una serie de eventos que incluyen una respuesta inflamatoria local de fase aguda, que tiende a generalizarse, con acumulación de polimorfonucleares y macrófagos en el lugar de la lesión miocárdica y una activación de los reactantes plasmáticos de fase aguda, como son los leucocitos, la proteína C reactiva y un importante número de citocinas pro y antiinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 6 y 1beta (IL-6 eIL-1 β), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y el factor de crecimiento transformante 1 beta (TGF-1 β), entre otros. Toda esta liberación aguda de citocinas podría regular la supervivencia o el proceso de apoptosis de los miocitos en la zona infartada y, sus efectos inotrópicos negativos pudieran representar una respuesta adaptativa para delimitar el daño y para disminuir la demanda de energía del miocardio. Esta significativa regulación a la alta de las citocinas proinflamatorias puede

extenderse a la zona no infartada y disparar una segunda fase de niveles elevados de citocinas que promueven la fibrosis intersticial y la deposición de colágeno en el miocardio no infartado llevando a un ventrículo disfuncional. La intensidad de la respuesta inflamatoria viene determinada no sólo por la extensión del infarto y la respuesta inmunológica individual, sino también por la presencia de reperfusión y/o terapéutica trombolítica [52-56].

Junto con esta reacción de fase aguda, y con un curso temporal más lento, se ponen en marcha respuestas adaptativas del miocardio al estrés mecánico, en un intento para adaptarse a la elevación en la tensión de la pared y mantener el gasto. Entre estas respuestas se encuentran la hipertrofia de los miocardiocitos, su apoptosis y cambios en la composición y distribución de los componentes de la matriz extracelular (MEC) sobre todo del colágeno, generando así, una fibrosis que se extiende hasta la región no infartada. Cabe recordar que dos tercios de la población de células que forman el corazón, lo constituyen células no musculares, principalmente fibroblastos y que estas células responden muy sensiblemente a señales intercelulares modificando su fenotipo y liberando proteínas de la MEC así como diversos tipos de sustancias como metaloproteinasas (MPPs), factores de crecimiento y citocinas. La elevación en la expresión de citocinas ocurre antes del incremento de la actividad de las MMPs en el área infartada, fundamentalmente las MMP 2 y 9, las cuales se han relacionado directamente con la remodelación cardíaca [57, 58]. De igual manera, de forma más lenta, se produce una liberación de los péptidos natriuréticos atrial y cerebral (PNA y PNB) a los cuales se les ha atribuido un papel protector en el proceso de isquemia/reperfusión [59]. Las citocinas son el inicio de todo el proceso, regulando de manera aguda las respuestas adaptativas al daño controlando la sobrevivencia de los miocardiocitos, y generando respuestas inflamatorias celulares adicionales que a largo plazo pueden mediar la reparación y remodelación del tejido a través de activar mediadores como las MMPs y la consecuente formación de colágeno, así como el proceso de angiogénesis [52-56].

Estas citocinas no se encuentran constitutivamente expresadas en el corazón en condiciones normales; sin embargo ante un daño al miocardio, se presenta un gran aumento en sus niveles plasmáticos. En modelos experimentales de infarto de

miocardio se ha reportado un aumento de hasta 50 veces en los niveles de ARN mensajero para TNF- α , IL-6 e IL-1 β dentro de las primeras horas después de la isquemia en el área infartada y un aumento de hasta 15 veces en la zona del miocardio no infartado. El TGF-1 β es una citocina que se incrementa tempranamente en la zona infartada, producida por los miocitos necróticos y los macrófagos, estimulando quimiotaxis de otros macrófagos y fibroblastos, generando un mecanismo de amplificación e interacción de las respuestas inflamatoria y neurohumoral para delimitar el área dañada e iniciar la fibrosis reparativa. Por tanto el TGF-1 β juega un papel muy importante y precoz en la curación del infarto, la reparación del miocardio y la remodelación cardiaca [52, 60, 61]. El TNF- α es producido por macrófagos, células endoteliales y por los propios cardiomiocitos y tiene efectos directos sobre la función contráctil disminuyéndola, además podría facilitar la apoptosis, y está involucrado en la infiltración de neutrófilos después del daño isquémico. Por otro lado, se ha demostrado que el TNF- α incrementa la expresión y la actividad de algunas MMPs, como las MMP-2 y la MMP-9, así como la alteración diferencial de la expresión de los inhibidores de las MMPs llamados TIMPs, permitiendo una desviación de la relación MMP/TIMP hacia una mayor actividad proteolítica con degradación del colágeno y la reestructuración de la MEC. Así el TNF- α regula la respuesta al estrés del miocardio, al disparar señales citoprotectoras antiapoptóticas tempranamente, las cuales son responsables de delimitar el daño tisular y, señales tardías que facilitan la reparación del tejido o su remodelación [52, 55, 62]. La IL-6 es producida durante la fase aguda de la respuesta inmune por diversos tipos celulares. De manera particular, la IL-6 produce inducción de anticuerpos, hematopoyesis, trombocitopoyesis y síntesis de proteínas de fase aguda. Esta citocina tiene un efecto negativo sobre la contractilidad cardíaca [52]. La IL-1 β se ha relacionado directamente con el proceso de remodelación cardíaca. Durante la fase aguda del IAM, la IL-1 β , al igual que el TNF- α , parecen tener un papel protector y regulan la recuperación del tejido. El efecto más importante de la IL-1 β sería su efecto mitogénico sobre los fibroblastos de la región no infartada que llevaría, en primera instancia, a la reparación del daño y a la adaptación mecánica de la cámara ventricular, pero también este proceso sería responsable a largo plazo, de alterar la distensibilidad del miocardio propia de la remodelación.

En la fisiopatología del IAM cabe destacar el papel de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) activados, ya que estos están fuertemente implicados en la fisiopatología de la lesión isquémica, destacando los siguientes aspectos: existe una gran acumulación en el tejido isquémico y/o reperfundido (la infiltración de PMN en la zona isquémica comienza a los 60 minutos del inicio de la isquemia y aumenta de forma significativa durante más de 90 minutos después de la reperfusión), intervienen en la lesión endotelial y ante la estimulación de la agresión isquémica, aumentan su agregabilidad y oclusión de la microcirculación. Además los neutrófilos juegan un importante papel en la producción de daño consecuencia de la isquemia, por al menos tres mecanismos: liberación de radicales activos oxidativos (ROS), degranulación con liberación de elastasa y proteasas, y factores activadores de plaquetas [54, 63].

En relación al papel del sistema del complemento, se han descrito dos mecanismos primarios para explicar cómo la activación del complemento desencadena una lesión miocárdica. El primero está causado por la generación de factores quimiotácticos y anafilatoxinas (C3a, C4a y C5a), que estimulan a los mastócitos y a los basófilos a producir histamina, aumentando así la permeabilidad vascular, además de atraer a los neutrófilos a la zona isquémica. La activación del sistema del complemento también ocasiona un daño miocárdico directo a través de la formación del MAC (C5b-9), que ha sido detectado empleando técnicas inmunohistoquímicas en las zonas de infarto miocárdico, con un depósito relativamente escaso en las regiones adyacentes no isquémicas. Incluso pequeñas cantidades de C5b-9, por debajo de los niveles umbral necesarios para la lisis celular, pueden precipitar la translocación de la P-selectina a la superficie endotelial, contribuyendo más a la adhesión de los neutrófilos. Por otro lado se ha demostrado que los ROS (especies derivadas del oxígeno altamente reactivas) generados en la reoxigenación tienen la capacidad de activar la cascada del complemento al convertir C5 en la forma activa C5b. También es una observación importante el hecho de que la isquemia y la reperfusión pueden alterar metabólicamente el miocardio y las células endoteliales, aumentando su vulnerabilidad al ataque por parte del complemento [54, 64] .

Junto a todo lo anterior, la lesión por isquemia y la reperfusión se acompaña de la generación rápida de especies reactivas oxigenadas altamente tóxicas, con sitios de producción presentes en las células endoteliales, leucocitos reclutados, e incluso los propios miocitos. Esta producción de ROS puede alcanzar su máximo en minutos pero puede persistir durante muchas horas después de la restauración del flujo sanguíneo. La producción de estos ROS sobrepasa las capacidades limpiadoras de las enzimas antioxidantes protectoras, produciendo una peroxidación de los fosfolípidos de la membrana, la desnaturalización de las proteínas y la inactivación de enzimas homeostáticas clave. De este modo, las ROS tienen la capacidad de dañar directamente a los miocitos y a las células vasculares, y además están implicados en la puesta en marcha de la cascada inflamatoria, a través de la inducción de las citocinas. Han demostrado tener un efecto inhibitorio directo sobre la función cardíaca, y actúan como agentes quimiotácticos para los leucocitos, a través de la activación del complemento, la inducción de la expresión de P-selectina, estimulación de la liberación de citocinas [54, 62, 65, 66].

Por último debemos considerar un hecho fundamental en la fisiopatología de la isquemia y el IAM, la angiogénesis. La formación de nuevos vasos sanguíneos es un hecho fundamental, para poder aportar al tejido infartado el oxígeno y los nutrientes necesarios para sostener el metabolismo celular. La angiogénesis depende de una compleja interacción entre la matriz extracelular, las células endoteliales y pericitos, en respuesta a un desbalance entre factores pro-angiogénicos y factores anti-angiogénicos en el medio. El IAM está asociado con una precoz liberación de factores angiogénicos en las áreas dañadas. Numerosos estudios han determinado que el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la IL-8, el factor de crecimiento fibroblástico β (FGF β), todos potentes agentes angiogénicos, son rápidamente inducidos, expresados y liberados en el miocardio isquémico [54, 55, 62]. La expresión de VEGF está regulada por una familia de factores de transcripción inducidos por hipoxia (HIF) que incluyen el HIF-1 α , 2 α y 1 β . Estos regulan la respuesta a la hipoxia, la hipoglucemia, la insulina, y al IGF-1, uniéndose a secuencias promotoras de respuesta a la hipoxia [67].

3.1.7 Diagnóstico bioquímico del infarto agudo de miocardio

En la práctica clínica diaria el diagnóstico del IAM se basa en tres pilares básicos, que son las manifestaciones clínicas, el electrocardiograma y el estudio bioquímico de marcadores cardíacos de necrosis miocárdica.

La lesión irreversible de las mitocondrias y las membranas celulares que se produce en el IAM da lugar a la liberación en la sangre de numerosos marcadores plasmáticos, que se utilizan para diagnosticar y cuantificar el grado de necrosis miocárdica en un paciente. Los marcadores de la muerte del miocito cardíaco aparecen en el plasma cuando está comprometida la integridad de la membrana plasmática, entre estas enzimas figuran la lactato deshidrogenasa (LDH), la transaminasa glutámica oxalacética sérica (sGOT) y otras proteínas intracelulares, como las cadenas ligeras y pesadas de la miosina cardiospecífica la mioglobina, la creatinfosfocinasa fracción MB (CK-MB), y sobre todo las troponinas cardíacas T e I (cTnT y cTnI), que son las más específicas de daño miocárdico.

En la práctica clínica actual, los marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica que se recomiendan a nivel mundial y que se emplean para el diagnóstico y el manejo del IAM son las troponinas T e I, ya que son las más específicas [68-74]. El complejo de la troponina está en el filamento delgado del aparato contráctil del músculo estriado y juega un papel fundamental en la regulación del acoplamiento excitación-contracción en el corazón. La función del complejo de la troponina cardíaca es la modulación de la función contráctil del sarcómero en respuesta al calcio citosólico y la fosforilación de la proteína [70, 72, 73, 75]. Las troponinas T e I están codificadas por diferentes genes, con dos isoformas, una para el músculo esquelético y otra para el cardíaco. Y debido a su expresión cardio-específica, la TnI y TnT cardíacas se pueden utilizar, una vez que se liberan al torrente sanguíneo, como marcadores altamente específicos de daño miocárdico. Las troponinas se pueden detectar en sangre en un paciente que sufre un IAM a partir de las 4-6 horas del inicio del IAM, alcanzando un pico entre las 12 y las 20 horas y normalizándose entre los 7-10 días la cTnI, y a los 10-14 días la cTnT. La elevación de la troponina cardíaca en sangre depende de la severidad del daño miocárdico, incluyendo el tamaño y la intensidad del mismo [74, 76, 77].

Cualquier tipo de daño miocárdico, no sólo el de origen isquémico, puede dar lugar a la elevación de la troponina en sangre, como pueden ser arritmias severas, miocarditis, pericarditis, contusiones cardíacas, miocardiopatía dilatada, fallo cardíaco, miocardiopatía hipertrófica, y la hipertrofia del ventrículo izquierdo. También enfermedades no cardíacas pueden elevar las troponinas cardíacas, es el caso del embolismo pulmonar, la hipertensión pulmonar primaria, la insuficiencia renal crónica, el accidente cerebrovascular o la hemorragia subaracnoidea, o en la sepsis [70, 78, 79]. En los procesos agudos la elevación de troponina sigue un patrón ascendente, mientras que en las enfermedades crónicas no suelen existir cambios [74]. Por todo esto, cualquier cambio en los niveles sanguíneos de troponina debe ser interpretado siempre en el contexto clínico del paciente [70, 72, 74, 79].

Aunque los procedimientos bioquímicos convencionales empleados en el estudio de la troponina cardíaca en sangre tienen un alto valor diagnóstico para el IAM, su máxima sensibilidad se encuentra en las primeras horas tras el inicio del dolor torácico, y además, con estas técnicas clásicas, para poder diagnosticar el IAM es necesaria una monitorización prolongada durante un período de 6 a 12 horas, con análisis seriados en sangre de este marcador [70, 72, 75]. Esta limitación ha hecho que los fabricantes de estas pruebas hayan comenzado a desarrollar sucesivamente ensayos más sensibles, de manera que en la actualidad se están incorporando a la práctica clínica una nueva generación de pruebas de alta sensibilidad para determinación de las troponinas cardíacas [68-72, 79-81]. Estos ensayos de alta sensibilidad permiten detectar el daño miocárdico antes que con los test convencionales, los cuales necesitaban 4 horas, después del evento isquémico, para poder detectar niveles circulantes de troponina. El uso de las técnicas de alta sensibilidad permite diagnosticar el IAM ya en las primeras horas después del inicio de los síntomas, de manera que incluso detectan troponina en sangre en personas sanas, de modo que para estos ensayos se establece incluso un umbral de normalidad para la troponina en sangre, por encima del cual hablaríamos de IAM [68, 69, 81, 82].

3.2 Epidemiología de la muerte súbita cardíaca de origen isquémico

Dentro del SCA, la MSC de origen isquémico se puede ver como una forma de IAM complicado, aunque clásicamente, esta se ha incluido como una forma más de SCA, junto con la angina inestable y el IAM [48, 49, 51].

La causa más común de MSC es la cardiopatía isquémica (CI), y de ella fundamentalmente el IAM, que representa el 80% de todas las MSC [2, 5, 6, 8, 15, 26, 28, 29, 32]. Debido a esto cuando se estudia el comportamiento y los factores de riesgo de MSC de origen isquémico, nos encontramos que estos no son otros que los factores de riesgo cardiovascular ya estudiados, y que se constituyen también como factores de riesgo para la presentación de MSC de origen isquémico.

En la MSC de origen isquémico la diferencia de sexos es igual a otras formas de CI, existiendo una proporción 2/3 a favor de los varones [7, 32]. Esta diferencia es debida a que la causa más frecuente de MSC es la cardiopatía isquémica, y a que las mujeres están protegidas frente a esta durante su época fértil [11, 17]. En relación a la edad, al igual que la CI, la incidencia de MSC de origen isquémico aumenta con la edad, siendo muy rara en menores de 35 años, y teniendo un pico después de los 45 años [11, 15, 17, 51, 83].

Entre los marcadores que nos pueden ayudar a predecir una MSC que no se produce de manera inmediata tras un IAM, el más importante es la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, de modo que cuando esta es baja (<30%) el riesgo de MSC es mayor.

Aunque se ha observado que, tanto el IAM como la MSC de origen isquémico, pueden ocurrir a cualquier hora del día, es frecuente que sigan un ritmo circadiano existiendo un pico de incidencia en las primeras horas de la mañana (entre las 7 y las 11 horas), y una baja frecuencia por la tarde y noche [17, 29, 51, 83]. En este aspecto parece que fundamental la influencia de las fluctuaciones del tono simpático y/o parasimpático en los episodios de isquemia, en las arritmias y en la MSC isquémica [29]. También se ha demostrado una mayor incidencia de MSC durante el invierno, particularmente asociada a las bajas temperaturas (<0°C) [17].

Algo similar ocurre con los factores desencadenantes, estos son coincidentes en los casos de IAM y de MSC de origen isquémico, destacando sobre todo los grandes esfuerzos y las situaciones de estrés [51]. En este sentido el predominio de la actividad simpática facilita el inicio de arritmias ventriculares [29].

La incidencia de MSC en individuos con CI es de un 5% a los dos años de seguimiento y de un 2% a los 5 años [12], con 1-2 muertes por cada 1000 personas y año [30]. La CI, y en concreto el IAM, tiene una alta letalidad, la cual siendo súbita en su presentación, puede aparecer tanto en la fase aguda del IAM, o de forma más tardía en pacientes con CI crónica e IAM antiguos, concentrándose la mayoría en los primeros 6 meses tras el IAM [84], aunque el mayor riesgo de MSC se tiene en los primeros 30 días (sobre todo asociado a fallo cardíaco o a nuevos eventos isquémicos) [17]. De este modo la letalidad del IAM se encuentra entre el 30-40% en los primeros 28 días después del IAM, alcanzando el 68% en hombres mayores de 75 años, y el 77% en mujeres. Además se ha constatado que el 50% de las MSC que ocurren en los primeros dos años tras un IAM se producen en los primeros seis meses, y en pacientes que han sobrevivido a un paro cardíaco extrahospitalario, que tienen insuficiencia cardíaca, o que han sufrido una TV o FV tras un IAM y se han recuperado, la MSC se produce con mayor frecuencia entre los 6 y 18 meses [13].

Entre los pacientes que fallecen por una CI, la MSC es el modo de fallecimiento en más del 50% de ellos, siendo además la primera manifestación de enfermedad en un 20-30% de los casos [5, 7, 11, 13-17, 28-30]. Además, el 65% de las muertes por IAM se producen fuera del hospital [51].

Teniendo en cuenta toda esta información, podemos concluir diciendo que la MSC de origen isquémico supone una entidad de gran repercusión clínica y social en nuestro medio, y con muchas particularidades que debemos conocer.

3.3 Factores de riesgo de la muerte súbita cardíaca de origen isquémico

La incidencia de MSC de origen isquémico es particularmente frecuente en individuos que presentan una serie de características, que pueden ser consideradas

como factores de riesgo. Entre estas destacan el tener antecedentes de CI, el tener una fracción de eyección de ventrículo izquierdo reducida (<30%), la insuficiencia cardíaca, la hipertrofia del ventrículo izquierdo, la elevada frecuencia cardíaca, y pacientes que han sobrevivido a un paro cardíaco extrahospitalario, o que que han presentado una TV o FV en la fase de convalecencia de un IAM [17]. Junto con estos datos específicos, considerar que cualquier individuo que tenga factores de riesgo cardiovascular tendrá riesgo de sufrir una MSC de origen isquémico como ya se ha comentado con anterioridad [13], destacando la edad (>45 años), el sexo masculino, el ser fumador, la hipertensión, la diabetes mellitus, la hipercolesterinemia, la obesidad y la historia familiar de enfermedad coronaria, y debemos tener en cuenta que estos factores de riesgo son fuertes predictores a nivel poblacional, pero no son lo suficientemente específicos para determinar un riesgo individual, debido a la relativamente baja tasa de eventos de este tipo [17]. En este sentido cabe destacar que la mayoría de los casos de MSC se dan en pacientes con CI diagnosticada pero clasificada de bajo riesgo (33%), y en pacientes sin enfermedad coronaria previa conocida (30%), dejando un porcentaje menor del 25% para aquellos casos que consideramos de mayor riesgo (historia de IAM, y/o de arritmias, fracción de eyección del ventrículo izquierdo <30%, etc.) [17, 30]. Este hallazgo está en relación a que son placas pequeñas inestables que se rompen y trombosan, las que más se asocian a MSC isquémica.

3.4 Fisiopatología de la muerte súbita cardíaca de origen isquémico

En la MSC de origen isquémico, como ocurría en los casos de MSC, las arritmias ventriculares son el mecanismo que con mayor frecuencia produce la muerte, siendo más del 90% de los casos, esta arritmia fatal, una fibrilación ventricular, que aparece espontáneamente, o que es consecuencia de una taquicardia ventricular sostenida que ha degenerado [5, 14-17, 29, 85]. En la cardiopatía isquémica, la incidencia de MSC es particularmente alta en la fase aguda del IAM, siendo también frecuente tanto en la fase de convalecencia tras sufrir un IAM, como en la fase crónica de esta enfermedad. Atendiendo a esto, son dos los mecanismos principales que originan las arritmias ventriculares mortales en la cardiopatía isquémica.

El primero sería una isquemia miocárdica aguda, asociada generalmente a la rotura de una placa, y a la oclusión de una o más arterias coronarias principales, que da lugar directamente a una FV, o que genera una taquicardia ventricular sostenida (TVS) que degenera a una FV, en un paciente que suele presentar una función ventricular izquierda normal o ligeramente disminuida. Además, casi en un 30% de casos la MSC es la primera manifestación del SCA, y además los primeros 10 minutos de isquemia son los que más predisponen a la aparición de FV [14]. En la MSC que ocurre en la fase aguda de un IAM es la isquemia miocárdica por tanto el hecho fundamental, siendo muy importante tanto el grado como la duración de la misma. Este mecanismo de MSC de origen isquémico es muy frecuente, de modo que en estudios de autopsias por MSC en pacientes con CI, se encuentran cambios agudos en la morfología de las placas coronarias, como puede ser la formación de un trombo fresco o la rotura de la placa, en más del 50% de los casos. Esto pone de manifiesto que, aproximadamente, sólo en el 50% de los casos de MSC de origen isquémico se deben a un ataque isquémico agudo [5, 11, 14, 15, 18, 28]. La isquemia generada por la oclusión coronaria produce alteraciones iónicas y metabólicas, como acidosis, que generan una acumulación de sustancias producidas por la puesta en marcha de un metabolismo anaeróbico (potasio, adenosina, o CO₂) en el espacio extracelular. Esto a su vez modifica las características electrofisiológicas de los miocitos adyacentes a la zona isquémica y/o infartada. Todo esto favorece la aparición de reentradas, de TVS y de FV [14, 86]. Además la isquemia y el infarto causan alteraciones en el tono simpático y parasimpático del corazón, a causa de lesiones neuronales y trastornos metabólicos. Esta denervación que puede iniciarse pocos minutos después del comienzo de la isquemia, aumenta la heterogeneidad de la repolarización, lo que favorece el desarrollo de arritmias por reentrada [29]. Esta fase aguda, siempre que no haya existido una MSC inmediata, se podría ampliar hasta las primeras 24-48 horas tras el IAM, tiempo durante el cual el riesgo de arritmias y MSC es muy importante (aunque menor que en las primeras 24 horas) debido a que esta es una fase dinámica en la cual existe isquemia, reperusión, variaciones en la velocidad de conducción local, y cambios en la repolarización. Procesos todos ellos que interaccionan en un patrón inestable, creando un sustrato arritmogénico que además es cambiante [30]. Pasadas las primeras 24 horas se cree que el

mecanismo que produce las arritmias malignas depende más del aumento del automatismo que de la reentrada [14]. Si existiese reperfusión antes de la MSC, la aparición de arritmias está relacionada con la duración de la isquemia, el tamaño de la zona isquémica, la frecuencia cardiaca, la presencia de hipertrofia ventricular y la concentración de potasio extracelular [14]. Estas son las características fundamentales de la MSC que acontece en la fase aguda del IAM, pero debemos considerar que con mucha menor frecuencia la MSC en esta fase puede ser consecuencia de un bloqueo cardiaco o por asistolia, especialmente si la arteria coronaria derecha está implicada [12].

El segundo mecanismo capaz de generar una arritmia mortal, y que está presente en casi el otro 50% de los casos de MSC de origen isquémico, se da en pacientes que padecen una miocardiopatía isquémica tras haber sufrido un IAM, es decir pacientes que están fuera de la fase aguda del infarto. Este periodo se puede dividir a su vez en dos tiempos, la fase de convalecencia precoz, que se iniciaría 48 horas después del IAM y que continuaría durante semanas o meses después de la fase aguda, durante la cual se está produciendo la estabilización de la cicatriz; y la fase crónica tras el IAM, en la que la cicatriz ya se ha formado y estabilizado en el miocardio. Destacar que tras un IAM, se mantiene un elevado riesgo de arritmias y MSC durante los primeros 6 meses, y que la fibrosis durante su estabilización y una vez establecida constituye un sustrato ideal para la conducción anisotrópica, la reentrada y las arritmias [14, 86]. En la fase de convalecencia precoz, el riesgo de arritmias y de MSC es especialmente importante en los primeros 2-3 meses, sobre todo asociado con el tamaño del IAM y con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo. El hecho de que aparezcan arritmias en esta fase es además un elemento predictor de mayor riesgo de MSC. En la fase crónica, el riesgo de MSC es menor, y se asocia sobre todo, y además de a la fibrosis, a la remodelación ventricular y a la posible evolución hacia una insuficiencia cardíaca, siendo una fracción de eyección inferior a un 30-40% el predictor individual más potente de MSC. Estos pacientes tienen mayor probabilidad de presentar TVS, que pueden degenerar a una FV, debidas a bucles de reentrada alrededor de las áreas de miocardio que están en proceso de cicatrización o ya fibróticas, y que constituyen un importante sustrato arritmogénico. En estos pacientes que ya han sufrido un IAM, el riesgo de MSC

está asociado a tres factores: presencia de isquemia residual (peligro de nuevo accidente isquémico), mala función ventricular, e inestabilidad eléctrica por alteraciones electrofisiológicas permanentes, que con o sin isquemia suponen un riesgo de arritmia [5, 14, 15, 29, 30].

Por tanto la isquemia, la necrosis y la fibrosis son importantes sustratos arritmogénicos, y son el origen de la gran mayoría de las MSC asociadas a la CI, procesos determinantes de los hallazgos de autopsia en la MSC de origen isquémico en fase aguda: trombosis coronaria (presente en el 50% de casos de autopsias por MSC de origen isquémico) y/o IAM (hallazgo en el 20-25% de casos de autopsias por MSC de origen isquémico). De otra parte, en fase crónica, las alteraciones morfológicas más frecuentes serían: la enfermedad ateromatosa coronaria significativa o severa (hallazgo en el 40-85% de casos de autopsias por MSC de origen isquémico); y/o infarto de miocardio cicatricial más o menos antiguo (hallazgo en el 40-70% de casos de autopsias por MSC de origen isquémico) [7, 9, 11, 12, 15, 17, 29, 30].

En este punto cabe hacer mención a la MSC que acontece en pacientes que sufren insuficiencia cardiaca (IC), ya sea de origen isquémico o de otras etiologías, en los cuales aproximadamente el 40% de los que fallecen lo hacen de manera súbita. En estos la MSC se produce, también, como consecuencia de una arritmia ventricular letal, tipo fibrilación ventricular [15].

Considerar que en una pequeña proporción de casos la MSC que sigue a un IAM no es consecuencia de una arritmia, sino de una complicación del IAM que produce un fallo mecánico del corazón, que cesa en su función de bomba, produciéndose una insuficiencia cardíaca aguda. Este fallo mecánico puede ser consecuencia, por ejemplo, de la rotura de un músculo papilar, por defectos del movimiento septal, o consecuencia de una disfunción valvular de origen isquémico. Otro mecanismo de MSC que se observa en ocasiones, es el secundario a otra complicación del IAM como es la rotura de la pared libre del ventrículo izquierdo debida a una necrosis transmural. En estos casos la MS es consecuencia de un hemopericardio y un taponamiento cardíaco [87].

No se podría acabar de hablar de la fitopatología de la MSC isquémica sin tener en cuenta, que con mucha frecuencia, cuando se produce una MSC de este tipo, existen factores que han actuado como moduladores y/o desencadenantes de la muerte, de modo que han sido ellos los que actuando sobre un miocardio vulnerable han precipitado MSC. Entre estos factores, cuando hablamos de MSC de origen isquémico, destaca cualquier situación que suponga un aumento de la actividad simpática, siendo lo más frecuente la que se produce como consecuencia de un estrés físico o psíquico, que puede actuar como desencadenante de una MSC, al producir este un aumento en la demanda de oxígeno en el miocardio, precipitando la arritmia maligna tanto en fase aguda como en la fase crónica del infarto de miocardio [29, 51].

3.5 Diagnóstico postmortem de la cardiopatía isquémica y del infarto agudo de miocardio

Como ya hemos podido analizar la MSC de origen isquémico, es una entidad de una alta incidencia en la práctica médico forense.

El diagnóstico postmortem del IAM ya establecido es una cuestión de fácil resolución para el patólogo, pero hay que tener en cuenta que la lesión isquémica miocárdica se manifiesta por una serie de cambios a nivel macroscópico y microscópico, que no aparecen de forma inmediata tras el inicio de la isquemia, si no que para se puedan presentar, y por tanto detectar, precisan de un tiempo de supervivencia mínimo. Por este motivo estos cambios, que son la base del diagnóstico de la MSC isquémica, no pueden ser observados hasta que no ha transcurrido un tiempo prudencial entre la instauración de la isquemia y la muerte. Con las técnicas histológicas clásicas (como la hematoxilina-eosina) la isquemia/infarto no se puede detectar hasta pasadas al menos 6 horas de su inicio [23, 26, 88-90, 90-96]. En consecuencia el diagnóstico del IAM es particularmente difícil para el patólogo forense cuando la muerte se produce en las primeras 6 horas después del inicio de los síntomas; problema que se planteará en la gran mayoría de casos de MSC isquémica, en los que este lapso de tiempo no es tan largo, produciéndose la muerte sin que dé tiempo a que se pongan de manifiesto cambios a nivel miocárdico macroscópicos o microscópicos. Se podría

hablar aquí de un periodo de incertidumbre semejante al que Tourdes definió para la vitalidad de las heridas, cuando estas se producen en los periodos agónicos. Pero además debemos de tener en cuenta que, como ya hemos visto, el 90% de casos de MSC, incluida la isquémica, el fallecimiento se produce por una fibrilación ventricular, que tiene su origen en la isquemia miocárdica, con lo que los cambios morfológicos pueden ser incluso menos evidentes. Por este motivo se necesitan marcadores diagnósticos de lesión miocárdica isquémica precoz, esto es marcadores que permitan hacer un diagnóstico en casos en los que la supervivencia tras el inicio de los síntomas es menor de 6 horas. De este modo los métodos para demostrar la presencia de lesión isquémica lo más precozmente posible son de una gran importancia médico-legal, siendo este un campo de investigación, en el que el Departamento de Medicina Legal de Granada ha sido pionero, proponiendo métodos bioquímicos complementarios al diagnóstico microscópico a partir de finales de los años setenta del pasado siglo, tratándose siempre de buscar marcadores sensibles, específicos y precoces, de modo que los IAM de corta evolución o que producen una muerte inmediata puedan ser reconocidos.

Para el diagnóstico postmortem de lesión isquémica miocárdica precoz se han propuesto multitud de métodos, pudiéndose agrupar éstos en cinco tipos, siendo los dos primeros los que corresponden a los métodos clásicos:

3.5.1 Métodos morfológicos

Incluyen el estudio de la forma, transparencia, lustre, apariencia de la superficie y consistencia del miocardio, descritas macroscópicamente o tras el análisis de los cambios de las fibras musculares o del intersticio mediante microscopio óptico.

a. Estudios macroscópicos

La lesión isquémica miocárdica se manifiesta macroscópicamente por un cambio del color y la consistencia de la zona afectada, de manera que los rasgos más precoces para reconocer macroscópicamente el infarto son [22, 89, 97, 98]:

- Edema: La tumefacción de la zona infartada ocurre precozmente, y al cortar el ventrículo se observa el miocardio afecto con una apariencia más groseramente fibrilar que la normal. Los haces musculares dan la apariencia de estar separados, con pérdida de brillo y coloración grisácea.
- Color: La alteración del color puede comenzar a verse al cabo de 8-9 horas de que se inicie la isquemia, lo que implica que el fallecido ha tenido que mantenerse vivo durante este espacio de tiempo. El miocardio infartado es más pálido que el normal, tiene color gris y aspecto opaco. Con posterioridad el color cambia a rojo castaño oscuro, seguido de un rojo claro, hasta que el miocardio se necrosa y entonces presenta color amarillo. Esta coloración amarillenta rodeada de una zona de hiperemia, corresponde al infarto establecido, y no aparece hasta que han transcurrido 24-48 horas tras la oclusión. Después la zona de infarto adquiere un aspecto gelatinoso y finalmente fibroso blanquecino. A veces se observa que el miocardio adquiere un aspecto “atigrado”, alterando bandas rojas y pálidas, esto aparece en estados avanzados y siempre después de 24 horas. En ocasiones pueden aparecer áreas focales de hemorragia de color rojo púrpura, es al caso de un infarto hemorrágico, y este hallazgo sugiere daño por reperfusión [18].

Con estos datos, la detección del IAM postmortem sería así muy sencilla, el problema es que para que estos cambios macroscópicos sean detectables de forma evidente en la autopsia, han tenido que transcurrir generalmente en torno a 12 horas entre el inicio de la isquemia y el momento de la muerte lo que en la mayoría de casos de MSC no ocurre [22, 89-91, 97-99]. Además sólo en el 20-25% de los casos de MSC de origen isquémico muestran IAM, entre los cuales el infarto es transmural y macroscópicamente identificable en el 50% de los casos; y subendocárdico y sólo identificable histológicamente en el resto. En el 40-70% de casos se encuentra IM cicatricial [9, 11, 12].

Destacar que en la autopsia de la MSC, como ya hemos comentado con anterioridad, además de estudiar el miocardio se deben valorar las arterias coronarias, que deben ser disecadas mediante cortes transversales a intervalos de 2-3 mm para su estudio macroscópico. Los segmentos arteriales con una luz de

menos de 1 mm son equivalentes, al menos a una estenosis de un 75%, y tal grado de estenosis siempre debe ser documentado microscópicamente [11, 18, 26]. Recordar que las arterias calcificadas no se deben seccionar, han de ser extraídas enteras del corazón y decalcificadas durante al menos 24 horas antes de ser seccionadas. Los hallazgos básicos que se requieren para el diagnóstico de CI por arterioesclerosis coronaria son la presencia o ausencia de trombosis coronaria, la severidad y la extensión de las lesiones ateromatosas coronarias crónicas, y la presencia o ausencia de cicatrices miocárdicas o de infarto agudo. Al menos un segmento de una arteria coronaria principal debe tener más de un 75% de estenosis para poder hacer el diagnóstico de CI, lo que aparece en un 40-85% de los casos de MSC [11, 18, 26]. No obstante, el número de vasos afectados también es importante en el riesgo de MSC, de modo que cuanto más vasos afectados existan el riesgo es mayor (en casos de MSC isquémica el 50% tienen enfermedad de tres vasos y el 30% de dos) [29]. Destacar que en autopsias por MSC en pacientes con CI, se encuentran cambios agudos en la morfología de las placas coronarias, como puede ser la formación de un trombo o la rotura de la placa, en más del 50% de los casos, dato indicativo de MSC de origen isquémico [11, 12, 15, 18], aunque no se pueda detectar el IAM. La ausencia de un trombo fresco en un IAM puede ser consecuencia de la lisis espontánea del mismo [18].

Además, sobre el corazón en fresco se han realizado clásicamente técnicas macroenzimáticas, como es la que emplea las sales de neotetrazolio. Esta se basa en que el miocardio vivo contiene coenzimas deshidrogenasas que reducen una solución de neotetrazolio para producir un compuesto formazán rojo brillante. En las áreas de infarto, las células necrosadas no tienen actividad deshidrogenasa, con lo que no se deposita el indicador, quedando la zona de color amarillo pálido. Por tanto, la reacción de la deshidrogenada puede ser útil para la identificación macroscópica de zonas lesionadas por la isquemia, y además con ella podemos detectar el IAM en torno a las 4-9 horas tras el inicio de la isquemia, en ocasiones antes de que se pongan de manifiesto los cambios macroscópicos y microscópicos [22, 89, 99, 99-102]. En la práctica diaria, este método no es recomendable para ser usado de rutina, y realmente puede ser considerada una técnica de confirmación más que de diagnóstico. [23, 94, 99, 103]. Además su sensibilidad y

especificidad no está clara, ya que se puede afectar por factores agónicos y otros cambios postmortem [94].

b. Estudios microscópicos

Los cambios precoces del IAM observados mediante microscopia óptica, son en principio inespecíficos, de manera que pueden sugerir o hacernos sospechar cambios isquémicos agudos, no siendo diagnósticos en absoluto [22, 64, 89, 102]. Entre ellos destacan el edema intersticial y congestión (presentes 2 horas tras el inicio de la isquemia), pequeñas hemorragias, y bandas de contracción, que aunque representan lesión miocárdica muy reciente (1-2 horas), y se observan con más frecuencia en muertes de origen cardíaco, carecen de especificidad para el diagnóstico de la misma. Otros hallazgos precoces (1-2 horas) son la fragmentación de fibras y su ondulación, datos también inespecíficos.

La infiltración de PMN, un signo que implica mayor especificidad, aunque no es diagnóstico de IAM, se puede observar entre 1 y 4 horas tras el inicio de la isquemia [89, 93, 98, 102, 104].

La necrosis muscular de coagulación temprana (propia del IAM) se puede observar 6-12 horas tras el inicio de los síntomas, alcanzándose la necrosis completa a las 24-72 horas, siendo ésta el signo inequívoco que permite hacer el diagnóstico de IAM [22, 89, 102, 102, 104]. Entre los 4-7 días se desintegran las miofibrillas y se inicia la fagocitosis por los macrófagos; aparecen los primeros fibroblastos y comienza a verse tejido de granulación en el borde del infarto, también se inicia la formación de neovasos. A las 6-8 semanas el área de infarto se habrá convertido en una firme cicatriz de tejido conectivo. En cualquier caso para que el IAM pueda ser detectado por la microscopía clásica, ha tenido que transcurrir un mínimo de 6 horas desde que se inició la isquemia, y esto en circunstancias favorables [22, 89, 102, 102]. Destacar que estos cambios a los que hemos hecho referencia se van a ver, habitualmente utilizando una tinción clásica como puede ser la hematoxilina-eosina.

3.5.2 Métodos histoquímicos

Estos métodos están basados en las características tincionales de los tejidos, usando técnicas de inclusión en parafina o de congelación. La tinción con hematoxilina-eosina, es muy usada para la identificación de los IAM. Con ella, además de que se puedan ver los signos inespecíficos comentados con anterioridad, y la infiltración por PMN, y antes de que se vea la necrosis, se aprecia un incremento de la eosinofilia citoplásmica, resultado del incremento de la unión de la eosina a las proteínas plasmáticas, considerándose esto un signo precoz de lesión isquémica [98]. La cuestión fundamental es que este conjunto de cambios específicos, como ya hemos dicho, no se aprecian hasta que han transcurrido al menos 5-8 horas tras el inicio de la isquemia [23, 26, 88-90, 90-96].

La tinción con tricrómico de Masson también ha demostrado que puede ser un método útil en la detección del IAM, y mediante este vemos el tejido necrótico con citoplasma azul y el miocardio viable con citoplasma rojo, y a menudo, se observan células de citoplasma púrpura que rodean al área necrótica, lo que corresponde a la frontera isquémica. Sin embargo, los resultados dependen de qué método se utiliza, y el tiempo que se necesita para detectar estos cambios no es inferior a las 6-8 horas [89, 91, 92, 104].

Otras opciones como la tinción con hematoxilina fucsina básica-ácido pícrico han demostrado ser útiles para la detección del IAM de forma más precoz (entre 30 minutos y 4 horas después del inicio de la isquemia) [22, 89, 105], apreciándose la zona de isquemia de color rojo carmesí brillante, en contraste con la coloración amarilla del miocardio normal. El problema es que es un método no adecuado para uso de rutina, y además su sensibilidad y especificidad están todavía en controversia, porque se puede afectar por factores agónicos y otros cambios postmortem [94].

Otra técnica complementaria es el método del naranja de acridina. Las criosecciones de miocardio sano teñidas con naranja de acridina muestran un color marrón dorado fluorescente, que se torna verdoso cuando aumenta el tiempo de isquemia. Los cortes incluidos en parafina de miocardio sano muestran una fluorescencia verde oliva, que vira a amarillo con la isquemia[98]. Este método

podría ser más sensible y fiable que la hematoxilina eosina, para confirmar el IAM cuando hay duda o es esta es negativa [23], ahora bien es un test que ha sido objeto de discusión por su escasa sensibilidad, y que no se usa en la práctica habitual [103].

De este modo, y basándose en métodos morfológicos (macroscópicos y microscópicos) en la mayoría de las MSC se puede hacer un diagnóstico de cardiopatía isquémica como causa de la muerte, aunque con diferentes grados de confianza [18]:

- Evidencia cierta de evento isquémico agudo: Cuando los hallazgos patológicos consistan en IAM y/o trombosis coronaria aguda.
- Evidencia cierta de cardiopatía isquémica: Cuando existe una clara evidencia infarto de miocardio antiguo (cicatrizado con fibrosis), junto una estenosis significativa (luz del vaso menor de 1mm de diámetro o estenosis mayor del 70%) en al menos una arteria coronaria principal, todo esto sin trombo fresco. En estos casos se asume que el mecanismo de la muerte es una arritmia.
- Evidencia de cardiopatía isquémica: Cuando solamente existe una estenosis significativa (luz del vaso menor de 1mm de diámetro o estenosis mayor del 70%) en al menos una de las arterias coronarias principales.

3.5.3 Métodos inmunohistoquímicos

La limitación en el diagnóstico postmortem del IAM precoz (<6 horas) mediante técnicas histológicas convencionales, junto con los recientes avances en el campo de la tecnología inmunohistoquímica, la implantación prácticamente universal en los laboratorios de Patología, así como la posibilidad de obtener anticuerpos frente a una amplia variedad de antígenos, ha hecho que estas técnicas sean empleadas para la detección de la isquemia miocárdica en fases precoces. La ventaja fundamental de estos métodos en el diagnóstico de la lesión isquémica

precoz, es que muchos de los marcadores usados pueden ponerse de manifiesto incluso minutos después del inicio de la isquemia, pero son técnicas, que no son fáciles de utilizar de rutina, y en ocasiones difíciles de interpretar debido a artefactos causados por la autólisis [94, 96, 106, 107].

En la actualidad, los marcadores más utilizados los podemos clasificar en dos grupos [1, 90, 96]:

- a. Proteínas estructurales cardíacas: Diferentes estudios relativos a los cambios del citoesqueleto cardíaco y proteínas contráctiles, efectuados tanto en el modelo animal como humano, han sugerido la posibilidad de utilizar las alteraciones de ciertas proteínas como marcadores precoces para el diagnóstico postmortem de la isquemia miocárdica en casos de MSC. Entre estas proteínas cabe mencionar:
 - Desmina: Se observa una disminución o pérdida de esta proteína en las áreas de isquemia establecida, aunque en casos de MSC muy precoz no muestra resultados significativos, siendo en cualquier caso más sensible ante la presencia de trombosis coronaria [90]. Otros autores sostienen que esta proteína comienza a disminuir a los 30 minutos del inicio de la isquemia, desapareciendo completamente a los 90-120 minutos [104].
 - Mioglobina: En las zonas isquémicas se produce una pérdida de mioglobina [96] en casos de MSC precoz; también se muestra más sensible en casos que presentan trombosis coronaria [90].
 - Actina: Se produce una pérdida de inmunoreactividad en las zonas de isquemia, pudiendo observarse incluso tras periodos de isquemia cortos de entorno a 1 hora [90].
 - Troponina I cardíaca (cTnI): En áreas de infarto establecido hay una clara disminución de la inmunoreactividad a esta proteína [64, 95, 108]. En zonas con sospecha de lesión isquémica precoz se puede observar una ligera depleción localizada [94].
 - Troponina T cardíaca (cTnT): En casos de IAM se observa una depleción de esta proteína en las áreas lesionadas [95]; en casos de MSC precoz la lesión isquémica se puede demostrar en algunas ocasiones [109]. Sin

embargo otros autores sostienen que esta proteína es de menor utilidad y sensibilidad, observándose una depleción de esta en zonas de miocardio normal [93, 96].

- Troponina C: En áreas de infarto establecido hay una clara disminución de la inmunoreactividad a esta proteína [96].
 - Creatinincinasa fracción MB (CK-MB): Se puede demostrar la pérdida difusa de esta proteína en determinadas zonas, que sugiere un daño miocárdico precoz [94, 109].
 - Proteína fijadora de ácidos grasos cardíaca (FABP): En áreas de infarto establecido hay una disminución de la inmunoreactividad a esta proteína [96].
- b. Mediadores de la inflamación y angiogénesis: El papel de diferentes moléculas en la inflamación y en la patogénesis y evolución IAM ha suscitado en los últimos años un creciente interés terapéutico; habiéndose demostrado alteraciones de ciertos componentes en casos de infarto de miocardio reciente. Entre las moléculas que se han estudiado mediante técnicas inmunohistoquímicas destacan:
- Factores del complemento: El tejido cardíaco dañado activa el sistema del complemento, siendo este el que causa la infiltración de neutrófilos. Se ha observado que el C5b-9, el llamado complejo de ataque a membrana (MAC), presenta tinciones intensamente positivas en áreas de infarto. En casos de MSC, para que aparezca positividad y la lesión sea evidenciable, el tiempo de isquemia debe ser superior a 30-40 minutos [26, 90, 96, 110], aunque otros autores establecen que el tiempo mínimo de isquemia debe ser de 2-4 horas [64]. En casos MSC con corto periodo de supervivencia se puede detectar una acumulación limitada a unas pocas fibras, correspondientes a zonas de isquemia [94]. En cualquier caso esta molécula se muestra útil para detectar la lesión isquémica precoz (<6 horas). Otro factor del complemento, el C4d, también ha demostrado ser útil en el diagnóstico del IAM precoz [93].
 - Fibronectina: Sólo ha demostrado poder en la discriminación de la lesión isquémica en casos con un largo periodo de supervivencia tras la oclusión

coronaria [94], aunque otros autores sostienen que se puede observar de forma precoz tras la isquemia [96].

- Fibrinógeno: En áreas de infarto establecido hay un aumento de la inmunoreactividad a esta proteína [96].
- Inductor extracelular de metaloproteasas de matriz (EMMPRIN) y metaloproteasas de matriz (MMPs): Se observa un aumento en la expresión en tejido miocárdico de MMP-2 y MMP-9 después del IAM, en áreas de lesión isquémica [111].
- Factor inducido por hipoxia 1α (HIF- 1α) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y eritropoyetina (EPO): EL HIF- 1α es un factor de transcripción del VEGF, el cual se expresa en situación de hipoxia. *In vivo*, en biopsias de ventrículo izquierdo tomadas durante cirugía coronaria, se ha demostrado que el HIF- 1α aumenta en zonas de isquemia y en áreas de IAM reciente y en evolución, y el VEGF aumenta su expresión en situaciones de isquemia aguda y de IAM en evolución [112]. En muestras forenses, el HIF- 1α , el VEGF y la EPO son detectables inmunohistoquímicamente en la fase más precoz del IAM, aproximadamente 2 horas después del inicio de la isquemia, aunque algunos autores sostienen que pueden ser detectados con un periodo de supervivencia de 30 minutos; sin embargo en casos de MSC muy rápidas, en las que no hay evidencia de lesión morfológica pueden ser o no observado [94, 107]. Esto puede estar en relación con que en estos casos la causa de la muerte sea una arritmia fatal, con lo que no existe isquemia localizada.
- Proteína S100A1: Esta es una molécula que regula el ciclo del calcio en el miocardiocito, la cual se ha demostrado estar disminuida o totalmente depleccionada en zonas de isquemia y en áreas de infarto, y esto puede ser detectado de forma precoz, 30 minutos después del inicio de la isquemia [91].
- Factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$): se ha demostrado estar aumentado en IAM e infartos de miocardio recurrentes [113].

Otras proteínas estudiadas han sido la vinculina, laminina, ceruloplasmina, la proteína C-reactiva, la alfa-1-antitripsina, la albúmina, la caspasa 3 (apoptosis), la

expresión de cicloxigenasa 1 y 2, el factor de crecimiento fibroblástico beta (FGF-b) [109, 114].

Por tanto en el diagnóstico de la lesión isquémica precoz en la MSC se han empleado, y se siguen empleando múltiples marcadores, muchas veces con resultados contradictorios como hemos podido ver, lo que indica que no existe ninguno que tenga una alta sensibilidad y especificidad. Ahora bien estas técnicas pueden ser usadas para confirmar casos de MSC con sospecha de IAM, en los que las técnicas clásicas no han podido poner de manifiesto macroscópicamente o microscópicamente la lesión isquémica. Pero el uso de un solo marcador no nos va a aportar información suficiente para poder hacer el diagnóstico postmortem de la lesión isquémica precoz, por ello lo razonable y lo recomendado es el uso de varios marcadores, que pudieran aportar suficiente evidencia de isquemia/necrosis miocárdica, y de manera precoz [90, 91, 94, 104-106].

3.5.4 Métodos bioquímicos

Los estudios bioquímicos postmortem se han convertido en una parte esencial de la patología forense y tanatoquímica, contribuyendo a la determinación de la causa de la muerte, como una prueba complementaria más, y sobre todo cuando los cambios fisiopatológicos implicados en el proceso de la muerte no pueden ser detectados por métodos morfológicos [78, 115, 116].

En el IAM, el miocardio dañado libera una serie de proteínas, debido a que las membranas de los miocardiocitos se hacen más permeables por la isquemia y la necrosis, permitiendo la salida de componentes intracelulares, que difunden primero al espacio intercelular y finalmente a los vasos sanguíneos. Estos marcadores suponen una ayuda inestimable en la resolución de los problemas diagnósticos en los casos de muerte súbita cardíaca con un escaso periodo de supervivencia tras el inicio de los síntomas (<6 horas), donde los cambios macro y microscópicos son inexistentes, y sin embargo, si podemos poner en evidencia cambios a nivel bioquímico, de ahí el gran interés de este tipo de marcadores. Los problemas que plantean las técnicas bioquímicas en el cadáver son los siguientes, [114]:

- Establecer los rangos de normalidad de los diferentes parámetros a evaluar. Debido a los procesos que se instauran inicialmente en la fase agónica y después en la autólisis y putrefacción, muchos compuestos sufren importantes transformaciones bioquímicas, cualitativas y cuantitativas.
- Selección del lugar de la toma.
- Artefactos consecutivos a la autopsia y recogida de la muestra.
- En cualquier fluido orgánico situado en un compartimiento estanco su composición bioquímica va a depender tanto de la patología previa como de las alteraciones derivadas de la causa inmediata de la muerte.

Para el diagnóstico postmortem de la lesión isquémica precoz y del IAM, los fluidos de elección para las determinaciones son el líquido pericárdico y el suero femoral, siendo particularmente interesante en los casos de MSC isquémica el líquido pericárdico, sobre todo por su vecindad con el miocardio, y además porque [114, 117]:

- Su producción es un fenómeno vital.
- Está localizado en un espacio confinado (saco pericárdico) que imposibilita su contaminación desde tejidos adyacentes.
- Carece de elementos formes, por lo que está libre de las interferencias debidas a la hemólisis.
- La irrigación del pericardio es común a la del corazón por lo que las alteraciones miocárdicas se reflejan en el líquido pericárdico, con mucha mayor rapidez que en la sangre periférica, siendo los niveles de marcador más elevados en el líquido pericárdico.

El estudio de marcadores bioquímicos en líquido pericárdico es de gran utilidad para el diagnóstico de la lesión isquémica precoz, por todo lo anteriormente mencionado y sobre todo porque las alteraciones del tejido miocárdico pueden repercutir inmediatamente en los componentes de este fluido [95, 117], elevándose en este fluido, de manera más precoz que en suero, los marcadores cardíacos de necrosis [95, 118].

En relación a la sangre debemos tener en cuenta que, postmortem, se producen una serie de cambios fisiológicos, bioquímicos y hematológicos, como son la autólisis, la hemólisis y la influencia del espacio extracelular, y por ello existen importantes diferencias entre la sangre *in vivo* y la sangre postmortem, la cual realmente se convierte en un sero-plasma, fundamentalmente por la hemólisis. Además la sangre la podemos tomar de distintos puntos, aunque lo más habitual es que se tome sangre femoral antes del inicio del examen interno para así evitar contaminación. También la sangre de cavidades cardíacas será de gran utilidad por estar en contacto con el miocardio. Esto es importante porque según el lugar de la toma podremos encontrar distintos niveles de marcadores [119, 120].

Los marcadores bioquímicos de mayor utilidad forense en el diagnóstico de lesión miocárdica precoz son los que se asocian a necrosis del miocardiocito, y éstos son los mismos que se emplean para el diagnóstico clínico del IAM, es decir, la mioglobina, la CK-MB, y las troponinas I y T, encontrándose postmortem en niveles mucho más elevados que *in vivo* [15, 98, 114, 118, 119, 121-127].

La mioglobina es un marcador de sufrimiento celular, que también se liberan en otras situaciones de necrosis celular, y tiene como principal campo de aplicación su valor predictivo negativo, es decir su capacidad de excluir una afectación del tejido cardíaco [95, 128, 129]. De este modo los marcadores bioquímicos más empleados, y con resultados favorables, estudiados postmortem en sangre periférica y líquido pericárdico para el diagnóstico de la lesión miocárdica precoz han sido la miosina, la CK-MB (menos específica, puede elevarse por daño del músculo esquelético, y además aumenta con el intervalo postmortem) [95, 116, 119, 128-131], y fundamentalmente las troponina I y T cardíacas por ser los más específicas [95, 116, 118, 119, 124, 125, 131-134].

En patología forense las troponinas I y T han sido ya ampliamente investigadas como marcadores diagnósticos postmortem de IAM precoz, mediante el empleo de ensayos convencionales [95, 116, 118, 119, 125, 131-134], y se han encontrado altos niveles de troponinas en suero y líquido pericárdico en casos de MSC por IAM o casos de MSC de origen isquémico, con una alta especificidad diagnóstica (96%), mostrando incluso una elevación en relación a la severidad del

daño miocárdico [26, 95, 106, 116, 118, 121, 127, 128, 131-133, 135]. La particularidad de estos marcadores es que en múltiples estudios se han obtenido valores similares en otras causas de muerte como la hipertermia, el abuso de metanfetaminas, la intoxicación por monóxido de carbono, la electrocución, intoxicación por drogas psicotrópicas, el embolismo pulmonar o la enfermedad cerebrovascular, además de la sepsis generalizada, las enfermedades terminales y como no los traumatismos torácicos [121, 128, 130, 132, 133], obteniéndose en ocasiones resultados controvertidos sobre todo en sangre [78, 119, 120, 136, 137]. La gran cantidad de causas que pueden elevar las cifras de troponina obliga al patólogo a determinar si el daño miocárdico es consecuencia de una isquemia aguda, y por tanto conduce al diagnóstico de IAM, o bien es consecuencia de otra causa, ya que la elevación de troponina informa de necrosis miocárdica pero no del mecanismo que la ha producido.

En la MSC de origen isquémico, se ha demostrado que la elevación de las troponinas en sangre y líquido pericárdico depende de la severidad del daño miocárdico, incluido el tamaño y la intensidad del mismo [133]. Además el intervalo postmortem (IPM) también debe ser tenido en consideración en la integración e interpretación de los resultados de los estudios bioquímicos [95, 116, 130, 133], aunque algunos autores no han encontrado relación con el IPM [118, 128, 131]. Considerar además que también se ha constatado que las elevaciones de troponina se producen de manera más precoz en líquido pericárdico que en suero [95, 118].

Estos marcadores bioquímicos pueden ser de gran utilidad para el diagnóstico de la lesión isquémica precoz, y en especial en casos de MSC isquémicas inmediatas cuyo origen es una arritmia, en las cuales fundamentalmente en líquido pericárdico se puede producir una elevación de estos marcadores. Considerar que combinar el análisis de varios fluidos y sangre tomada de diferentes puntos, puede aportar una información más útil de cara al esclarecimiento de la causa de la muerte [130],

Ahora bien estos marcadores bioquímicos deben ser también valorados en conjunto a otras técnicas como son las histoquímicas e inmunohistoquímicas, y

siempre se deben de tener en cuenta las interferencias postmortem que estos marcadores pueden sufrir, y las diferentes causas de muerte que los pueden modificar [116, 118, 121, 133].

Sería de un gran interés, en el campo de la medicina forense, el análisis postmortem de troponinas en suero y líquido pericárdico basado en los nuevos métodos de detección de alta sensibilidad que se han desarrollado recientemente para estas proteínas, y que son los que se usan en la práctica clínica habitual para el diagnóstico del IAM. La principal ventaja de estos test es poder hacer un diagnóstico más precoz de esta patología en el vivo, no teniendo que esperar las 4-6 horas que tarda en ser detectada la troponina en sangre por los métodos convencionales, desde que se inician los síntomas. De este modo estos nuevos métodos permiten detectar la elevación de la troponina en sangre en estadios mucho más precoces y por tanto, también nos ofrecen la posibilidad de hacer una identificación mucho más rápida de los pacientes que sufren un IAM, con la gran trascendencia clínica que esto tiene. El estudio de estos marcadores, fundamentalmente la cTnT mediante técnicas ultrasensibles enfocado al diagnóstico de la lesión isquémica precoz es algo que aún no se estudiado en el campo forense [68-70, 72, 75, 79, 81, 82].

Clásicamente también han sido estudiados parámetros bioquímicos directamente en tejido cardíaco para el diagnóstico postmortem del IAM. La inversión del cociente K^+/Na^+ en el tejido cardíaco ha sido clásicamente la más usada para el diagnóstico del IAM, permitiendo su confirmación de manera muy precoz (2 horas después del inicio de los síntomas), y no afectándose por la autólisis ni por la putrefacción en los primeros días tras la muerte [22, 23, 114]. Esta se basa en la salida de potasio intracelular por la membrana de la célula inactiva lesionada por la isquemia y la entrada de sodio en la célula, pero como el retorno venoso se mantiene, el potasio se lava del área infartada, con lo que la concentración de sodio en el tejido aumenta más, produciéndose la inversión del cociente (valores normales del cociente K^+/Na^+ 1.1 a 1.4; <0.7 diagnóstico de IAM). Este método puede ser fiable en la detección del IAM, ahora bien no es usado de rutina [23, 103].

También en tejido cardíaco, además de en líquido pericárdico, se han valorado indicadores de peroxidación lípida, como el malondialdehído (MDA), y enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GSH-Px), y la superóxido dismutasa (SOD), como marcadores de hipoxia, mostrándose de utilidad como marcadores bioquímicos de hipoxia y de daño miocárdico [88, 138], sin que hayan mostrado una sensibilidad y especificidad tan alta como para ser usados de rutina en el diagnóstico de la lesión isquémica precoz. Otros parámetros que también ha sido objeto de estudio con esta finalidad diagnóstica son la carnitina libre y los ácidos grasos libres [139], y el HDL colesterol, la APO B-100 y la APO B-1 en líquido pericárdico, como factores asociados a la enfermedad arteriosclerótica y al mecanismo de muerte en relación al IAM [102, 140]. También se ha estudiado el péptido natriurético como marcador asociado a muerte por fallo cardíaco [141-143].

Hasta el momento podemos afirmar que no existe el método ideal para el diagnóstico de la lesión isquémica precoz. En los casos de MSC que se sospeche de un IAM de corta evolución, lo recomendable será el empleo combinado de técnicas convencionales, junto con inmunohistoquímicas y bioquímicas, correlacionando siempre los resultados con los datos de autopsia, datos clínicos y el resto de información y exámenes de que se disponga. En la mayoría de casos ningún estudio por sí solo nos podrá ofrecer una información definitiva, para el diagnóstico de la lesión isquémica precoz, el objetivo final debe ser obtener suficiente información, de cualquier naturaleza, interpretarla y así reconstruir los hechos.

3.5.5 Métodos moleculares

En la actualidad podemos incluir un quinto grupo de métodos dirigidos también al diagnóstico de la lesión isquémica precoz en casos de MSC, basados en la determinación de la expresión génica de moléculas relacionadas con la fisiopatología de la isquemia/necrosis miocárdica. Este tipo de marcadores son un nuevo campo de gran interés para el diagnóstico de sufrimiento isquémico miocárdico, pudiendo ser útiles incluso antes de que puedan ser detectados los

cambios estructurales y bioquímicos previamente reseñados, aunque se encuentra en pleno proceso de desarrollo y valoración.

a. Expresión génica través de ARN mensajero

El ARN mensajero (ARNm) es una molécula intermediaria en la síntesis de proteínas, y su estudio nos ofrece una visión de los patrones de expresión génica de un determinado tejido en un determinado momento. De este modo si comparamos patrones fisiológicos de expresión de una determinada molécula de interés en tejidos sanos y patológicos, podremos tener una aproximación más de cuál es la causa de la muerte en un sujeto, dado que los cambios en el ARNm ocurren de acuerdo a las necesidades fisiológicas de la célula [144, 145]. Aunque el uso de la expresión génica es algo que ya está bien establecido en la medicina molecular moderna, su estudio y aplicación en la patología forense está todavía en fase inicial, con un interés creciente en las posibilidades de esta área de investigación [146-154]

El ARNm es una molécula de gran labilidad, más que otros tipos de ARN [155], que puede verse dañada por factores intrínsecos, como la degradación enzimática por ARNasas, o por factores externos como la luz, la humedad o las altas temperaturas [145, 155]. Además factores postmortem como es el IPM, la causa de la muerte, o las condiciones de mantenimiento del cadáver pueden alterar su integridad [149, 150, 154], aunque específicamente se ha demostrado que se pueden obtener ARNm de muy buena calidad e integridad en muestras procedentes de cadáveres con datas muy largas, de incluso hasta años [155]. Situaciones de coma terminal e hipoxia [144], medicación, fiebre, deshidratación, drogas, el abuso de alcohol, y varios tipos de estrés [151, 152], también se han asociado a una baja integridad del ARN. Sin embargo diversos estudios han demostrado que **es** tejidos postmortem se puede obtener un ARNm de calidad suficientemente alta que permita análisis de expresión génica, esto incluso varios días después de la muerte del individuo [149, 154, 156]. Cuando se realiza una cuantificación de expresión génica en muestras humanas, y más aún cuando son postmortem, se deben tener numerosas precauciones. En primer lugar, es esencial prevenir la degradación del ARNm, a través de una adecuada recogida,

almacenaje, manipulación y procesamiento de las muestras, evitando la presencia de cuerpos extraños que puedan afectar a la integridad del ARNm. Las muestras siempre deben ser tomadas en el cadáver de lugares análogos, y en ausencia de signos macroscópicos de putrefacción. El almacenaje, previo al análisis, debe realizarse a la temperatura mínima de -70°C . Con posterioridad, la extracción del ARNm, la retrotranscripción a ADN y la PCR cuantitativa, requieren mantener las superficies de trabajo libres de ARNasas, y emplear sólo materiales preparados para análisis de ARN [157, 158]. En este sentido es fundamental tener un espacio de trabajo dedicado exclusivamente a la manipulación del ARNm, incluyendo un set de pipetas, portatubos, tubos, puntas de pipetas, etc., exclusivas para el trabajo con este tipo de muestras. El tener estas precauciones contribuirá en gran medida a mantener un ambiente de trabajo libre de ARNasas [159].

Pero a pesar de todo esto debemos considerar que el alcance de la supervivencia postmortem del ARNm es mucho mayor de lo que se cabría esperar, existiendo pruebas robustas en este sentido [155] y observándose que para que el ARNm que se conserve, es necesario que haya algún tipo de barrera o estructura macromolecular entre el ambiente y los ácidos nucleicos. El ARN puede proporcionar información valiosa inalcanzable a través del análisis de ADN. Como tal, la supervivencia a largo plazo de ARN justifica una mayor exploración y caracterización en futuros estudios [155].

Antes de llevar a cabo cualquier estudio de expresión, es fundamental realizar un análisis fotométrico de la cantidad, pureza e integridad del ARNm. La determinación espectrofotométrica de la concentración de ARNm puede llevarse a cabo midiendo la absorbancia a 260 nm, mientras que la ratio de las absorbancias a 260 nm y 280 nm nos da una estimación de la pureza, debiendo obtener un valor entre 1.9 y 2.1 para afirmar que no existe contaminación [157, 160, 161].

En lo que se refiere a la integridad, cuando analizamos muestras postmortem se ha de ser muy cuidadoso en la interpretación cuantitativa de la expresión génica, dado que un ARNm de baja calidad (baja integridad) puede llevar a resultados erróneos [150, 157-159, 162]. Por ello la determinación de la integridad del ARNm es un paso crucial para poder hacer un análisis de expresión génica

efectivo. Para ello lo recomendado es el cálculo del valor de RIN (*RNA Integrity Number*) de la muestra objeto de estudio, y el método de elección para tal estimación se basa en una electroforesis capilar que se hace sobre un chip, estando recomendado el uso de muestras de ARNm con el mayor valor de RIN posible [150, 158, 159, 163-166]. El rango de valores del RIN oscila entre 1 y 10, significando 1 que la muestra tiene un ARNm totalmente degradado y 10 que está completamente integro. El mínimo valor que podemos considerar para hablar de un ARNm no dañado, y por tanto susceptible de amplificación, está entre 3.95 y 5, según los autores [157, 163, 167]. De este modo, aunque la degradación postmortem del ARNm es un proceso complejo, la verificación de la integridad del ARNm requiere un estudio sistemático, antes de cualquier amplificación génica.

En este punto debemos considerar que algunos autores han establecido que el género y la edad en el momento de la muerte, pueden interferir tanto en la cantidad de ARNm que obtengamos en una muestra (rendimiento de la extracción), y en la estabilidad e integridad del ARNm extraído (RIN), y por tanto, estos factores, pueden condicionar los resultados que obtengamos tras la amplificación de estas moléculas con PCR cuantitativa [145, 149, 150, 152, 168].

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con retrotranscripción (RT-qPCR) es el método de elección para la cuantificación del ARNm [169]. La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) es una variación de la PCR estándar que se utiliza para la cuantificación del ARNm de una muestra. Empleando primers específicos de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ARNm que codifica una determinada proteína. Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción de retrotranscripción o RT, es decir obtenemos ADN copia (ADNc) desde una molécula de ARNm, hablamos de RT-pPCR. Una vez obtenido el ADNc se realizará la amplificación usando qPCR, y por último se llevará a cabo la detección y cuantificación de los productos de la amplificación en tiempo real.

La cantidad de ARNm de una muestra puede determinarse mediante cuantificación relativa. Esta cuantificación se llama relativa ya que se compara

entre distintas muestras la cantidad relativa o relación del ARNm de un gen específico respecto a la cantidad de ARNm de un gen control o gen endógeno. Para la cuantificación se mide en cada ciclo de amplificación de la qPCR la cantidad de amplicón producido. Esta cuantificación se hace mediante la adición de fluoruros que se unen al amplicón de forma cuantitativa, de manera que a mayor cantidad de producto más fluorescencia se emitirá. Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARNm iniciales, de manera que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores. Se pueden usar distintos tipos de fluorocromos, siendo el método más utilizado, por su menor coste, el SYBR Green, donde los fluorocromos se unen al ADN de doble cadena y producen fluorescencia. Este método implica un diseño muy cuidadoso de los primers con el fin de evitar dímeros de primer y evitar la amplificación de ADN genómico concomitante en la muestra de ADNc. Otra alternativa más cara, pero recomendada cuando hay problemas de especificidad, es el uso de sondas específicas fluorescentes, como son las sondas TaqMan, que permiten la cuantificación específica del ADNc de interés, incluso en la presencia de amplificación inespecífica, como pueden ser dímeros de primer y ADN genómico.

En las gráficas de amplificación, de forma habitual, el eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada y el eje horizontal el número de ciclos. En esta gráfica, la línea de base o *basic line* se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia y solo es detectada la fluorescencia basal. El *Threshold* es el umbral en el que se produce el cambio significativo de la fluorescencia, el punto de corte entre el *threshold* y la curva de amplificación determina el Ct o ciclo umbral que es el que se usa para hacer la cuantificación.

Para la cuantificación el método más usado es el del $\Delta\Delta\text{Ct}$, en el que se comparan en cada muestra directamente las Cts del gen problema y el gen de referencia o gen control, esto es el ΔCt , y luego se comparan los ΔCt de las muestras

experimentales con respecto a una muestra control. Existe una variante del método del $\Delta\Delta CT$, que sería el $2^{\Delta\Delta Ct}$, que es similar con la única particularidad de que esta corregido por las eficiencias de los diferentes primers [170], lo que da una mayor precisión a la cuantificación. Considerar que para que los resultados sean reproducibles la qPCR tiene que tener una eficiencia del 100% (esto es que exista un duplicación de producto en cada ciclo). La eficiencia se ha de calcular para cada gen con el que se vaya a trabajar, y este cálculo se hace a través de la pendiente de una curva patrón, de manera que la eficiencia es igual a $[10^{(-1/pendiente)}]-1$. En realidad las eficiencias no son del 100% pero no deben bajar del 90%.

La determinación del ARNm usando qPCR, es usada comúnmente para los análisis cuantitativos de expresión génica. Pero antes de cualquier estudio de expresión, es necesaria una estrategia de normalización, para que así podamos validar la estabilidad de los genes que tenemos como candidatos para ser usados como genes endógenos o genes control [147, 148, 171-173]. El gen control idóneo debe ser fácil de detectar y debe tener un nivel de expresión constante entre diferentes tejidos de un mismo organismo cuando lo exponemos al mismo protocolo experimental que los genes objeto de estudio [147, 172, 173]. Para realizar una adecuada normalización de los resultados la literatura actual propone varios genes control específicos, sin embargo es conocido que la expresión de ciertos genes endógenos varía de acuerdo con situaciones patológicas o condiciones experimentales; también según el tipo de tejido [159, 171]. En muestras postmortem, y específicamente en tejido cardíaco, diferentes genes control son considerados como genes de referencia estables, entre ellos destacan la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la beta actina (ACTB), la proteína de unión TATA box (TBP) y la Ciclofilina A (CYCA), entre otros como el ARN ribosómico o la beta 2 microglobulina [147, 148, 159, 164, 171, 173].

b. Diagnóstico de la lesión isquémica miocárdica precoz a través de la expresión génica

En la actualidad la realización de estudios de expresión génica en tejido cardíaco, estudiando diferentes áreas del miocardio, y en fluidos biológicos, es

cada vez más necesaria para entender los mecanismos que subyacen a la isquemia miocárdica y a su posterior proceso de reparación. El conocimiento de la fisiopatología molecular de la isquemia miocárdica y del IAM nos permite saber la expresión de qué moléculas se modifica como respuesta a estas situaciones patológicas. De este modo podríamos emplear estas proteínas como marcadores diagnósticos de lesión isquémica precoz. Este tipo de marcadores son de gran interés en el sentido de permitir el diagnóstico de sufrimiento miocárdico, incluso antes de que se produzcan los cambios morfológicos y bioquímicos previamente reseñados, con lo que ante una muerte súbita que acontece de forma muy rápida (<6 horas del inicio de los síntomas), sin dar lugar a que se produzcan cambios estructurales y bioquímicos, el primer elemento de respuesta a la agresión que supone la isquemia es la respuesta a nivel molecular, basada en la modificación en la expresión génica de determinadas moléculas que podemos detectar incluso en el caso de una muerte inmediata por fibrilación ventricular. El estudio del ARNm puede ser útil incluso para hacer una evaluación cuantitativa de la localización y la severidad de un daño isquémico miocárdico [107].

En este sentido podemos ya encontrar en la literatura científica una serie de estudios, que fundamentalmente han analizado la expresión de moléculas de inflamación y angiogénesis en relación a casos de MSC e IAM.

Entre los factores implicados en la angiogénesis y la hipoxia, se ha estudiado el VEGF y sus receptores en muestras de aurícula obtenidas durante cirugía coronaria [174], encontrándose que la expresión de VEGF y su receptor 1 (VEGF-R1) era mayor en casos de isquemia miocárdica aguda. No se encontró sin embargo aumento en la expresión de factor de crecimiento fibroblástico. También se ha estudiado el HIF-1 α y el VEGF en muestras de ventrículo obtenidas de vivo demostrándose que su expresión está elevada en casos de IAM recientes (<24 horas de evolución) [112]. En casos forenses se ha estudiado la expresión de HIF-1 α , VEGF y EPO en muestras de tejido de ventrículo izquierdo procedentes de autopsias, moléculas cuya estabilidad postmortem ha sido demostrada [175]. Para estas tres moléculas se ha encontrado una elevación significativa de los niveles de ARNm en casos de IAM, localizada en determinadas zonas, y además se ha encontrado que la expresión está asociada a la severidad del daño miocárdico. En

los casos en los que el miocardio mostraba cambios isquémicos precoces sin necrosis, los niveles de ARNm estaban levemente aumentados, al igual que en casos de infartos ya evolucionados. La expresión de estas moléculas no guardó relación con el IPM (salvo la EPO), ni con el sexo ni la edad [107]. La expresión de estas tres moléculas ha sido también estudiada en muestras de riñón procedentes de autopsias en relación a la causa de la muerte [176], demostrando que su estudio es potencialmente útil para la investigación de la fisiopatología de la muerte, siendo el VEGF especialmente útil en casos de fallo circulatorio agudo, estando más expresado en casos de IAM, pero también en muertes por aspiración, no encontrándose correlación con el IPM.

Entre los factores implicados en la inflamación destacar que se ha estudiado, desde un punto de vista clínico, la expresión de dos moléculas, el TGF- β 1 y el TNF- α , en muestras de sangre de pacientes con IAM. La expresión de TNF- α se eleva de forma significativa en sangre de pacientes con IAM [177-179], mientras que la expresión de TGF- β 1 y de sus receptores disminuye en estos pacientes [179, 180].

Estos datos demuestran que, aunque sea un campo todavía escasamente estudiado dentro del ámbito forense, la biología molecular puede ser un método más para el diagnóstico de la lesión miocárdica isquémica precoz y del IAM, y que incluso puede permitir localizar el lugar de la lesión, valorar la fase en la que se encuentra y la severidad del daño isquémico. Para todo esto son necesarios un mayor número de estudios en el ámbito forense y la valoración de más marcadores genéticos asociados con la isquemia/necrosis miocárdica.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El diagnóstico preciso de la muerte súbita cardíaca de origen isquémico sigue siendo un tema de interés forense, porque pese a que en los últimos 30 años, se ha producido un gran avance en ese campo, todavía se producen autopsias blancas, y ello es así por la dificultad existente en evidenciar postmortem la presencia de signos histológicos o bioquímicos inequívocos, en el tejido miocárdico o en fluidos biológicos (líquido pericárdico o sangre) indicativos de dicho sufrimiento. La dificultad puede ser incluso mayor si el tiempo de sobrevivencia es breve, no pudiéndose poner de manifiesto, de forma evidente, los cambios patológicos consecutivos a la isquemia miocárdica. Tampoco se puede olvidar que los signos de isquemia cardíaca deben estar en relación con la duración e intensidad de la oclusión coronaria o de la supresión del aporte de oxígeno al miocardio, si éste ocurre por cualquier otro mecanismo fisiopatológico. Por todos estos motivos, en las últimas décadas, tras investigaciones realizadas en el seno de la patología forense, se han propuesto métodos complementarios a la autopsia forense cardíaca que persiguen la detección más precoz y precisa de los cambios consecutivos a la isquemia miocárdica. Este es el primer trabajo de investigación, en patología forense, que usando técnicas de patología molecular, estudia y valora el comportamiento de algunos marcadores moleculares expresión de sufrimiento isquémico, inflamación y revascularización en muertes cardíacas de origen isquémico y otras causas en las que la isquemia miocárdica no es la causa primaria de muerte.

Del mismo modo, que hace 40 años, el Departamento de Medicina Legal de Granada, introdujo las pruebas bioquímicas en el diagnóstico de las causas de muerte, siguiendo las pautas marcadas por la clínica, hoy se pretende seguir la misma estela. El diagnóstico molecular, es hoy el procedimiento de elección en la clínica, para el diagnóstico de la mayoría de los procesos patológicos y se ha introducido también en la cardiología como un procedimiento que ofrece excelentes resultados. Pero como ocurriera con los marcadores bioquímicos, antes de su uso en el diagnóstico médico legal postmortem es necesario comprobar cuál es el comportamiento de estos parámetros en el cadáver, su estabilidad postmortem, su distribución, la correlación tejido-sangre-líquido pericárdico. Sin un conocimiento exhaustivo de este comportamiento la biología molecular no

puede entrar a formar parte de los elementos diagnóstico. Con la finalidad de contribuir a este conocimiento y por ende a la mejora del conocimiento sobre a una mejor comprensión de la patología isquémica miocárdica, y así poder aportando nuevos métodos que permitan el diagnóstico postmortem de la muerte súbita cardíaca de origen isquémico, acortando ese periodo de incertidumbre, hemos realizado el presente trabajo de investigación que parte de la hipótesis siguiente : El ARN mensajero (ARNm) es una molécula intermediaria en la síntesis de proteínas, y su estudio nos ofrece una visión de los patrones de expresión génica de un determinado tejido en un determinado momento. De este modo si comparamos patrones fisiológicos de expresión de una determinada molécula de interés en tejidos sanos y patológicos, podremos tener una aproximación más de cuál es la causa de la muerte en un sujeto, dado que los cambios en el ARNm ocurren de acuerdo a las necesidades fisiológicas de la célula. Las primeras alteraciones que se produzcan serán por tanto en esta molécula

El trabajo persigue los siguientes objetivos:

- Aportar nuevos métodos diagnósticos moleculares, mediante la medida de la expresión de ARNm de proteínas estructurales del miocardio (troponina I, cadena ligera de la miosina), y moléculas de inflamación (factor de crecimiento transformante beta 1, y metaloproteinasas de matriz 9), y angiogénesis (factor de crecimiento del endotelio vascular) relacionadas directamente con las respuestas a la isquemia miocárdica para el diagnóstico postmortem de la muerte súbita cardíaca de origen isquémico.
- Establecer cuáles son los mejores marcadores de lesión isquémica precoz, su relación con la extensión, intensidad y localización de la necrosis miocárdica.
- Determinar las diferencias en los niveles de expresión de los marcadores moleculares según el lugar de donde se obtenga la muestra (sangre periférica, líquido pericárdico o tejido cardíaco).

- Valorar la cinética de liberación de los marcadores dependiendo de la extensión y duración de la isquemia.
- Estudiar los cambios de los marcadores moleculares en relación a la data y las posibles limitaciones que podrían suponer para su uso práctico como método diagnóstico en casos forense.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras

Las muestras empleadas para el presente estudio se tomaron de un total de 30 cadáveres, procedentes de autopsias judiciales. Las autopsias fueron realizadas en el Servicio de Patología del Instituto de Medicina Legal de Málaga, de acuerdo a los estándares Europeos [24], con la autorización de la Comisión de Ética en Investigación Humana de la Universidad de Granada (Informe nº 700 del Comité en Investigación Humana, de 21 de mayo de 2012), y de la Comisión de Ética del Instituto de Medicina Legal de Málaga.

Los datos de mayor relevancia en relación a los 30 cadáveres objeto de estudio se pueden observar en la tabla 1. Todos los cadáveres tenían una data conocida, que oscilaba entre 5 y 24 horas, con una media de 15.27 horas y una desviación estándar de 5.67 horas. Los cadáveres se mantuvieron refrigerados a 4°C desde su llegada al Instituto de Medicina Legal hasta la realización de la autopsia. La edad media de los sujetos fallecidos fue de 65.03 (\pm 16.50) años, estando la muestra objeto de estudio constituida por 5 mujeres y 25 hombres.

En relación a la causa de la muerte, la población de estudio se clasificó en cuatro grupos, alcanzándose el diagnóstico tras la práctica de una autopsia completa, detallada y minuciosa, tal y como está establecido en los protocolos [2, 4, 9, 37, 39-43]. Esta clasificación en cuatro grupos (Tabla 1), es la seguida por el Departamento de Medicina Legal de Granada en trabajos semejantes, que ya ha sido aceptada por la comunidad científica internacional. La inclusión en un grupo u otro se realizó basándonos en antecedentes clínicos previos al fallecimiento, a la información obtenida durante el levantamiento del cadáver, a la autopsia y a los hallazgos toxicológicos e histopatológicos, de acuerdo a la similitud del mecanismo fisiopatológico de la causa de la muerte: muertes súbitas cardíacas isquémicas (14 casos-47%), politraumatismo (7 casos-23%), asfixia mecánica (6 casos-20%), y otras muertes naturales (3 casos-10%).

Tabla 1. Características individuales de la muestra de los 30 cadáveres estudiados

Cadáver	Sexo	Edad (años)	Data (horas)	Causa de la muerte
1	Hombre	59	22	Muerte súbita cardíaca isquémica
2*	Hombre	34	17	Politraumatismo
3*	Hombre	87	5	Muerte súbita cardíaca isquémica (IAM)
4	Hombre	90	24	Asfixia mecánica
5	Hombre	83	8	Muerte súbita cardíaca isquémica
6	Hombre	80	17	Asfixia mecánica
7	Hombre	75	12	Muerte súbita cardíaca isquémica
8	Hombre	54	12	Muerte súbita cardíaca isquémica
9*	Mujer	51	16	Asfixia mecánica
10	Hombre	39	19	Politraumatismo
11	Mujer	81	20	Politraumatismo
12*	Hombre	84	17	Politraumatismo
13*	Hombre	69	16	Muerte súbita cardíaca isquémica
14	Hombre	77	10	Politraumatismo
15	Hombre	65	21	Muerte súbita cardíaca isquémica (IAM)
16*	Hombre	57	7	Muerte súbita cardíaca isquémica
17	Hombre	27	15	Politraumatismo
18	Hombre	70	5	Muerte súbita cardíaca isquémica (IAM)
19	Mujer	36	19	Asfixia mecánica
20*	Mujer	65	18	Asfixia mecánica
21	Hombre	82	22	Politraumatismo
22	Hombre	77	5	Otras muertes naturales
23	Hombre	62	10	Muerte súbita cardíaca isquémica
24	Hombre	55	19	Otras muertes naturales
25	Hombre	54	19	Muerte cardíaca isquémica
26	Hombre	73	23	Muerte cardíaca isquémica
27	Hombre	65	19	Muerte súbita cardíaca isquémica (IAM)
28	Mujer	65	19	Asfixia mecánica
29*	Hombre	56	11	Muerte súbita cardíaca isquémica (IAM)
30	Hombre	79	11	Otras muertes naturales

*Cadáveres empleados en el estudio de validación de genes endógenos o genes de referencia.

Los criterios anatomopatológicos para clasificar las muertes como muertes súbitas cardíacas isquémicas fueron establecidos de acuerdo a los hallazgos de la autopsia, incluyéndose en este grupo, aquellos casos en los que los resultados de los estudios anatomopatológicos del corazón correspondían con alguna de las dos opciones que a continuación se detallan:

a. Diagnóstico anatomopatológico de IAM: establecido por el hallazgo de necrosis de miocardiocitos en el estudio microscópico con H&E del corazón, o bien por la existencia de infiltrado inflamatorio agudo, constituido por polimorfonucleares, lo que nos indica un IAM en fase aguda; o por la presencia de un infiltrado inflamatorio subagudo, formado por fundamentalmente linfocitos y macrófagos (también células plasmáticas y/o fibroblastos), que implica un IAM en evolución (pocos días-pocas semanas).

b. Diagnóstico de muerte cardíaca de origen isquémico: sin signos de necrosis y/o sin infiltrado inflamatorio agudo, pero con en el estudio anatomopatológico con H&E del corazón, signos inespecíficos de isquemia (congestión, edema, bandas de contracción, ondulación de fibras), o/y infarto de miocardio antiguo (fibrosis de reemplazo), y además con evidencia de cardiopatía isquémica severa (estenosis coronaria significativa, mayor del 70%, en al menos una rama principal), y/o presencia de trombo coronario oclusivo, junto con antecedentes personales de cardiopatía isquémica, y siempre una vez descartadas otras causas de muerte una vez realizada la autopsia completa.

Durante la autopsia, e inmediatamente tras la apertura del saco pericárdico se tomaron muestras de líquido pericárdico para estudio de expresión molecular y bioquímico. Para el análisis molecular se recogieron 2.5 ml de líquido pericárdico con una jeringa estéril que se pusieron en tubos específicos para la estabilización del ARNm de la muestra (*PAXgene Blood RNA Tubes, PreAnalytix*), dejándose a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, con la finalidad de mejorar el rendimiento en la extracción de ARNm. Posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Además se tomó una alícuota de 5 ml de líquido pericárdico en tubos específicos (*tubo de vacío BD Vacutainer SST Advance*), para la realización de estudios bioquímicos. Estas muestras se dejaron reposar entre 30 minutos y 2 horas, y posteriormente fueron centrifugadas a 1500 g durante 10 minutos. Hasta su análisis se conservaron a -80°C de temperatura.

La autopsia del corazón se llevó a cabo, en el Servicio de Patología del Instituto de Medicina Legal de Málaga, de forma detallada y minuciosa siguiendo los

pasos establecidos por Asociación Europea de Patología Cardiovascular en la Guía para la práctica de la autopsia en casos de muerte súbita cardíaca [4], y las recomendaciones de otros autores [2, 4, 9, 38, 44]. Antes de la disección cardíaca, se estudiaron en todos los casos las arterias coronarias principales y sus ramas más importantes, realizándose cortes transversos y seriados de las mismas a lo largo de su recorrido, estudiándose, de este modo, el grado de estenosis que estas tenían. Posteriormente los corazones fueron disecados mediante la realización de cortes transversos de los ventrículos paralelos y a intervalos de 1-1.5 cm hacia el ápex [23, 88, 103], obteniéndose 4-5 rodajas que incluyen ambos ventrículos. Las muestras para el análisis molecular tisular se tomaron de una rodaja ventricular de posición intermedia, conservándose en congelación a -80°C hasta su análisis. También se conservó, en formaldehído al 10%, y para su posterior estudio histopatológico, la rodaja de miocardio inmediatamente superior o inferior (según el caso) a la seleccionada para estudio molecular.

Finalmente, en todos los casos, se procedió a la extracción de sangre venosa de vena femoral mediante punción directa transcutánea. Volúmenes similares de sangre fueron procesados de idéntica forma que el líquido pericárdico, para los posteriores análisis moleculares y bioquímicos.

2. Estudios de expresión génica

2.1 Extracción de ARNm

Basados en información procedente de estudios previos [88, 103, 139], para llevar a cabo los estudios moleculares se tomaron muestras de cinco áreas específicas del miocardio ventricular: pared anterior y posterior del ventrículo izquierdo, tabique interventricular, y pared anterior y lateral del ventrículo derecho. Para el análisis molecular, y con el tejido aún congelado, se tomaron aproximadamente 30 mg de tejido miocárdico de cada zona. Las muestras congeladas fueron sometidas a un proceso de disrupción y homogenización usando un instrumento específico para tal fin, el *TissueLyser LT* (*Qiagen, Gilden, Germany*). La disrupción completa de las paredes celulares, tanto de las membranas plasmáticas de las células, como de los orgánulos es absolutamente necesaria para liberar todo el ARN contenido en la muestra, de manera que una disrupción incompleta reduce significativamente el rendimiento de ARN obtenido. La homogenización es necesaria para reducir la viscosidad de los lisados obtenidos tras la disrupción. Con la homogeneización se cortan o cizallan el ADN genómico de alto peso molecular y otros componentes celulares, también de alto peso molecular, para crear un lisado homogéneo. Una homogeneización incompleta también reduce significativamente el rendimiento en la extracción de ARN. El *TissueLyser LT* produce una disrupción y homogenización simultánea del tejido haciendo vibrar a alta frecuencia durante un minuto una esfera de acero inoxidable estéril de 7 mm de diámetro, que previamente se ha colocado junto con la muestra y 300µl de buffer de lisis, en un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Una vez realizado el lisado y homogenizado de las muestras, la extracción del ARNm se llevó a cabo usando el kit comercial de extracción *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (*Qiagen*).

Las muestras de líquido pericárdico y el suero femoral se descongelaron durante dos horas antes de la extracción del ARNm como establecen los protocolos. La extracción se realizó empleando también un kit comercial, el *PAXgene RNA Blood Kit* (*PreAnalytix*). Ambos procedimientos de extracción, tanto para tejido miocárdico como para fluidos, incluyen un paso de tratamiento con ADNasas,

para eliminar el ADN genómico residual, de modo que la interferencia de este en la amplificación sea mínima.

Además, para minimizar la posible degradación del ARNm durante la extracción, todos los materiales, instrumentos empleados, y todas las superficies se limpiaron con un producto anti RNasas (*RNase Away, Molecular Bioproducts*).

2.2 Determinación de la cantidad, calidad e integridad de ARNm

La concentración de ARNm en cada muestra, expresada en nanogramos/ μ l, fue obtenida mediante análisis espectrofotométrico midiendo la absorbancia a 260nm, mediante el empleo de un *NanoDrop 2000-C (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)*. El rendimiento del proceso de extracción de ARNm fue calculado dividiendo los nanogramos de ARNm obtenidos en cada muestra entre el peso del miocardio inicial (30 mg), o el volumen de fluido (2.5 ml).

La calidad de ARNm, es decir, fundamentalmente, el grado de contaminación de este por proteínas, fue estimado mediante el cociente entre la absorbancia de la muestra a 260nm y a 280nm, usando también el *NanoDrop 2000-C* [157, 160, 161].

La integridad del ARNm, fue calculada y expresada con un valor de RIN (*RNA integrity number*) para cada muestra, tal y como está recomendado [150, 158, 159, 163-166]. Este valor es el resultado de la aplicación de un algoritmo [162], mediante el cual se asigna un valor de integridad a las muestra de ARNm estudiada. Este valor se obtuvo realizando la electroforesis capilar de cada muestra sobre una placa mediante el *Bio-Analyzer 2100 (Agilent Technologies)*, usando el *Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)*. Este instrumento combina la electroforesis capilar del ARNm que realiza sobre una placa, y un software que calcula la concentración de esta molécula, y dos parámetros numéricos que indican la integridad del ARNm: la relación entre los RNA ribosómicos 28S y 18S, y el número RIN, el cual es calculando basándose en las áreas de los picos de las dos subunidades de ARN ribosómico. Por tanto permite determinar con gran fiabilidad tanto la cantidad, como la

integridad del ARNm, utilizando además mínimas cantidades de muestra (sólo se requiere 1 μ l).

2.3 Síntesis de ADNc y PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real con retrotranscripción (RT-qPCR) fue realizada usando un protocolo de dos pasos, primero la retrotranscripción de ARNm a ADNc, y después la qPCR.

Para realizar la retrotranscripción se partió de 500 ng de ARNm en cada una de las muestras, y para la síntesis del ADNc se empleó un kit comercial, el *QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen)*. En este kit, el primer paso es, incubar cada muestra durante 2 minutos a 42°C, una vez añadidos 2 μ l de *gDNA Wipeout Buffer*, para eliminar totalmente la contaminación por ADN genómico. El siguiente paso, es añadir a la muestra el *primer* específico (1 μ l de *RT Primer Mix*), la encima retrotranscriptasa (1 μ l de *Quantiscript Reverse Transcriptase*) y 4 μ l de buffer *Quantiscript RT Buffer*, obteniendo un volumen total de 20 μ l, e incubando de nuevo durante 15 minutos a 42°C, y después 3 minutos a 95°C. El ADNc resultante fue diluido 1/10 con agua libre de ARNasas, siendo esta la muestra usada para la posterior qPCR.

Previamente a la cuantificación de los genes diana objeto de estudio, se procedió a la identificación de un gen control o gen endógeno para qPCR. Con tal finalidad se determinaron los niveles de expresión de cuatro genes utilizados habitualmente como control en medicina forense [147, 148, 171-173], buscando entre ellos el más estable. Los cuatro genes valorados fueron la Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la beta actina (ACTB), la proteína de unión TATA box (TBP) y la Ciclofilina A (CYCA), y su expresión se estudio en muestras procedentes de 8 cadáveres tomados de nuestros 30 casos (Tabla 1), representativas de todas las causas de muerte. De estos 8 individuos 7 eran hombres y 1 era mujer. La edad media de estos sujetos fue de 59.63 años (SD 19.3; rango 34-87 años), y la media de la data de la muerte fue de 12.38 horas (SD 5.34, rango 5-17 horas). El gen que mostró más estabilidad, y por tanto el elegido como gen endógeno para los estudio de expresión relativa fue la GAPDH.

Los niveles de expresión fueron cuantificados en un aparato de PCR cuantitativa en tiempo real 7500 de *Applied Biosystem* (*Applied Biosystem, Darmstadt, Germany*), empleándose como fluorocromo el SYBR Green, y usando un kit comercial, el *QuantiTect SYBR Green PCR kit* (*Qiagen*). Este método implica un diseño muy cuidadoso de los *primers* con el fin de evitar dímeros de primer y evitar la amplificación de ADN genómico concomitante en la muestra de ADNc, por ello los primers empleados para la amplificación, han sido primers comerciales, los incluidos en el *QuantiTect Primer Assay* (*Qiagen*), de los que se detalla la información mínima recomendable en las guías para la publicación de los experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real (MIQE Guidelines) [164], y que se pueden ver en la Tabla 2. Para todas las muestras se llevo a cabo un análisis de cuantificación relativa de la expresión genética, tanto de los genes candidatos a gen control (GAPDH, ACTB, TBP, y CYCA) como de los genes objeto de estudio o genes diana: troponina I cardíaca (TNNI3), cadena ligera de la miosina cardíaca (MYL3), metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1), y factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGFA).

La troponina es una proteína contráctil localizada en el filamento delgado del músculo estriado, formada por tres subunidades: la troponina C, la troponina T y la troponina I, que es la subunidad inhibitoria del complejo de la troponina. Ante unos niveles basales de calcio, la troponina I inhibe la formación de puentes actina-miosina, y durante la sístole el calcio se une al locus regulador de la troponina C, y entonces la subunidad inhibitoria, la troponina I, se libera, activando la contracción muscular [181]. La expresión de troponina I cardíaca (TNNI3) es específica del miocardio, y ha sido elegida para ser estudiada porque la determinación de esta proteína en sangre es el método que se usa habitualmente en la práctica clínica para el diagnóstico del infarto agudo de miocardio (IAM) [75, 182]. La MYL3 fue elegida porque es una importante proteína estructural en el músculo cardíaco, siendo una isoforma embrionaria y músculo-ventricular de la cadena ligera de la miosina [183-187]. La MMP9 juega un papel importante en los cambios que se producen en la MEC tras el IAM, contribuyendo al remodelado del ventrículo izquierdo, provocando alteraciones en la membrana basal, lo que

favorece el tráfico de moléculas alrededor de los miocardiocitos, y también aumentando la permeabilidad vascular. [57, 58, 188]. El TGF β 1 tiene un papel protector en el sistema vascular, atribuido a su acción antiinflamatoria y antiaterogénica, de modo que favorece la estabilización de la placa de ateroma [180]. El potente efecto de esta proteína hace que juegue un papel central en el daño de origen isquémico, la reparación cardíaca y el remodelado del ventrículo izquierdo [60]. El VEGFA es una molécula crítica en el inicio de la respuesta a la hipoxia miocárdica [112], y es considerada un agente mitogénico endotelial específico que juega un papel muy importante en la angiogénesis miocárdica.

Previamente al estudio de los genes control y diana se realizó para todas las moléculas una curva estándar, con 5 diluciones seriadas 1/10, elaboradas a partir de muestras seleccionadas de nuestro estudio, con la finalidad valorar que la eficiencia de los primers estuviese en un rango adecuado, resultados que se presentan igualmente en la Tabla 2:

Tabla 2. Información y eficiencia de los distintos primers usados en nuestro estudio.

Identificación del primer: QuantiTect Primer Assay (Qiagen)	Número de secuencia de acceso	Punto de inicio del ensayo	Longitud del amplicón (Pb)	Eficiencia de la RT- qPCR (%)	Coefficiente de regresión (r ²)
GAPDH QT01192646	NM_002046	525	95	101.18	0.996
ACTB QT01680476	NM_001101	1595	104	99.80	0.997
TBP QT02377361	NM_003194	85	124	105.64	0.989
CYCA (PPIA) QT01866137	NM_021130	340	121	99.09	0.997
TNNI3 QT00084917	NM_000363	675	113	97.21	0.997
MYL3 QT00090223	NM_000258	295	150	101.45	0.993
MMP9 QT00040040	NM_004994	2010	115	98.96	0.998
TGF β 1 QT00000728	NM_000660	1215	108	99.01	0.997
VEGFA QT01682072	NM_001025366	2450	99	100.09	0.999

Para realizar la qPCR con el kit *QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen)*, la mezcla de amplificación contenía 2 μ l de la muestra problema (ADNc), 8 μ l de agua libre de ARNasas, 12.5 μ l de *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*, y 2.5 μ l de primer (*QuantiTect Primer Assay*). Las condiciones de los ciclos de qPCR consistieron en un paso inicial de activación, en el cual se mantenían las muestras durante 15 minutos a 95°C, y después 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. Se realizaron tres replicas de cada muestra

analizada, y en cada ensayo se incluyeron controles positivos y negativos. Como controles positivos se usaron muestras de ARNm ya conocidas, y como control negativo se empleó agua. El ciclo umbral, *threshold cycle* o Ct, en nuestros casos representa el ciclo de la qPCR en el cual existe un incremento en la fluorescencia del SYBR Green sobre una línea base de señal que puede ser detectado por primera vez.

Para la cuantificación relativa de la expresión, el método usado ha sido una variante del $\Delta\Delta\text{CT}$, que sería el $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$, que como ya hemos comentado en el apartado de introducción, tiene la particularidad de que el cálculo de la expresión está corregido por las eficiencias de los diferentes primers [170], lo que da una mayor precisión a la cuantificación. Este método tiene en cuenta además de la eficiencia del primer, el Ct del gen diana en una muestra control y en la muestra problema, y el Ct del gen endógeno (GAPDH), también en la muestra control y problema. En nuestro caso se utilizó como control la media de los Cts obtenidos para todas las muestras de cada tipo, es decir el control para las muestras de tejido será la media de todos los Cts obtenidos en muestras de tejido, y lo mismo para sangre y líquido pericárdico. El cálculo de la expresión se hace según la fórmula que se ve a continuación:

$$\text{Expresión} = \frac{(E_{\text{diana}})^{\Delta\text{Ct diana (control-muestra)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (control-muestra)}}$$

E_{diana} : Eficiencia del primer del gen diana.

E_{ref} : Eficiencia del primer del gen de referencia o gen endógeno (GAPDH).

$\Delta\text{Ct dia (control-muestra)}$: Diferencia de Ct del gen diana en la muestra control y en la muestra problema.

$\Delta\text{Ct ref (control-muestra)}$: Diferencia de Ct del gen endógeno o de referencia (GAPDH) en la muestra control y en la muestra problema.

3. Análisis histopatológicos

Para la realización de los estudios histopatológicos se partió de una rodaja de miocardio que fue tomada durante la autopsia y que se conservó en formaldehído al 10%. Este tipo de análisis se llevaron a cabo en el Servicio de Histopatología del Departamento de Sevilla del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, como exámenes complementarios a las autopsias médico-legales, y consistieron en el examen histológico del tejido miocárdico con una tinción de hematoxilina-eosina (H&E). Mediante esta técnica se analizaron al microscopio diferentes zonas de ambos ventrículos (la pared anterior y posterior del ventrículo izquierdo y derecho, y el tabique interventricular), y secciones transversales de las arterias coronarias principales que presentaban lesión arterioesclerótica macroscópica. Esto se realizó de forma estandarizada para todos los individuos.

En estos exámenes complementarios, los criterios establecidos para el diagnóstico y la data del IAM fueron la presencia de necrosis de miocardiocitos, junto con un infiltrado inflamatorio agudo constituido por polimorfonucleares, datos que indican la existencia de un IAM en fase aguda (hasta de 2-3 días de evolución); o la presencia de un infiltrado inflamatorio subagudo, constituido fundamentalmente por linfocitos y macrófagos, y/o otros tipos celulares como son células plasmáticas o fibroblastos, los cuales implican un diagnóstico de IAM en evolución o reciente, con datas que pueden ir desde los pocos días hasta aproximadamente las dos semanas, pudiendo esa data aumentar, cuando se observa la presencia de neovasos o de tejido conectivo, hasta las tres semanas. Por otro lado siempre se consideró la posibilidad de la existencia de infarto de miocardio antiguo representado por el hallazgo de áreas de fibrosis de reemplazo de miocardiocitos. Junto con el IAM y el infarto antiguo, en los estudios histopatológicos, se valoró la posible evidencia de cardiopatía isquémica severa, a través de la presencia de estenosis coronaria significativa, mayor del 70%, en al menos una arteria coronaria principal, y se buscó la posible existencia de trombos coronarios oclusivos, como indicador de isquemia miocárdica en fase aguda.

4. Análisis bioquímicos

Los estudios bioquímicos se llevaron a tanto en muestras de sangre como de líquido pericárdico, recogidas durante la autopsia, en tubos específicos para tal fin. Se procedió a la determinación de la troponina T cardíaca ultra sensible (cTnT_{hs}) empleando un método de inmunoensayo usando la técnica *Elecsys Troponin T hs STAT* (Ref. 05092728 119, Roche Diagnostics GmbH®, Mannheim, Germany). Los ensayos se realizaron con un dispositivo Roche Cobas e 601 (Diamond Diagnostics®, MA, USA), y fueron llevados a cabo en el Servicio de Análisis Clínicos, del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, en colaboración con la Doctora Blázquez. Esta técnica para la determinación de la cTnT emplea dos anticuerpos monoclonales específicamente dirigidos contra la troponina T cardíaca humana [189, 190]. Estos anticuerpos reconocen dos epitopos (aminoácidos en posición 125-131 y 136-147) localizados en la parte central de la proteína de la troponina T cardíaca, los cuales están formados por 288 aminoácidos. Previamente al análisis se adaptó al analizador una curva patrón predefinida usando el *Troponin T STAT CalSet* (Ref. 05092736 119, Roche Diagnostics GmbH®, Mannheim, Germany). Las determinaciones de cTnT_{hs}, en sangre se realizaron directamente en las muestras recogidas, mientras que las muestras de líquido pericárdico fueron diluidas 1/50. Antes de ser estudiadas se hicieron curvas de calibración para las muestras de líquido pericárdico. Las concentraciones de cTnT_{hs} obtenidas para cada muestra se expresan en ng/L.

5. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos han sido realizados con el programa SPSS, versión 20 (SPSS Institute Inc., Cary, NC, USA). Los análisis descriptivos de los datos (media, desviación estándar y rango) han sido determinados y expresados como media \pm desviación estándar (DS).

Los análisis estadísticos de dependencia entre variables cuantitativas han sido llevados a cabo usando el coeficiente de correlación no paramétrica de Spearman.

Para la comparación de medias de una variable cuantitativa determinada entre dos grupos, ha sido utilizado el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney o test de Wilcoxon- Mann-Whitney para dos muestras independientes.

El test de Kruskal-Wallis, un test no paramétrico que hemos usado para comparar las medias de una variable cuantitativa entre tres o más grupos independientes.

Para todos los test empleados se ha considerado la significación estadística cuando se ha obtenido un valor de $P \leq 0.05$.

IV. RESULTADOS

1. Estudios de expresión génica

1.1 Cantidad, calidad e integridad postmortem del ARNm en tejido cardíaco, sangre y líquido pericárdico

Como paso previo a los estudios de expresión génica se ha procedido a determinar la concentración, la calidad y la integridad del ARNm, mediante el cálculo del rendimiento de la extracción, la ratio de absorbancia 260/280 nm y el valor de RIN (*RNA Integrity Number*), respectivamente. El ARNm se extrajo de cinco zonas cardíacas, de sangre postmortem y de líquido pericárdico en 30 cadáveres con diferentes datas conocidas. En la tabla 3 se presentan los valores del rendimiento de la extracción de ARNm, de la ratio de absorbancia 260/280 nm y de RIN para cada caso individual, y de acuerdo a la data de la muerte.

El rango del rendimiento obtenido en la extracción de ARNm en tejido miocárdico fue de entre 259.2 y 464.2 ng ARNm/mg (Tabla 3), siendo, en todos los casos, considerado suficiente para que se puedan llevar a cabo los análisis posteriores. No se encontró una correlación entre el rendimiento de la extracción en tejido miocárdico y la data de la muerte. El rendimiento obtenido en fluidos postmortem fue mayor que en tejido miocárdico, con un rango para sangre de 288-4800 ng ARNm/ml de sangre, y de 976-8192 ng ARNm/ml en líquido pericárdico. En fluidos tampoco se encontró correlación entre el rendimiento y la data de la muerte. Sin embargo, cuando se estudió la relación entre el rendimiento y los valores de RIN obtenidos para los diferentes tipos de muestras, solo se halló una correlación entre el rendimiento de la extracción de ARNm y los valores de RIN en líquido pericárdico (Figura 1A y Tabla 3, $R^2=0.5$; $P<0.01$). No se encontró relación alguna del rendimiento, con la ratio 260/280 nm, con el sexo, o con la edad en el momento de la muerte.

La ratio de absorbancia 260/280 nm encontrada en las distintas muestras de ARNm osciló entre 1.8 y 2.1 (Tabla 3), lo que indica la ausencia de contaminación en el ARNm extraído.

1. ESTUDIOS DE EXRESIÓN GÉNICA

Tabla 3. Valores obtenidos de rendimiento de la extracción de ARNm, en la ratio de absorbancia 260/280 (A_{260}/A_{280}), y de RIN, en tejido miocárdico (TM), sangre y líquido pericárdico (LP), para cada caso individual y de acuerdo a la data de la muerte.

Cadáver	Data** (horas)	Sexo	Edad (años)	Rendimiento ^a			Ratio A_{260}/A_{280}			RIN		
				TM ^b	Sangre	LP*	TM ^b	Sangre****	LP**	TM ^b	Sangre****/ ****	LP*/****
1	22	Hombre	59	265,4	2000	3008	2.08	1.99	2.05	6.2	6.4	6.1
2	17	Hombre	34	295,6	816	2944	2.07	2.01	2.02	6.5	3.5	6.6
3	5	Hombre	87	341	336	2368	2.07	1.99	2.13	5.5	4.6	88
4	24	Hombre	90	353	2432	1696	2.09	1.99	2.02	5.6	3.1	2.0
5	8	Hombre	83	334,4	2608	976	2.07	1.98	2.10	6.5	2.2	5.7
6	17	Hombre	80	326,2	1504	5104	2.11	1.96	2.07	7.0	3.3	6.6
7	12	Hombre	75	331,2	2032	4816	2.06	2.07	2.10	7.0	4.9	5.5
8	12	Hombre	54	464,2	2240	2400	2.11	2.05	2.10	8.0	7.2	5.1
9	16	Mujer	51	372	528	2432	2.08	1.81	2.07	9.8	2.4	6.0
10	19	Hombre	39	414	480	7248	2.09	1.95	2.09	7.6	2.8	6.7
11	20	Mujer	81	394,4	1680	992	2.08	1.89	2.02	7.0	2.9	6.4
12	17	Hombre	84	434,8	1488	1408	2.08	2.12	2.08	8.4	7.9	5.3
13	16	Hombre	69	366,6	2992	2256	2.08	2.09	2.12	7.1	7.8	8.1
14	10	Hombre	77	363,4	1424	2336	2.06	1.93	2.04	7.7	2.8	5.0
15	21	Hombre	65	332,6	848	1600	2.09	1.84	2.02	7.7	1.9	4.3
16	7	Hombre	57	372,4	1504	1568	2.07	2.13	2.11	9.2	9.3	8.8
17	15	Hombre	27	353,4	1120	1968	2.11	1.92	1.99	9.3	3.0	4.9
18	5	Hombre	70	416,4	2384	8192	2.09	2.00	2.10	7.9	5.1	3.7
19	19	Mujer	36	340	2176	1392	2.12	1.98	2.02	8.2	5.0	6.8
20	18	Mujer	65	386,2	7664	2208	2.12	1.95	2.03	7.7	3.3	4.9
21	22	Hombre	82	355,6	1744	1920	2.09	1.97	2.00	5.4	2.7	7.2
22	5	Hombre	77	352	4800	1600	2.10	1.84	2.11	5.8	2.5	2.8
23	10	Hombre	62	287,4	288	1216	2.10	1.87	2.11	6.9	4.4	6.5
24	19	Hombre	55	396	2896	4432	2.08	2.00	2.09	8.1	2.8	5.3
25	19	Hombre	54	320,6	1168	2128	2.08	2.01	2.00	7.7	2.5	3.3
26	23	Hombre	73	259,2	496	2000	2.08	2.00	2.02	7.5	6.0	6.6
27	19	Hombre	65	277	1072	1632	2.14	1.90	2.06	8.2	4.2	6.2
28	19	Mujer	65	301,6	4160	2304	2.09	2.10	2.04	8.1	2.3	3.6
29	11	Hombre	56	315,8	2656	1232	2.10	2.03	2.04	7.8	3.2	4.0
30	11	Hombre	79	383,4	1088	1472	2.10	2.06	2.11	6.8	7.5	5.7

^a Valores de rendimiento obtenidos en la extracción de ARNm expresados en ng ARNm/mg de tejido miocárdico o ml de fluido.

^b Valores de las cinco zonas cardíacas.

*Correlación entre el rendimiento de la extracción de ARNm y el RIN en líquido pericárdico ($R^2=0.5$; $P<0.01$).

**Correlación entre la ratio de absorbancia 260/280 nm en líquido pericárdico y la data de la muerte ($R^2=-0.7$; $P<0.01$).

***Correlación entre los valores de RIN en fluidos postmortem ($R^2=0.4$; $P<0.05$).

**** Correlación entre la ratio de absorbancia 260/280 nm y los valores de RIN en sangre ($R^2=0.6$; $P<0.01$)

Cuando se estudió la relación entre la ratio de absorbancia 260/280 nm y la data de la muerte para los distintos tipos de muestras, sólo se encontró una correlación negativa entre estas variables en el líquido pericárdico, lo que indica que altas ratios de absorbancia se asocian a datas de muerte más cortas (Figura 1B y Tabla 3; $R^2=-0.7$; $P<0.01$).

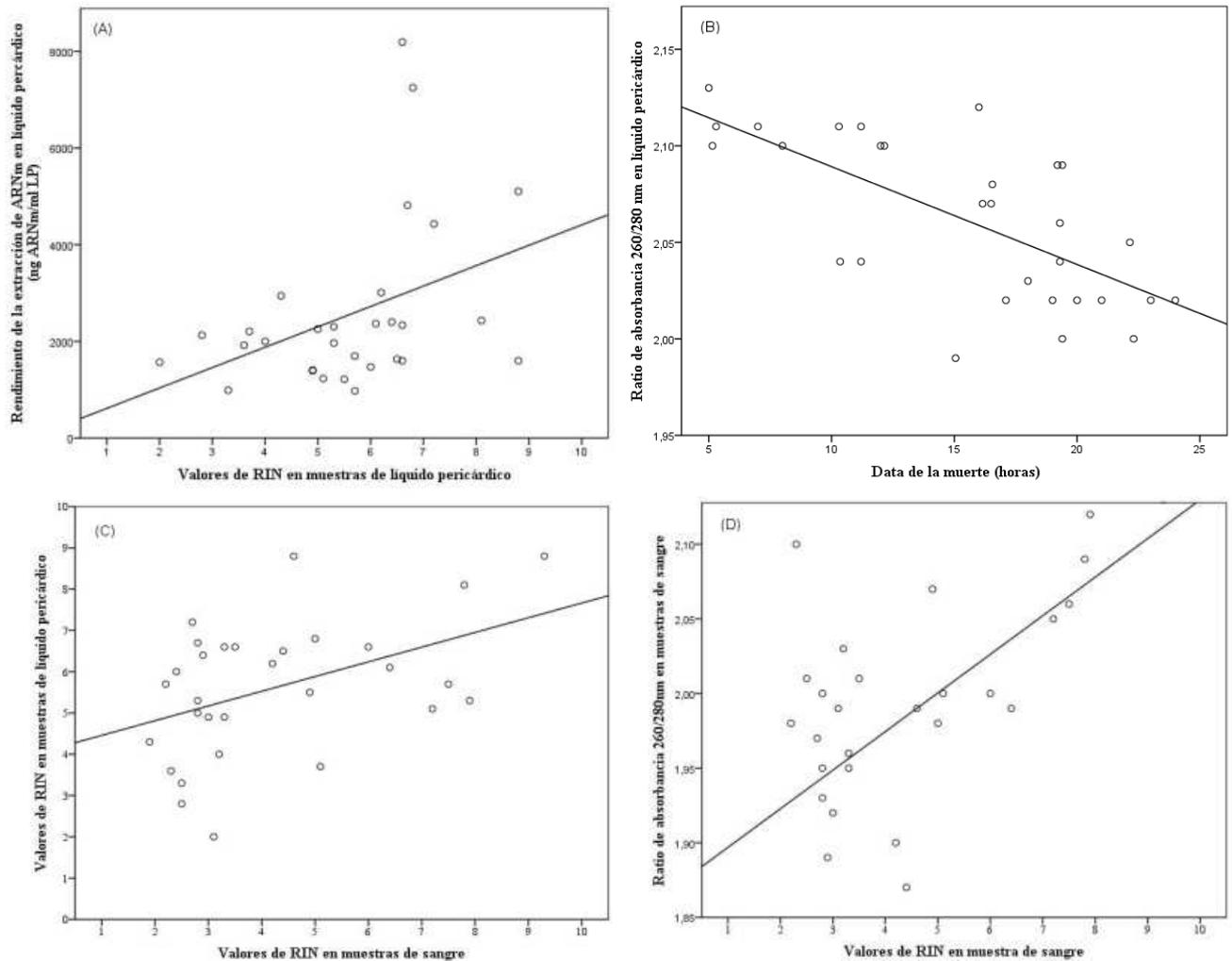


Figura 1. Correlaciones entre: (A) el rendimiento de ARNm obtenido y el RIN en muestras de líquido pericárdico (LP) ($R^2=0.5$; $P<0.01$); (B) la ratio de absorbancia 260/280 nm en líquido pericárdico y la data de la muerte ($R^2=-0.7$; $P<0.01$); (C) valores de RIN en líquido pericárdico y valores de RIN en sangre ($R^2=0.4$; $P<0.05$); (D) la ratio de absorbancia 260/280 nm y los valores de RIN en muestras de sangre ($R^2=0.6$; $P<0.01$).

No se encontró relación de la ratio de absorbancia 260/280 nm, con el rendimiento, con el sexo, y con la edad en el momento de la muerte. Cuando se estudió la correlación entre la ratio 260/280 nm y el RIN para todos los tipos de muestra, solo se obtuvieron resultados significativos para las muestras de sangre (Figura 1D, Tabla 3; $R^2=0.6$; $P<0.01$).

Los valores de RIN obtenidos fueron mayores en tejido miocárdico (7.4 ± 1.1) que en fluidos postmortem (4.25 ± 2.04 en sangre y 5.62 ± 1.63 en líquido pericárdico) (Tabla 3). Aunque no se encontró correlación entre los valores de RIN y la data de la muerte, si se halló una correlación entre los valores de RIN en sangre y en líquido pericárdico (Figura 1C y Tabla 3; $R^2=0.4$; $P<0.05$).

Cuando se estudió la influencia del sexo y la edad en el momento de la muerte sobre los valores de RIN no se obtuvieron resultados significativos. Finalmente considerar que los valores de RIN se consideraron como aceptables para los posteriores análisis de expresión génica, en todas las muestras analizadas.

Las diferencias en el rendimiento obtenido en la extracción del ARNm, la ratio de absorbancia 260/280 nm y los valores de RIN, también fueron estudiadas y comparadas específicamente entre las cinco zonas cardíacas (Figura 2). Se encontró correlación entre el rendimiento de la extracción de ARNm y los valores de RIN para el tabique interventricular (Figura 2A y 2C, $R^2=0.4$; $P<0.05$).

También se encontró correlación en la ratio absorbancia 260/280 nm entre las cinco zonas cardíacas (Figura 2B; $R^2=0.5$ a 0.8 ; $P<0.01$) y se hallaron resultados similares en los valores de RIN entre zonas cardíacas (Figura 2C; $R^2=0.4$ a 0.7 ; $P<0.01$).

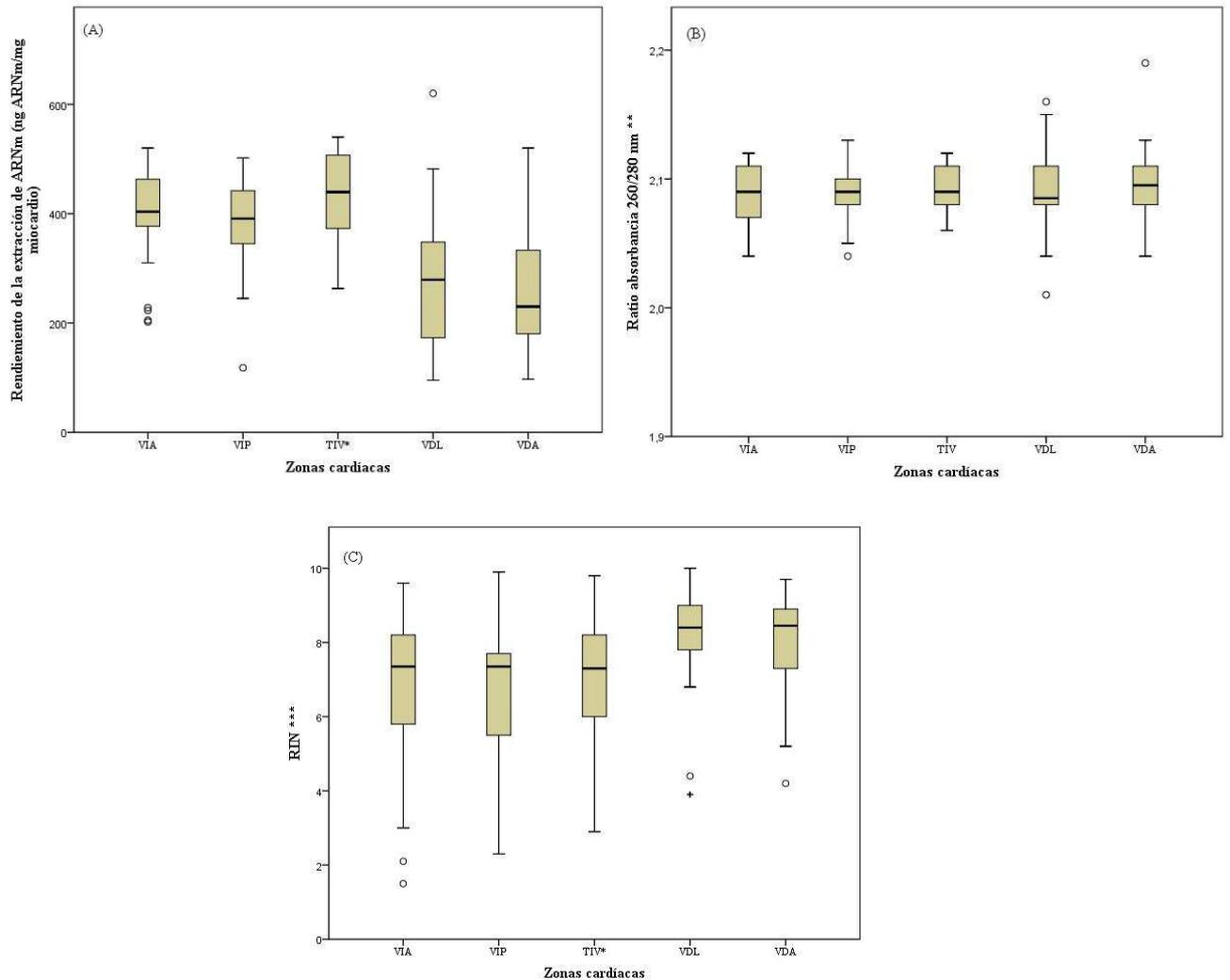


Figura 2. Rendimiento obtenido en la extracción del ARNm (ng ARNm/mg de tejido miocárdico) (A), ratio de absorbancia 260/280 nm (B) y RIN (C) en las cinco zonas cardíacas, abreviadas del siguiente modo, en esta y en las siguientes tablas y figuras: VIA (pared anterior del ventrículo izquierdo), VIP (pared posterior del ventrículo izquierdo), TIV (tabique interventricular), VIL (pared lateral del ventrículo derecho) y VDA (pared anterior del ventrículo derecho). En esta, y en las demás figuras, las cajas representan el rango intercuartílico y los segmentos verticales el valor máximo y mínimo de la muestra. Los valores que se salen se indican con círculos abiertos, y se definen como valores de entre 1.5 y 3 veces la longitud de la caja desde el extremo superior de la misma. Los valores extremos están indicados como una cruz, y se definen como aquellos valores de más de 3 veces la longitud de la caja desde el extremo superior de la misma. *Correlación entre el rendimiento obtenido en la extracción del ARNm y el RIN en el tabique interventricular ($R^2 = 0.4$; $P < 0.05$) (A) y (C). **Correlación en la ratio de absorbancia entre las distintas zonas cardíacas ($R^2 = 0.5-0.8$; $P < 0.01$) (B). ***Correlación en los valores de RIN entre las distintas zonas cardíacas ($R^2 = 0.4-0.7$; $P < 0.01$) (C).

1.2 Expresión génica: aspectos generales

1.2.1 Selección del gen endógeno o gen de referencia

Para identificar el gen más estable, y para poder validarlo como gen endógeno, se empleó la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), determinando, inicialmente, los niveles de expresión de cuatro genes que se usan habitualmente como genes endógenos o de referencia en muestras postmortem [147, 148, 159, 172]: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); beta actina (ACTB); proteína de unión TATA box (TBP); y Ciclofilina A (CYCA).

Los rangos de Ct obtenidos para los cuatro genes candidatos a genes de referencia, tras realizar los estudios de expresión con qPCR, tanto en muestras de tejido miocárdico y como de fluidos postmortem, procedentes de ocho cadáveres de nuestra muestra, se recogen en la tabla 4. En general se obtuvieron valores aceptables dentro de los rangos de Cts para cada gen endógeno de control en todas las muestras, y no se encontró correlación entre Cts y los valores de RIN.

Tabla 4. Rangos Ct^a para los distintos genes candidatos a endógenos en cuatro zonas cardíacas, sangre y líquido pericárdico (LP).

Gen candidato	Ct VIA	Ct VIP	Ct TIV	Ct VDL	Ct Sangre	Ct LP
GAPDH	28,33±1,52	28,90±0,99	27,84±1,77	26,74±1,62	27,80±1,78	25,83±1,15
BACT	25,22±1,64	25,15±2,05	25,07±2,42	24,28±1,03	23,94±2,40	22,21±1,32
TBPX	33,91±2,21	34,01±1,60	33,71±1,37	33,17±2,15	32,65±2,24	32,15±1,38
CYCA	24,91±2,30	25,40±1,24	25,33±2,60	24,64±1,35	25,07±2,85	23,53±4,65

^a Los datos se presentan como la media ± desviación estándar .

Para estudiar la estabilidad de los genes candidatos a gen de referencia, se comparó la expresión relativa, inicialmente en tejido miocárdico, de los genes diana TNNI3, MYL3, MMP3 y TGFB1, usando los cuatro genes endógenos (GAPDH, ACTB, TBP, y CYCA) (Figura 3).

Se detectaron niveles de expresión relativa similares, independientemente del gen endógeno usado para la cuantificación de la expresión relativa del gen diana, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión según el gen endógeno usado y para los distintos genes diana.

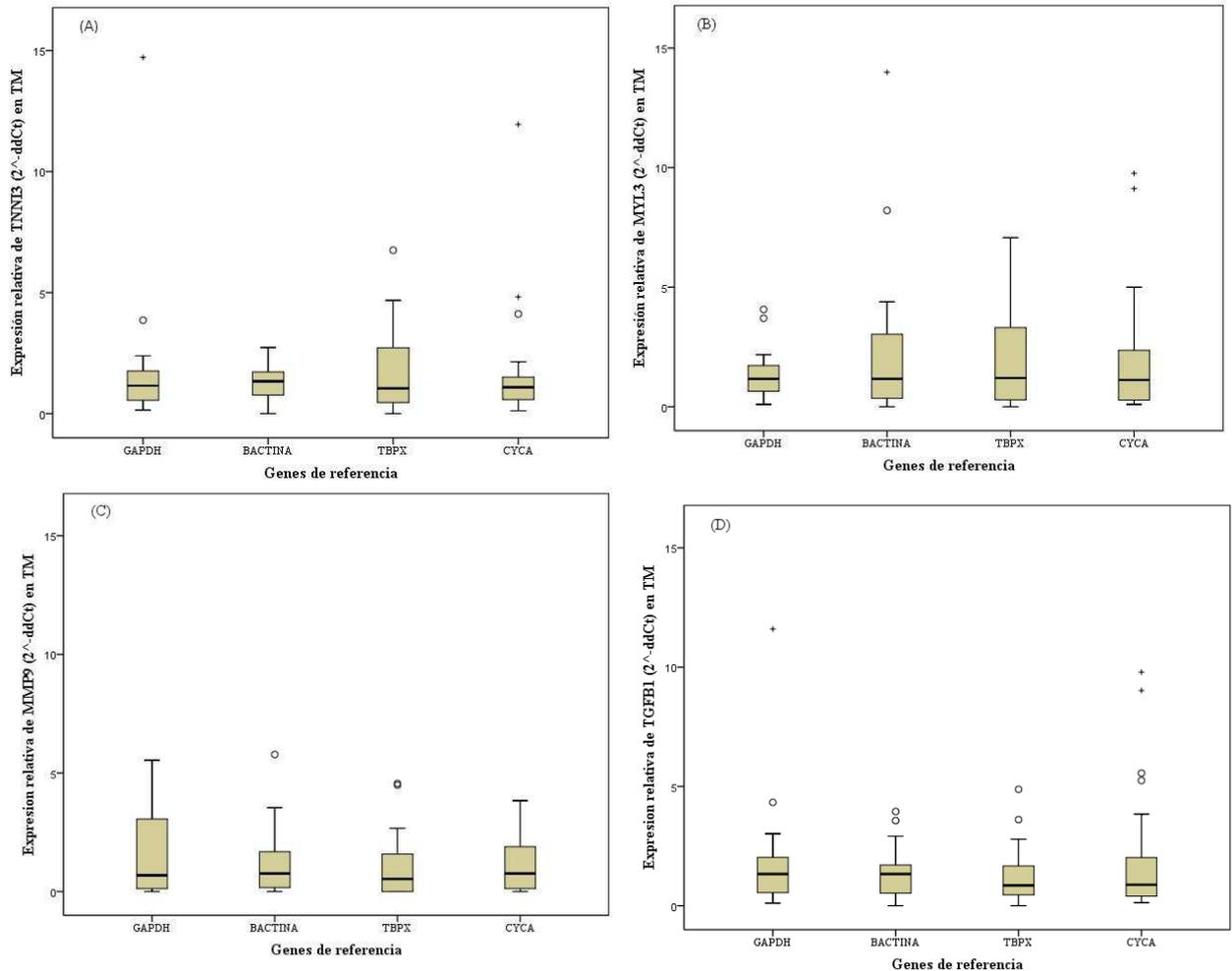


Figura 3. Niveles de expresión relativa de TNNI3 (A), MYL3 (B), MMP9 (C), y TGFB1 (D) ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) en muestras de tejido miocárdico (TM) usando diferentes genes endógenos o de referencia: GAPDH, ACTB, TBP, y CYCA.

La expresión relativa de los genes diana fue posteriormente estudiada en fluidos postmortem, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes diana cuando se usaban los diferentes genes de referencia, tanto en sangre (Figura 4), como en líquido pericárdico (Figura 5).

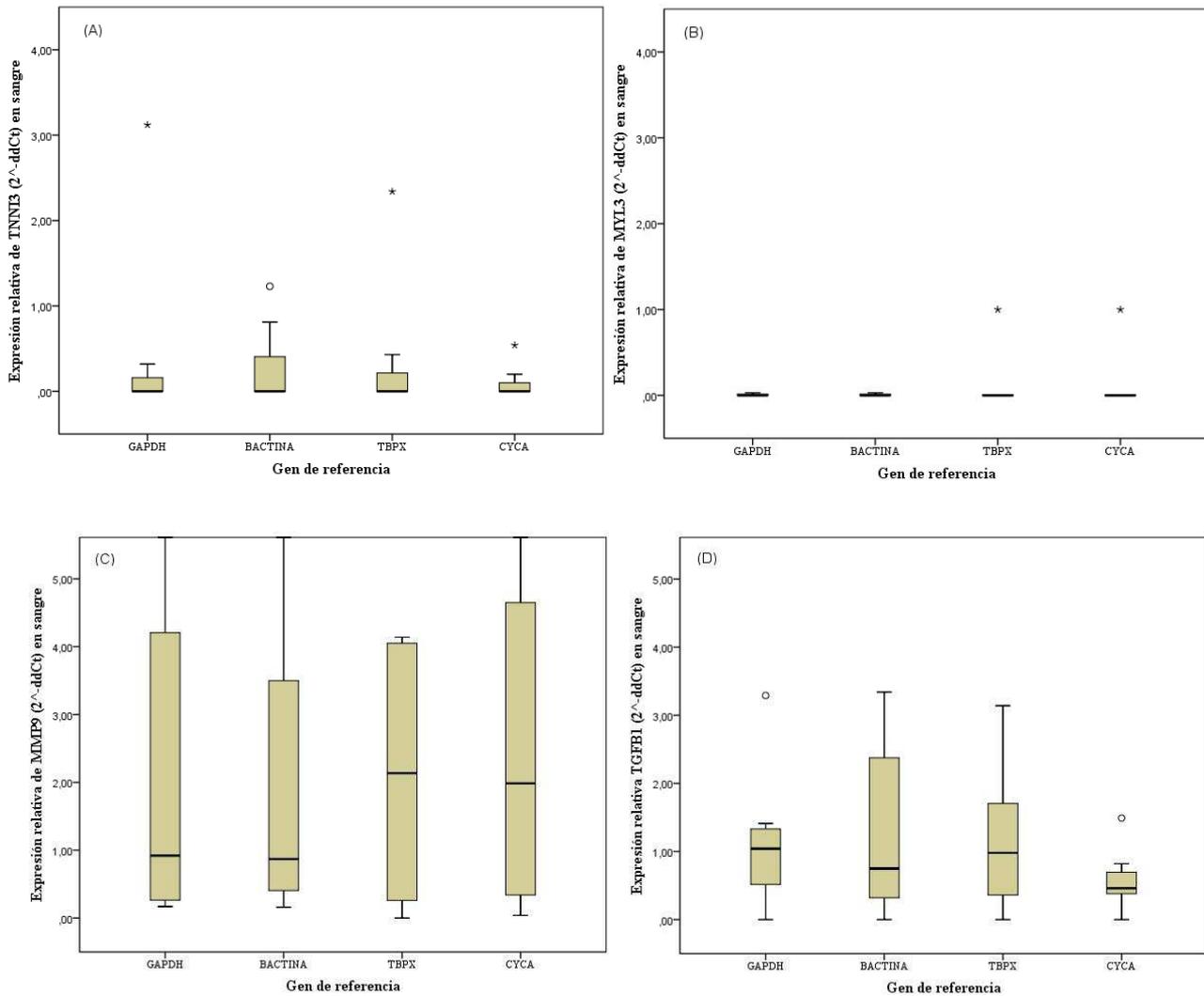


Figura 4. Niveles de expresión relativa de TNNI3 (A), MYL3 (B), MMP9 (C), y TGFB1 (D) (2^{-ddCt}) en muestras de sangre usando diferentes genes endógenos o de referencia: GAPDH, ACTB, TBP, y CYCA.

Además se estudió la relación entre la data de la muerte y los niveles de expresión de los genes endógenos, y no se encontró correlación para ningún tipo de muestra.

Finalmente se seleccionó como gen de referencia, para el estudio de la expresión relativa de los distintos genes diana, a la GAPDH, ya que este fue el que mostró mayor estabilidad para los tres tipos de muestras empleadas en nuestro estudio: tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico.

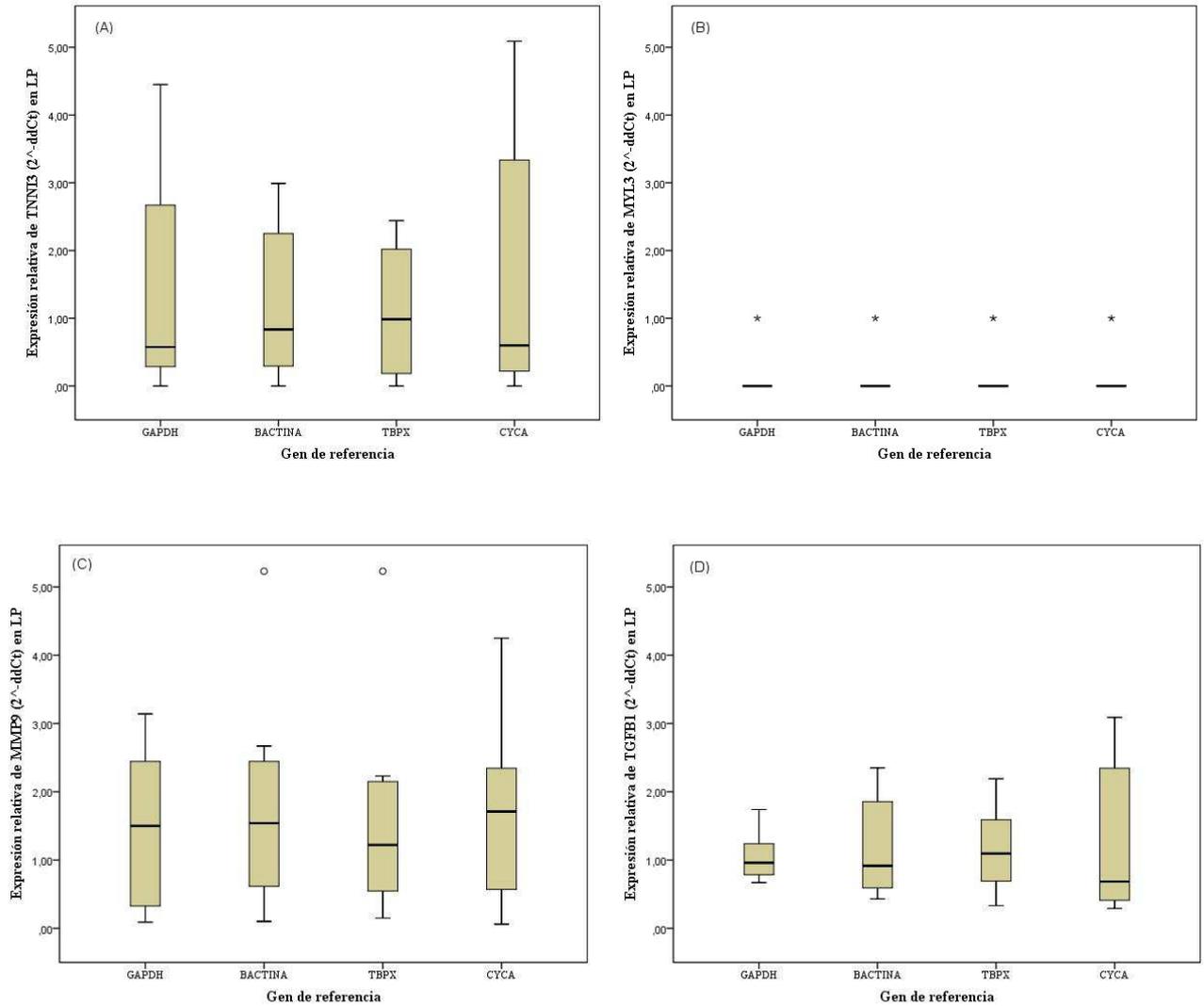


Figura 5. Niveles de expresión relativa de TNNI3 (A), MYL3 (B), MMP9 (C), y TGFB1 (D) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en muestras de líquido pericárdico (LP) usando diferentes genes endógenos o de referencia: GAPDH, ACTB, TBP, y CYCA.

1.2.2 Expresión génica: Influencia del rendimiento, la calidad y la integridad del ARNm. Influencia de la data de la muerte, el sexo, y la edad.

Los rangos de Ct obtenidos tras la realización de la qPCR para la GAPDH (gen endógeno o de referencia), y para todos los genes diana, tanto en tejido miocárdico como en fluidos postmortem se presentan en la tabla 5. Se obtuvieron unos rangos de Ct aceptables tanto para el gen endógeno como para los genes diana en todos los tipos de muestras, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon entre las diferentes zonas cardíacas.

Tabla 5. Rangos Ct^a obtenidos para el gen endógeno (GAPDH) y para los distintos genes diana, en las cinco zonas cardíacas, sangre y líquido pericárdico (LP).

Gen	Ct VIA	Ct VIP	Ct TIV	Ct s VDL	Ct VDA	Ct Sangre	Ct LP
GAPDH	23.82±2.37	27.33±1.74	27.09±2.58	25.10±2.23	24.32±1.78	25.81±2.18	23.47±1.28
TNNI3	20.75±2.53	21.49±2.32	20.99±2.63	19.86±1.98	18.75±1.44	35.32±1.00	34.26±1.25
MYL3	24.56±3.31	25.76±2.69	25.20±3.38	22.32±2.86	21.45±2.26	34.74±4.11	35.97±2.49
MMP9	34.48±2.50	34.48±2.28	34.10±2.55	34.02±2.30	33.65±2.15	28.58±3.00	31.68±2.09
TGFB1	30.57±1.94	30.43±1.54	30.46±1.53	30.25±1.70	29.57±1.42	27.82±2.11	27.48±1.41
VEGFA	29.33±1.75	29.74±1.65	29.83±3.14	28.95±2.19	28.18±1.43	29.91±1.98	27.78±1.38

^a Los datos se presentan como la media ± desviación estándar .

En el análisis de los Cts obtenidos para las diferentes moléculas, se encontró una correlación entre los valores de RIN y los valores de Ct para GAPDH, TNNI3 y MYL3 en tejido miocárdico ($P < 0.05$) (Figura 6), mientras que no se halló correlación en sangre ni líquido pericárdico.

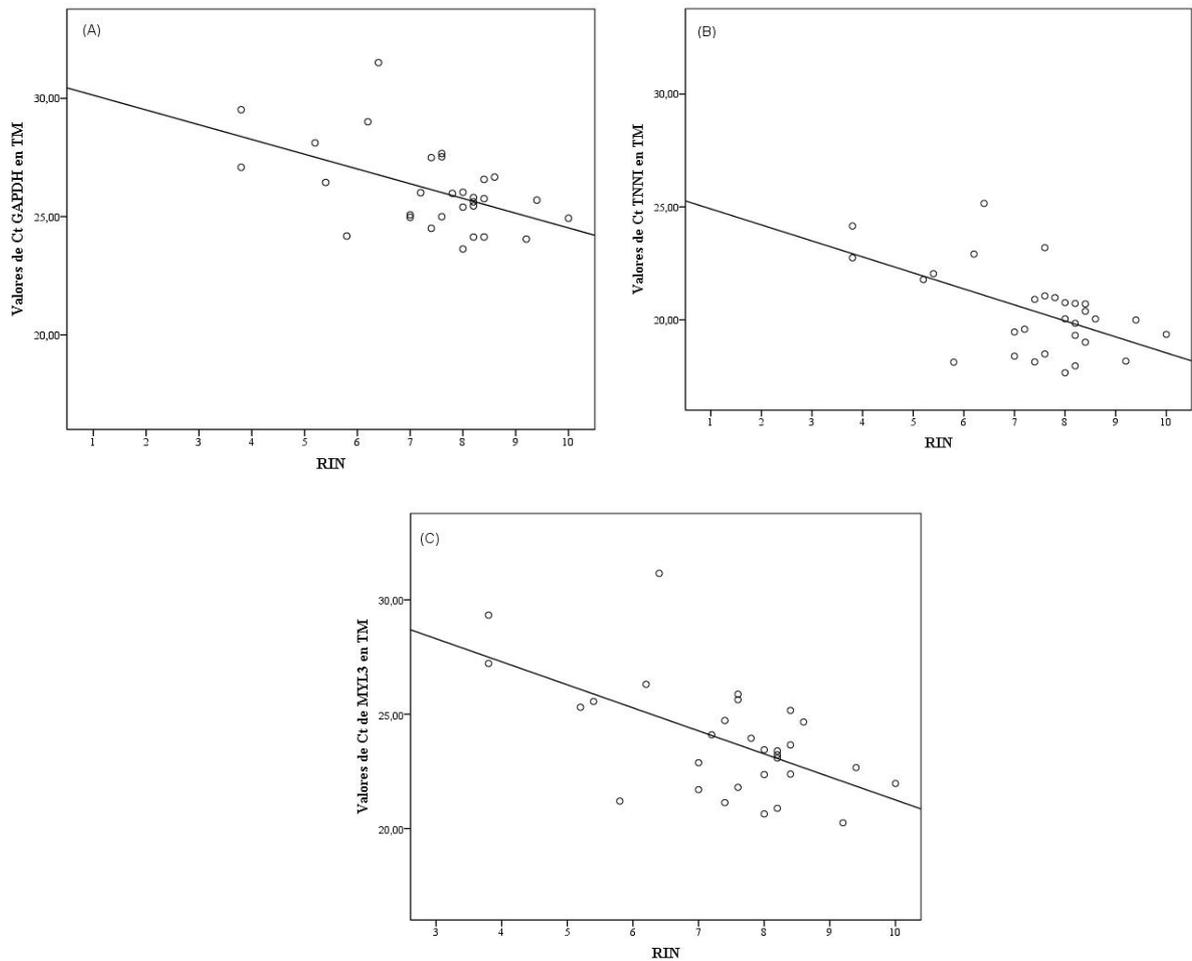


Figura 6. Valores de RIN y valores de Ct obtenidos para GAPDH (A), TNNI3 (B), MYL3 (C) en tejido miocárdico. *Correlación entre los valores de Ct de GAPDH y los valores de RIN ($R^2 = 0.5$; $P < 0.05$) (A). **Correlación entre los valores de Ct de TNNI3 Ct values y los valores de RIN ($R^2 = 0.5$; $P < 0.05$) (B). ***Correlación entre los valores de Ct de MYL3 y los valores de RIN ($R^2 = 0.5$; $P < 0.05$) (C).

Un aspecto fundamental para la validación de los resultados obtenidos es el estudio de la expresión relativa de los diferentes genes diana, y de la influencia de la integridad del ARNm y de la data de la muerte.

En lo que se refiere a la integridad del ARNm, en nuestro caso no se encontró correlación entre los valores de RIN y la expresión génica tanto en fluidos postmortem (Tabla 6) como en muestras de tejido miocárdico.

1. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Tabla 6. Valores de RIN y niveles relativos de expresión (2^{-ddCt}) de TNNI3, MYL3, MMP9, TGFB1 Y VEGFA en sangre y el líquido pericárdico (LP).

Cadáver	RIN		Expresión									
	Sangre	LP	Sangre					LP				
			TNNI3	MYL3	MMP9	TGFB1	VEGFA	TNNI3	MYL3	MMP9	TGFB1	VEGFA
1	6.4	6.1	0,14	34,26	0,61	1,57	0,59	8,84	1,06	0,93	1,14	0,90
2	3.5	6.6	1,09	1,02	5,80	0,19	0,94	18,15	2,33	0,93	0,27	0,65
3	4.6	88	3,34	3,13	6,72	0,82	0,45	0,06	0,25	0,46	0,40	0,44
4	3.1	2.0	2,12	1,98	0,45	0,8	1,64	0,39	1,74	5,92	0,39	0,95
5	2.2	5.7	0,06	0,09	1,33	0,69	0,86	3,53	0,23	1,29	1,52	0,93
6	3.3	6.6	2,14	0,36	4,36	2,44	0,81	8,19	2,27	0,27	1,08	0,75
7	4.9	5.5	1,12	0,54	0,09	1,77	0,57	5,04	0,31	0,08	1,67	0,89
8	7.2	5.1	0,55	0,07	0,11	1,37	1,16	12,34	0,76	0,62	1,32	0,67
9	2.4	6.0	35,42	33,17	0,73	0,03	0,26	8,77	1,12	1,93	0,48	0,36
10	2.8	6.7	0,09	0,08	7,37	0,48	0,69	0,11	0,48	5,40	1,01	2,42
11	2.9	6.4	0,23	9,72	3,03	1,23	3,52	2,12	0,94	1,12	0,83	1,21
12	7.9	5.3	0,33	0,31	0,34	1,59	3,62	6,87	2,53	4,60	1,46	1,43
13	7.8	8.1	0,70	0,65	0,31	3,7	1,12	6,84	4,69	4,15	2,67	10,93
14	2.8	5.0	0,08	0,07	6,24	0,48	0,30	1,91	0,15	1,84	0,47	0,75
15	1.9	4.3	22,12	20,72	0,25	1,2	1,79	0,10	0,46	0,17	1,03	1,05
16	9.3	8.8	8,92	0,86	4,15	7,19	1,09	2,72	1,81	0,48	0,36	1,33
17	3.0	4.9	0,81	35,75	0,83	0,34	1,56	0,16	10,47	1,64	1,42	1,42
18	5.1	3.7	0,96	0,63	1,43	0,94	0,61	3,20	0,60	1,16	0,87	0,50
19	5.0	6.8	48,09	2,49	0,93	1,82	2,79	0,20	0,87	7,31	0,86	0,84
20	3.3	4.9	0,11	0,10	1,36	1,17	1,17	0,09	0,42	9,03	1,57	1,65
21	2.7	7.2	0,35	0,33	1,60	0,23	1,29	3,62	0,28	0,03	0,62	1,68
22	2.5	2.8	0,32	0,30	0,57	1,41	1,81	1,89	1,05	1,94	1,51	0,58
23	4.4	6.5	0,13	0,21	0,40	2,81	0,68	0,06	0,27	0,43	1,27	1,34
24	2.8	5.3	2,74	0,09	2,19	1,19	0,79	0,21	0,92	2,29	2,56	1,56
25	2.5	3.3	0,40	33,14	0,17	0,71	1,30	0,38	1,67	1,37	1,36	0,74
26	6.0	6.6	24,51	2,45	13,89	5,13	3,00	0,08	0,37	0,25	1,16	1,01
27	4.2	6.2	4,11	0,23	0,37	0,77	0,93	14,49	0,61	0,65	1,32	0,97
28	2.3	3.6	2,84	0,21	0,27	1,27	2,15	0,38	11,83	5,20	1,14	0,64
29	3.2	4.0	0,51	0,47	0,48	1,28	0,27	0,62	2,77	0,22	1,92	0,70
30	7.5	5.7	0,57	0,08	1,11	0,68	0,55	0,04	0,17	0,07	0,92	0,88

También se estudió la expresión génica de las moléculas diana en relación a la data de la muerte (Figura 7). Inicialmente se encontró una correlación entre la data de la muerte y la expresión de dos moléculas en tejido miocárdico, TNNI3 ($R^2 = -0.435$; $P < 0.05$) y MYL3 ($R^2 = -0.731$; $P < 0.01$). Cuando esta correlación se estudió por zonas cardíacas, para TNNI3 se observó que existía una relación data-expresión para las muestras procedentes de ventrículo derecho, mientras que para MYL3, esta correlación se presentaba en todas las zonas cardíacas estudiadas (Tabla 7).

Tabla 7. Estudios de correlación entre la data de la muerte y la expresión génica (2^{-ddCt}) de TNNI3 y MYL3 en muestras de tejido miocárdico.

Molécula	Zona Cardíaca	R²	P
TNNI3	TM^a	-0,435	<0,05
	VDL	-0,504	<0,01
	VDA	-0,365	<0,05
MYL3	TM^a	-0,731	<0,01
	VIA	-0,545	<0,01
	VIP	-0,563	<0,01
	TIV	-0,527	<0,01
	VDL	-0,728	<0,01
	VDA	-0,689	<0,01

^aTM: Tejido miocárdico, media de las 5 zonas cardíacas

Por último, y en relación a la data de la muerte, comparamos la expresión de las diferentes moléculas, separando la muestra en dos grupos de data de muerte:

- Cadáveres de menos de 12 horas de data (n=11).
- Cadáveres con más de 12 horas (n=19).

No encontramos diferencias en los niveles de expresión, para TNNI3 (Figura 7A), no para TGFB1 (Figura 7D). Sin embargo, sí se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de MYL3 (Figura 7B), en muestras de tejido miocárdico (1.95 ± 0.66 vs. 1.07 ± 0.77 ; $P < 0.05$), y en sangre (0.59 ± 0.88 vs. 6.78 ± 9.44 ; $P < 0.05$), según la data.

Se observaron diferencias similares en la expresión de VEGFA en sangre entre los dos grupos de data (Figura 7E; 0.76 ± 0.45 vs. 1.58 ± 0.99 ; $P < 0.01$), y en la expresión de MMP9 en líquido pericárdico (Figura 7C; 0.78 ± 0.67 vs. 3.48 ± 5.02 ; $P < 0.05$).

1. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

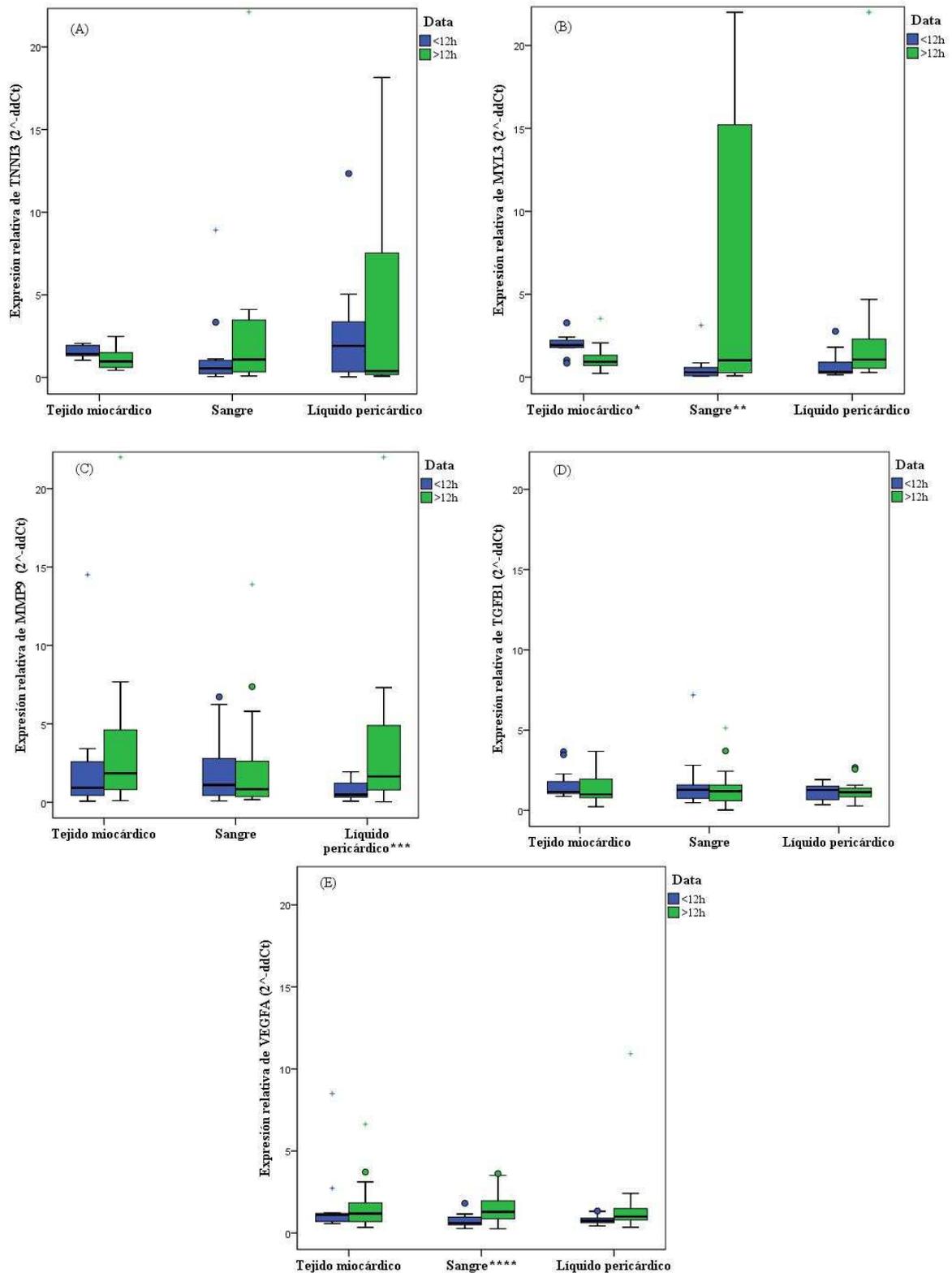


Figura 7. Expresión relativa de TNNI3 (A), MYL3 (B), MMP9 (C), TGFB1 (D) y VEGFA (E) ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico en casos con data de menos de 12 horas o mayor de 12 horas. *Diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de MYL3 en tejido miocárdico y en **sangre ($P < 0.05$) (B). *** Diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de MMP9 en líquido pericárdico ($P < 0.05$) (C). **** Diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de VEGFA en sangre ($P < 0.01$) (E).

En este trabajo también se valoró si podría existir una relación entre la expresión génica de las distintas moléculas diana y el sexo, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión entre hombres y mujeres. Además, se consideró la posibilidad de que la expresión pudiera estar influenciada por la edad. En este sentido se hicieron estudios para valorar la relación entre las expresiones génicas de las moléculas diana consideradas, y la edad de los individuos en el momento del fallecimiento, sin que se hallara correlación entre ambas. Cuando la muestra se analizó estableciendo tres grupos de edad: <45 años, 45-65 años y > de 45 años, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de las moléculas diana, entre los distintos grupos de edad.

1.2.3 Expresión génica. Comparación de resultados entre muestras de tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico.

Se comparó, en un primer lugar, la expresión relativa de las diferentes moléculas diana en relación a los distintos tipos de muestra (tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico), y en un segundo lugar, se analizó esta expresión en las diferentes zonas cardíacas.

En tejido miocárdico, se encontró una correlación entre la expresión relativa de las moléculas de inflamación y angiogénesis (MMP9, TGFB1 y VEGF) (R^2 : 0.522-0.621; $P < 0.05$) (Figura 8A). También se observó una correlación, en muestras de sangre, entre la expresión de TNNI3 y MYL3 ($R^2 = 0.429$; $P < 0.05$) (figura 8A), y en la expresión de MYL3 en sangre y líquido pericárdico ($R^2 = 0.383$; $P < 0.05$) (Figura 8A).

Por otro lado, cuando analizamos la expresión de las moléculas diana (TNNI3, MYL3, MMP9, TGFB1 y VEGFA), en las diferentes zonas cardíacas encontramos que los niveles de expresión son similares para todas ellas, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre áreas (Figura 8B). No obstante, sí se han detectado correlaciones para la expresión de todos los genes diana entre todas las zonas cardíacas (Tabla 8).

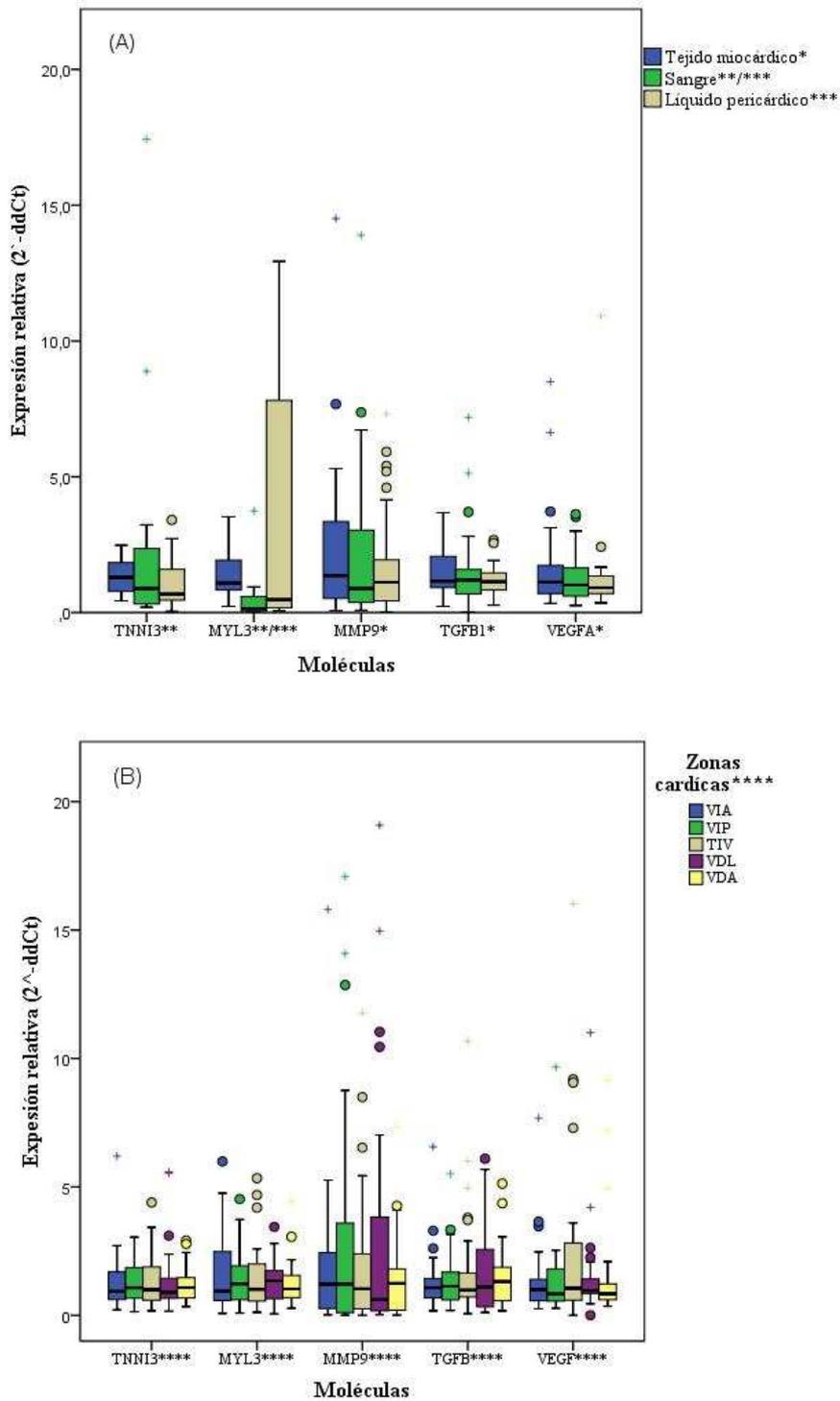


Figura 8. Expresión relativa de TNNI3, MYL3, MMP9, TGFB1, y VEGFA (2^{-ddCt}) en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico (A), y en las diferentes zonas cardíacas (B). *Correlación entre la expresión relativa de MMP9, TGFB1 y VEGF (R^2 : 0.522-0.621; $P < 0.05$). ** Correlación en sangre entre la expresión relativa de TNNI3 y MYL3 ($R^2 = 0.429$; $P < 0.05$). *** Correlación entre la expresión relativa de MYL3 en sangre y en líquido pericárdico ($R^2 = 0.383$; $P < 0.05$). **** Correlación entre las diferentes zonas cardíacas para la expresión relativa de todas las moléculas estudiadas (Valores en Tabla 8; $P < 0.05$).

Tabla 8. Estudios de correlación de expresión génica (2^{-ddCt}) entre las distintas zonas cardíacas (VIA, VIP, TIV, VDL, VDA) para los diferentes genes diana.

Molécula	R²	P
TNNI3	0,37-0,61	<0,05
MYL3	0,42-0,68	<0,05
MMP9	0,43-0,84	<0,05
TGFB1	0,56-0,64	<0,01
VEGFA	0,38-0,81	<0,05

1.3 Expresión génica y causas de muerte

Como ya se ha establecido, en nuestro trabajo, la población de estudio se clasificó en cuatro grupos en relación a la causa de la muerte, siempre después de que realizarse una autopsia completa, detallada y minuciosa, tal y como ha sido establecido en los estándares Europeos [2, 4, 9, 37, 39-43].

Basándonos en antecedentes clínicos previos al fallecimiento, a la información obtenida durante el levantamiento del cadáver, a la autopsia y a los hallazgos toxicológicos e histopatológicos, los individuos fallecidos se clasificaron, de acuerdo a la similitud del mecanismo fisiopatológico de la causa de la muerte, en: muertes súbitas cardíacas isquémicas (14 casos-47%); politraumatismos (7 casos-23%); asfixias mecánicas (6 casos-20%); y otras muertes naturales (3 casos-10%).

Para estos cuatro grupos de causa de muerte se estudió y comparó la expresión génica de los cinco genes diana: TNNI3, MYL3, MMP9, TGFB1 y VEGFA.

En la tabla 9 podemos observar los niveles medios de expresión relativa (\pm desviación estándar) de cada una de estas moléculas y para cada grupo de causa de muerte.

Tabla 9. Expresión relativa (2^{-ddCt})^a de TNNI3 y MYL3 (A), y de MMP9, TGFB1 y VEGFA (B) en tejido miocárdico (TM), sangre y líquido pericárdico (LP) en los cuatro grupos de causa de muerte: Muerte súbita cardiaca isquémica (MSCi), politraumatismo (PT), asfixia mecánica (AM) y otras muertes naturales (OM).

(A)	N	TNNI3			MYL3		
		TM	SA	LP	TM	SA	LP
MSCi	14	1,26±0,56	4,06±8,17	4,42±4,28	1,44±0,85	40,25±78,70	1,24±1,43
PT	7	1,42±0,73	0,42±0,38	4,71±6,36	1,44±1,08	59,04±151,16	9,74±22,83
AM	6	1,07±0,65	15,12±21,04	3,00±4,25	1,07±0,70	6,39±13,16	11,37±24,73
OM	3	1,7±0,34	1,21±1,33	0,71±1,03	1,75±0,58	0,16±0,12	0,71±0,48

(B)	N	MMP9			TGFB1			VEGFA		
		TM	SA	LP	TM	SA	LP	TM	SA	LP
MSCi	14	1,93±2,10	2,34±4,52	1,07±1,24	1,76±1,20	2,77±2,21	1,38±0,61	1,71±2,07	1,15±0,74	2,08±3,32
PT	7	15,61±24,08	3,60±2,84	2,22±2,00	1,37±0,87	0,65±0,54	0,87±0,46	2,26±2,22	1,70±1,34	1,36±0,60
AM	6	3,02±2,05	1,35±1,52	12,61±20,94*	1,34±0,91	1,26±0,83	0,92±0,44	1,02±0,53	1,47±0,92	0,86±0,43
OM	3	0,99±0,57	1,29±0,82	1,43±1,19	1,08±0,15	1,09±0,37	1,66±0,83	1,48±1,09	1,05±0,67	1,01±0,50

^aLos resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. *Diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa de MMP9 en líquido pericárdico en casos de muerte por asfixia mecánica.

Al analizar estos resultados cabe destacar que, atendiendo a los grupos de causa de muerte, la expresión de TNNI3 en sangre es mayor en muertes por asfixia mecánica, y menor en líquido pericárdico en los casos de otras muertes naturales. Para MYL3 su expresión en sangre es mayor en casos de MSCi y politraumatismos, en comparación con los otros grupos de causa de muerte, y es mayor en casos de politraumatismo y asfixia en líquido pericárdico. Para MMP9 la expresión en tejido es superior en muertes por politraumatismo, y en líquido pericárdico es mayor en asfixias mecánicas. Entre estas diferencias detectadas en nuestros casos, sólo se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa de MMP9 en líquido pericárdico para las muertes por asfixia mecánica, en las cuales la expresión de esta molécula en este fluido es mayor en comparación con otras causas de muerte ($P < 0.05$) (Figura 9). La expresión relativa de TGFB1 y VEGF en los diferentes grupos de causa de muerte es muy homogénea, sin que existan diferencias entre ellas.

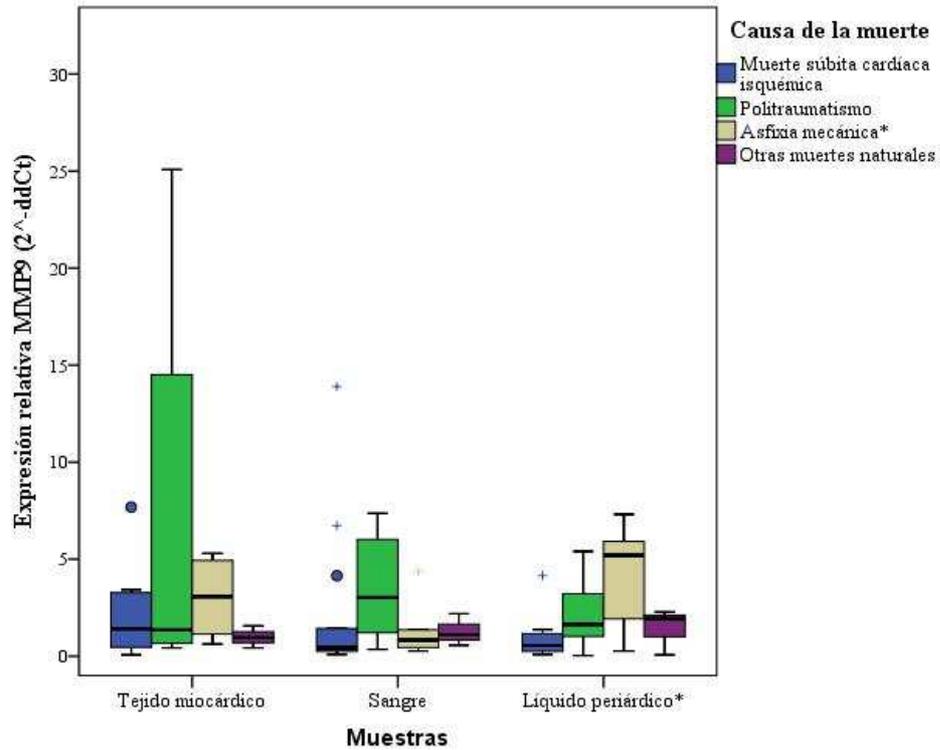


Figura 9. Expresión relativa de MMP9 en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico, por grupos de causa de muerte: muertes súbitas cardíacas isquémicas, politraumatismo, asfixia mecánica, y otras muertes naturales. *Diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa de MMP9 en líquido pericárdico para las muertes por asfixia mecánica ($P < 0.05$)

También se estudió, en relación a causa de la muerte, la expresión relativa de las diferentes moléculas comparando las diferentes zonas cardíacas (Tabla 10).

Se puede observar que los resultados de expresión relativa son bastante homogéneos, en relación a la causa de la muerte, para las diferentes moléculas estudiadas y para las diferentes zonas consideradas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ningún gen diana entre los cuatro grupos de causa de muerte, para las diferentes zonas cardíacas.

Tabla 10. Expresión relativa (2^{-ddCt})^a de TNNI3, MYL3(A), y de MMP9 y TGFB1 (B) y VEGFA (C) en las diferentes zonas cardíacas (VIA, VIP, TIV, VDL, VDA), en los cuatro grupos de causa de muerte: Muerte súbita cardíaca isquémica (MSCi), politraumatismo (PT), asfixia mecánica (AM) y otras muertes naturales (OM).

(A)	TNNI3					MYL3				
	VIA	VIP	TIV	VDL	VDA	VIA	VIP	TIV	VDL	VDA
MSCi	1,20±0,71	1,21±0,72	1,29±1,23	1,41±1,39	1,20±0,81	1,38±1,31	1,43±0,99	1,62±1,44	1,40±0,89	1,37±1,03
PT	2,15±1,95	1,39±1,12	1,47±0,91	1,12±0,67	0,97±0,54	1,75±1,99	1,42±1,23	1,66±1,72	1,30±0,75	1,05±0,41
AM	0,66±0,21	1,05±0,62	1,08±0,94	1,59±1,99	0,99±0,30	1,31±1,10	1,35±1,62	0,73±0,47	0,80±0,63	1,14±1,04
OM	1,37±1,10	2,03±0,86	2,08±0,81	1,19±0,60	1,82±0,70	1,85±1,42	1,76±0,30	1,92±0,57	2,18±0,96	1,03±0,52

(B)	MMP9					TGFB1				
	VIA	VIP	TIV	VDL	VDA	VIA	VIP	TIV	VDL	VDA
MSCi	1,48±1,37	2,28±3,71	2,45±3,56	2,30±3,06	1,13±1,20	1,32±0,91	1,68±1,38	2,10±2,79	2,14±2,03	1,55±1,56
PT	10,75±12,03	5,99±6,90	21,34±36,61	18,04±38,89	21,95±32,87	1,92±2,13	1,24±1,15	1,53±1,31	1,08±0,98	1,10±0,72
AM	1,67±1,93	1,90±1,83	1,86±2,17	7,04±7,24	2,66±2,67	0,91±0,36	0,88±0,37	1,78±2,19	1,61±1,57	1,53±1,06
OM	0,87±0,75	0,91±0,69	1,24±1,11	0,21±0,19	1,71±0,89	0,84±0,14	1,01±0,47	0,73±0,32	1,25±0,95	1,59±0,69

(C)	VEGFA				
	VIA	VIP	TIV	VDL	VDA
MSCi	1,50±1,89	1,71±2,37	2,94±4,38	1,28±0,98	1,15±1,15
PT	1,72±1,30	1,47±0,91	3,25±3,62	2,68±3,72	2,17±3,14
AM	0,98±0,62	0,87±0,74	1,31±1,07	1,05±0,82	0,87±0,39
OM	0,87±0,31	1,06±0,68	1,28±1,12	1,20±0,26	2,97±3,64

^aLos resultados se expresan como la media ± desviación estándar

Dentro del grupo de causa de muerte MSCi, se llevó a cabo una subdivisión, diferenciando aquellos casos en los que existía un diagnóstico anatomopatológico de IAM (establecido por el hallazgo de necrosis de miocardiocitos en el estudio microscópico con H&E del corazón, o bien por la existencia de infiltrado inflamatorio agudo o subagudo), de los que no lo tenían (casos diagnosticados como MSC de origen isquémico, por la presencia de signos inespecíficos de isquemia y/o infarto de miocardio antiguo, con evidencia de cardiopatía isquémica severa, y con antecedentes personales de cardiopatía isquémica, una vez descartadas otras causas de muerte).

Cuando se analizó la expresión relativa de las diferentes moléculas entre el grupo de MSCi (n=5) con al grupo de MSCi+IAM (n=9), en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas,

siendo los valores de expresión para las diferentes moléculas muy similares cuando se comparan los casos de MSCi con los de MSCi con IAM. Solo llama la atención que para la MYL3 la expresión relativa en sangre es mayor en los casos de MSCi sin IAM, aunque no existe significación (Tabla 11).

Tabla 11. Expresión relativa (2^{-ddCt})^a de TNNI3 y MYL3 (A) y de MMP9, TGFB1 y VEGFA (B) en tejido miocárdico (TM), sangre y líquido pericárdico (LP) en casos de muerte súbita cardiaca isquémica (MSCi; n=5) y de muerte súbita cardiaca isquémica con IAM (MSCi+IAM; n=9).

(A)	TNNI3			MYL3		
	TM	Sangre	LP	TM	Sangre	LP
MSCi	1,27±0,62	4,06±8,17	4,42±4,28	1,20±,079	40,25±78,70	1,24±1,42
MSCi+IAM	1,25±0,49	6,2±9,02	3,69±6,17	1,88±0,85	5,04±8,84	0,94±1,03

(B)	MMP9			TGFB1			VEGFA		
	TM	Sangre	LP	TM	Sangre	LP	TM	Sangre	LP
MSCi	2,02±2,5	2,34±4,52	1,07±1,24	1,84±1,23	2,77±2,21	1,38±0,61	1,27±0,86	1,15±0,74	2,08±3,32
MSCi+IAM	1,77±1,28	1,85±2,76	0,53±0,40	1,61±1,27	1,00±0,23	1,11±0,56	2,52±3,36	0,81±0,60	0,73±0,28

^aLos resultados se expresan como la media ± la desviación estándar.

Cuando se realizó una comparación de la expresión relativa entre estos dos subgrupos de causa de muerte por zonas cardíacas, de forma general no se aprecian diferencias importantes en la expresión cuando se comparan las MSCi y las MSCi con IAM (Tabla 12), sin embargo si se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas, de modo que la expresión de MMP9 (Tabla 12; Figura 10A) y de VEGFA (Tabla 12; Figura 10C), en muestras de la pared lateral de ventrículo derecho es mayor en casos de MSCi con IAM, que en aquellos casos que no tienen IAM ($P<0.05$).

Por otro lado, la expresión de TGFB1 (Tabla 12; Figura 10B) en el tabique interventricular es mayor en MSCi sin IAM (por tanto menor en MSCi con IAM) ($P>0.05$).

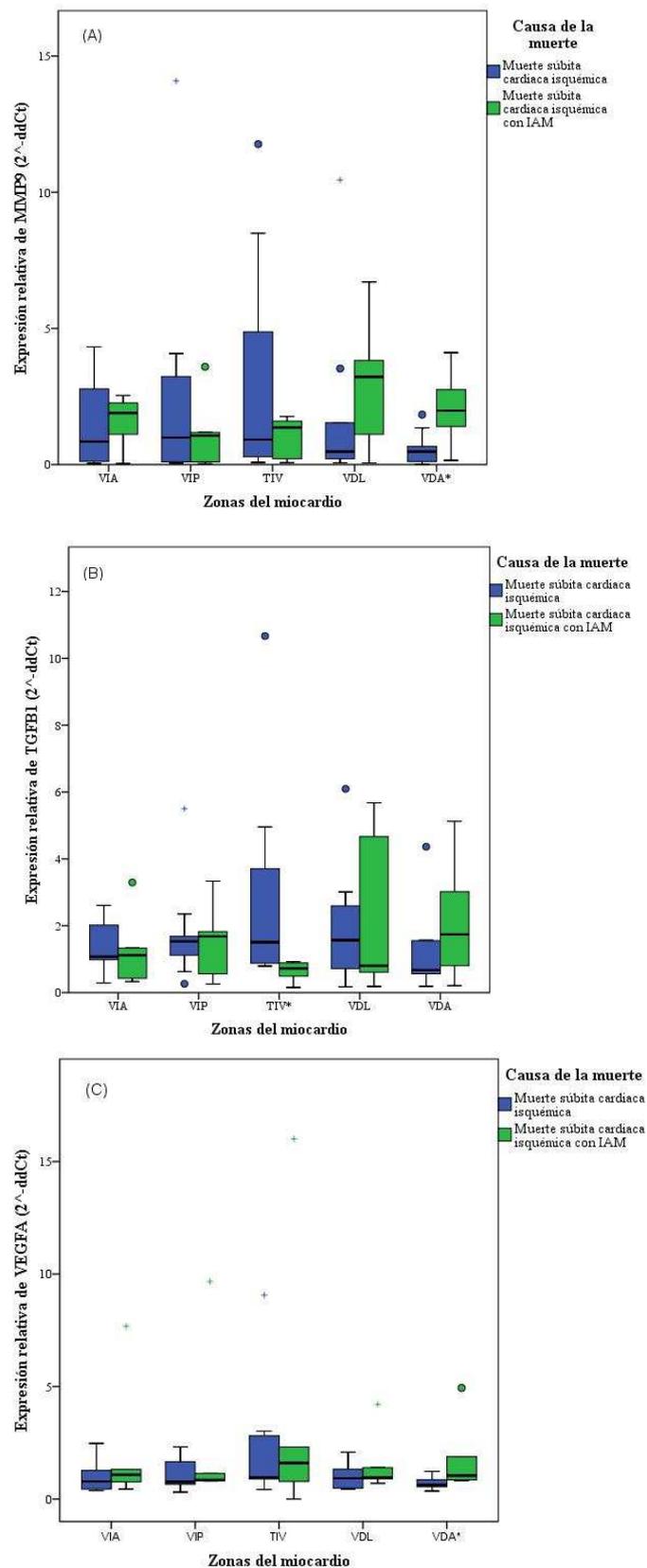


Figura 10. Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de MMP9, TGFB1 y VEGFA en las diferentes zonas cardíacas por grupos de causa de muerte: muertes súbitas cardíacas isquémicas (MSCi) y muertes súbitas cardíacas isquémicas con IAM. *Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de MSCi y MSCi con IAM en la expresión relativa de MMP9 en VDA, de TGFB1 en TIV y de VEGFA en VDA ($P < 0.05$).

Tabla 12. Expresión relativa (2^{-ddC_t})^a de TNNT3, MYL3(A), de MMP9 y TGFB1 (B) y de VEGFA (C) en las diferentes zonas cardíacas (VIA, VIP, TIV, VDL, VDA), en casos de muerte súbita cardíaca isquémica (MSCi; n=5) y de muerte súbita cardíaca isquémica con IAM (MSCi+IAM; n=9).

(A)	TNNT3					MYL3				
	VIA	VIP	TIV	VDL	VDA	VIA	VIP	TIV	VDL	VDA
MSCi	1,26±0,83	1,29±0,85	1,50±1,49	1,17±0,85	1,13±0,81	1,11±1,02	1,12±0,77	1,20±1,37	1,37±1,02	1,19±0,62
MSCi+IAM	1,10±0,50	1,07±0,45	0,90±0,45	1,86±2,10	1,33±0,88	1,86±1,74	1,99±1,18	2,38±1,37	1,44±0,68	1,69±1,57

(B)	MMP9					TGFB1				
	VIA	VIP	TIV	VDL	VDA	VIA	VIP	TIV	VDL	VDA
MSCi	1,43±1,59	2,89±4,49	3,26±4,26	1,93±3,38	0,60±0,62	1,32±0,80	1,76±1,53	2,92±3,25*	2,01±1,82	1,20±1,28
MSCi+IAM	1,57±1,01	1,19±1,44	1,00±0,80	2,99±2,58	2,08±1,48*	1,30±1,20	1,53±1,22	0,64±0,32	2,39±2,58	2,18±1,96

(C)	VEGFA				
	VIA	VIP	TIV	VDL	VDA
MSCi	1,10±0,77	1,18±0,75	2,27±2,7	1,10±0,62	0,72±0,27
MSCi+IAM	2,26±3,05	2,66±3,92	4,14±6,69	1,63±1,46	1,91±1,75*

^aLos resultados se expresan como la media ± desviación estándar. * Diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa de MMP9, TGFB1 y VEGF entre las MSCi y las MSCi con IAM (P<0.05).

2. Estudios bioquímicos: Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnThs) en sangre y líquido pericárdico

En los 30 cadáveres estudiados se ha llevado a cabo la determinación de Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnThs) en muestras de sangre y líquido pericárdico, siendo esta la primera vez que este tipo de análisis se llevan a cabo en el ámbito forense. Los valores obtenidos de cTnThs en sangre y líquido pericárdico en nuestras muestras postmortem se muestran en la tabla 13. Debemos considerar que, en la práctica clínica, y para el diagnóstico del IAM, los valores de normalidad para la cTnThs en sangre se encuentran entre 0 y 14 ng/L. En primer lugar debemos destacar que tanto en sangre como en líquido pericárdico se han obtenido valores marcadamente más altos que los que se manejan en el vivo (Tabla 13; rango de cTnThs de 3-10000 ng/L para sangre y de 872-50000 ng/L para líquido pericárdico) no pudiendo por tanto ser comparados con estos. Cabe también destacar que los valores obtenidos en líquido pericárdico son mayores que en sangre, siendo estos del orden de 16 veces mayores (Tabla 13, media de cTnThs en sangre de 1847 ng/L y en líquido pericárdico de 29677 ng/L). Cuando se estudio la relación entre los niveles de cTnThs en sangre y el líquido pericárdico se pudo observar la existencia de una correlación entre ambos (Tabla 13; $R^2 = 0.449$; $P < 0.01$).

Tabla 13. Niveles postmortem de Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnThs) en sangre y líquido pericárdico (LP) postmortem.

cTnThs ^a	Rango	Media±D.E.
Sangre*	3-10000	1847±3164
LP*	872-50000	29677±19336

^aLos resultados se expresan como la media ± desviación estándar y las concentraciones de cTnThs están expresadas en ng/L. *Correlación entre los niveles de cTnThs en sangre y en líquido pericárdico ($R^2 = 0.449$; $P < 0.01$)

Como aspecto de gran relevancia en todos los estudios forenses, se estudió la relación entre la data de la muerte y, en este caso, los niveles de cTnThs en ambos fluidos postmortem, encontrándose una correlación entre el intervalo postmortem y los niveles de líquido pericárdico ($R^2 = 0.402$; $P < 0.01$), es decir a más data, mayores son los niveles de cTnThs, y viceversa. También se consideró la

influencia del sexo y de la edad en el momento de la muerte sobre los resultados obtenidos para la cTnThs, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas.

El siguiente punto fue estudiar los valores obtenidos de cTnThs en sangre y en líquido pericárdico en relación a las cuatro causas de muerte consideradas en nuestro estudio: Muerte súbita cardíaca isquémica (MSCi), politraumatismo, asfixia mecánica y otras muertes naturales (Tabla 14 y Figura 11).

Tabla 14. Niveles postmortem de Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnThs) en sangre y líquido pericárdico (LP) en los cuatro grupos de causa de muerte: Muerte súbita cardíaca isquémica (MSCi), politraumatismo, asfixia mecánica y otras muertes naturales.

	cTnThs ^a	
	SA	LP*
MSCi	1651±3004	32672±19110
POLITRAUMATISMO	4310±4197	37932±15538
ASFIXIA MECÁNICA	265±425	26312±19529
OTRAS MUERTES*	174±194	3407±2219

^aLos resultados se expresan como la media \pm desviación estándar y las concentraciones de cTnThs están expresadas en ng/L.*Diferencias estadísticamente significativas en los niveles de cTnThs en el grupo de otras muertes naturales, frente al resto de causas de muerte (P<0.05).

En sangre, los mayores niveles de cTnThs se encuentran en las muertes por politraumatismo (Tabla 14; media de 4310 ng/L), seguidas de las MSCi (Tabla 14; media de 1651 ng/L), siendo los valores considerablemente menores en las asfixias mecánicas (Tabla 14; media de 265 ng/L), y sobre todo en el grupo de otras muertes naturales (Tabla 14; media de 174 ng/L), sin que se hayan podido encontrar diferencias estadísticamente significativas en los niveles de cTnThs en sangre entre los diferentes grupos de causa de muerte.

En líquido pericárdico, los mayores niveles de cTnThs se hallaron también en los casos de muertes por politraumatismo (Tabla 14; media de 37932 ng/L), obteniéndose valores muy cercanos en las MSCi (Tabla 14; media de 32672 ng/L), y algo menores en los casos de asfixia mecánica (Tabla 14; media de 23312

ng/L). Los valores de cTnThs obtenidos en líquido pericárdico en el grupo de otras muertes naturales fueron muy inferiores en comparación con los otros tres grupos de causa de muerte (Tabla 14; media de 3407 ng/L), existiendo diferencias estadísticamente significativas en este sentido (Tabla 14 y Figura 11; $P < 0.05$).

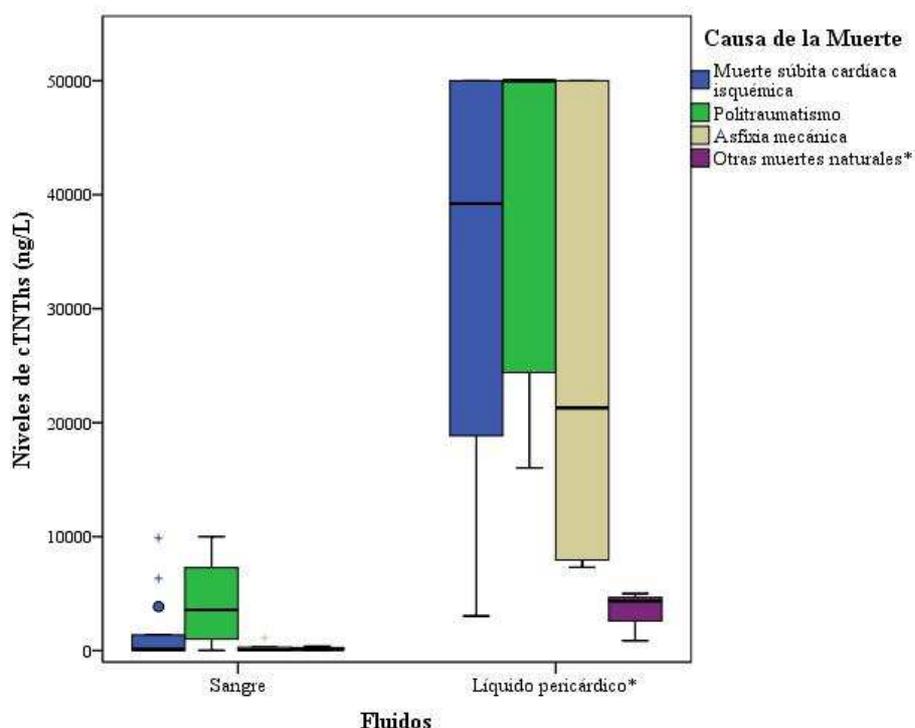


Figura 11. Niveles de Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnThs) en sangre y líquido pericárdico por grupos de causa de muerte: muertes súbitas cardíacas isquémicas, politraumatismo, asfixia mecánica, y otras muertes naturales. *Diferencias estadísticamente significativas en los niveles de cTnThs en líquido pericárdico entre el grupo de otras muertes naturales y el resto de causas de muerte ($P < 0.05$).

Posteriormente se compararon los niveles de cTnThs en sangre y líquido pericárdico, entre los subgrupos de MSCi ($n=5$) y de MSCi con IAM ($n=9$) (Tabla 15 y Figura 12). En sangre los valores de cTnThs fueron más de 2,5 veces mayores en el grupo de MSCi con IAM (Tabla 15; media de 1027 ng/L) en relación a las MSCi sin IAM manifiesto (Tabla 15; media de 2776 ng/L), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En líquido pericárdico los resultados obtenidos fueron muy similares para los dos subgrupos de causa de muerte (Tabla 15; MSCi media de 33354 ng/L; MSCi+IAM media de 31443

ng/L) sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Tabla 15. Niveles de postmortem de Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnThs) en sangre y líquido pericárdico (LP) en los dos subgrupos de causa de muerte: Muerte súbita cardíaca isquémica (MSCi) y Muerte Súbita cardíaca isquémica con IAM (MSCi+IAM)

	cTnThs ^a	
	Sangre	LP*
MSCi	1027±2049	33354±16402
MSCi+IAM	2776±4299	31443±25414

^aLos resultados se expresan como la media ± desviación estándar, y las concentraciones de cTnThs están expresadas en ng/L.

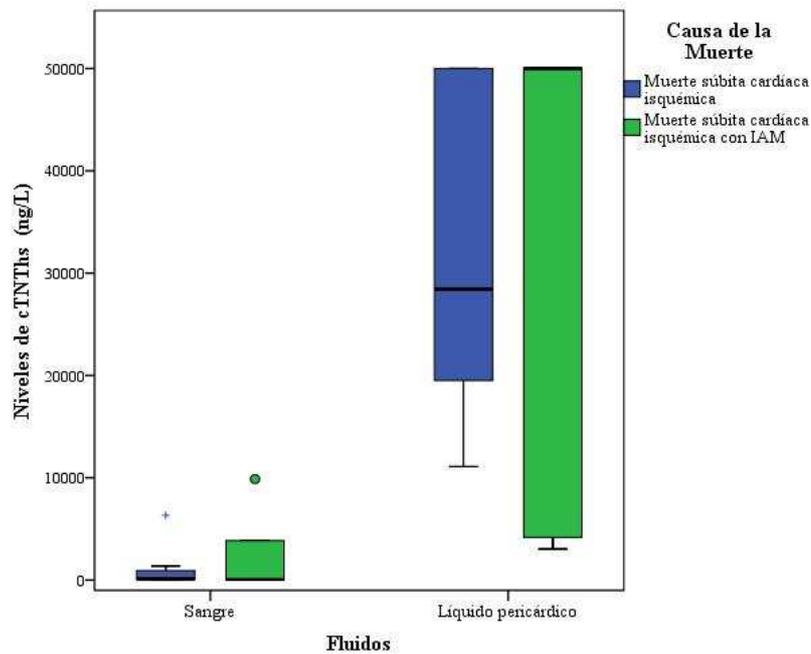


Figura 12. Niveles de Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnThs) en sangre y líquido pericárdico en los subgrupos de causa de muerte: muertes súbitas cardíacas isquémicas (MSCi) y Muerte Súbita cardíaca isquémica con IAM (MSCi+IAM).

3. Expresión génica y estudios bioquímicos: Análisis de la relación entre ellos

En este apartado se ha estudiado la relación entre los resultados obtenidos en los análisis de expresión y los resultados que se desprendieron de los estudios bioquímicos de troponina T cardíaca ultrasensible (cTnT_{hs}). Este análisis se realizó comparando los niveles de expresión de cada molécula diana (TNNT3, MYL3, MMP9, TGFB1 y VEGFA) en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico, con los valores de cTnT_{hs} en sangre y en líquido pericárdico. No se encontraron correlaciones entre los niveles de expresión de TNNT3, MYL3, MMP9 y TGFB1 y los valores de cTnT_{hs} para ningún tipo de muestra. Sí se detectó una correlación entre la expresión génica de VEGFA en líquido pericárdico y los valores de cTnT_{hs} en el mismo fluido ($R^2 = 0.393$; $P < 0.05$), de modo que a una mayor expresión de VEGFA mayor cantidad de cTnT_{hs}, y viceversa.

V. DISCUSIÓN

1. Estudios de expresión génica

En este trabajo se ha determinado por primera vez la expresión génica de varios genes en tejido miocárdico humano, sangre procedente de vena femoral y líquido pericárdico, valorando además su estabilidad postmortem. Usando PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), se ha mapeado, en diferentes zonas cardíacas y fluidos corporales, la expresión de moléculas relacionadas con el daño miocárdico de origen isquémico y la posterior reparación de este: troponina I cardíaca (TNNI3), cadena ligera de la miosina cardíaca (MYL3), metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1), y factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGFA).

1.1 Cantidad, calidad e integridad postmortem de ARNm, en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico

Cuando se realizan estudios de expresión en muestras humanas, y más aún cuando estas proceden de cadáveres, se deben tener en cuenta numerosas precauciones. Inicialmente es esencial prevenir la degradación del ARNm, para lo que es fundamental realizar una adecuada recogida, almacenaje, manipulación y procesamiento de las muestras que serán objeto de estudio, evitando siempre la presencia de cualquier cuerpo o elemento extraño que puedan afectar a la integridad del ARNm. Las diferentes muestras de un mismo tipo deben ser tomadas siempre en el cadáver en lugares análogos para evitar así posibles interferencias en relación al lugar de la toma, y se deben recoger en ausencia de signos macroscópicos de putrefacción. El almacenaje de muestras previo al análisis, debe realizarse a la temperatura mínima de -70°C . Posteriormente, durante el análisis de las muestras, tanto para la extracción del ARNm, la retrotranscripción a ADN y la PCR cuantitativa, siempre se deben mantener las superficies de trabajo libres de ARNasas, para lo que en nuestro caso empleamos un producto específico de limpieza, el *RNase Away*®. Además, como se hizo en nuestro estudio, se ha de tener un espacio de trabajo dedicado exclusivamente a la manipulación del ARNm, y sólo se han de emplear materiales y productos (tubos, puntas de pipeta, racks, agua libre de ARNasas, etc.) específicos para el análisis de ARNm [157-159]. Estas mismas precauciones debemos tenerlas cuando

analizamos la cantidad, la calidad y la integridad del ARNm. En nuestro trabajo se han tenido en cuenta todos estos detalles previamente al análisis y durante el mismo.

Tras la extracción de ARNm, el rango de rendimiento en tejido miocárdico fue de 259.2-464.2 ng de ARNm/mg de tejido (Tabla 3), obteniéndose valores similares a los que se han podido observar en otros trabajos [154], y siendo, además, estos considerados suficientes para que se puedan llevar a cabo con posterioridad estudios de expresión. En fluidos postmortem, el rendimiento obtenido en la extracción de ARNm, fue mayor en comparación con el tejido miocárdico (288-4800 ng ARNm/ml de sangre y 976-8192 ng ARNm/ml de líquido pericárdico). En este sentido debemos de tener en cuenta que no existen trabajos previos en los que se haya estudiado la expresión de genes en estos fluidos postmortem, por lo que no es posible comparar nuestros resultados con los del cualquier otro estudio.

Una vez considerado el rendimiento obtenido en la extracción de ARNm, el siguiente paso en cualquier estudio de expresión debe ser la medida de la calidad del ARNm, es decir valorar cual es el grado de contaminación de nuestras muestras; contaminación que se produce sobre todo por la permanencia, al final del proceso de extracción, de restos biológicos, básicamente de proteínas celulares y de membrana. Este paso es fundamental, ya que estos elementos que contaminan la muestra pueden interferir de manera muy significativa en la posterior amplificación del ARNm mediante qPCR. La estimación de la calidad de una muestra de ARNm se lleva a cabo midiendo en la misma la ratio de absorbancia 260/280 nm, de modo que si obtenemos valores de entre 1.9 y 2.1 podremos afirmar que se trata de una muestra de alta calidad [157, 160, 161]. En nuestro trabajo los valores de esta ratio obtenidos, tanto en muestras de tejido miocárdico como en fluidos postmortem oscilaron entre 1.8 y 2.1 (Tabla 3), resultado que nos confirma que nuestras muestras de ARNm son de una buena calidad, es decir no están contaminadas o la contaminación de estas es mínima. No encontramos correlación entre la ratio 260/280 nm y el rendimiento de ARNm obtenido en nuestras muestras, por tanto podemos afirmar que el grado de contaminación de una muestra (siempre que esta sea pequeña o mínima) no afecta a la cantidad de ARNm que podamos obtener de ella.

Por otra parte, cuando comparamos la ratio 260/280 nm obtenida en las diferentes zonas cardíacas pudimos observar que existía una correlación positiva entre ellas ($R^2=0.5-0.8$; $P < 0.01$) (Figura 2B). En este punto considerar que se ha optado por volver a reproducir algunas de las figuras que se presentaron en el apartado de resultados, con la misma numeración, en aras de una mejor comprensión.

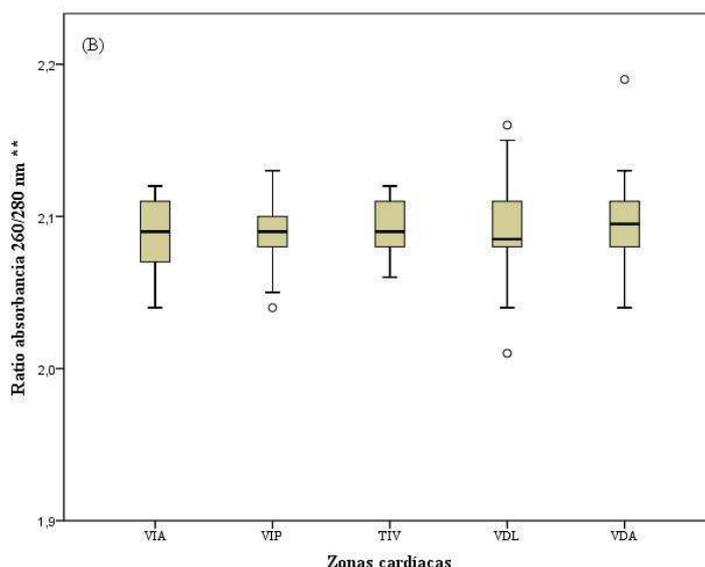


Figura 2B. Ratio de absorbancia 260/280 nm en las cinco zonas cardíacas. **Correlación en la ratio de absorbancia entre las distintas zonas cardíacas ($R^2 = 0.5-0.8$; $P < 0.01$)

En consecuencia, la existencia de un ARNm de buena calidad, en una zona cardíaca en particular, está asociada a una calidad similar de esta molécula en otras zonas cardíacas; hay por tanto, una uniformidad en la calidad de las muestras de tejido miocárdico independientemente de donde esta haya sido tomada. Este resultado es de gran interés cuando trabajamos con tejido miocárdico, ya que específicamente el aislamiento de ARNm a partir de tejido muscular del corazón, presenta importantes dificultades, sobre todo debido a la abundancia de las proteínas contráctiles, tejido conectivo, y colágeno en este tipo de tejido. Por este motivo hemos usado un kit de extracción de ARNm específico para tejido fibroso (*RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit*). Debemos saber que la presencia de estas proteínas puede interferir tanto en el aislamiento de ARNm, como es su posterior amplificación con qPCR, y por ello su eliminación es un paso fundamental durante el proceso de extracción, requiriendo este una fase de tratamiento con una

enzima tipo proteasa. Sin embargo, se debe tener cuidado para asegurar que la digestión con proteasa se lleva a cabo bajo condiciones que no conducen a la degradación del ARNm [157, 160, 161]. En el caso de que una vez finalizada la extracción de ARNm quede en la muestra una contaminación importante, expresada por un valor de ratio 260/280 nm muy bajo o muy alto, existe la posibilidad de descontaminar esa muestra, para lo que existen protocolos y kits comerciales específicos que nos permiten purificar, y por tanto recuperar una muestra muy contaminada. Destacar que aunque la ratio de absorbancias 260/280 nm proporciona una muy buena indicación de la pureza, calidad o grado de contaminación de una muestra por compuestos orgánicos, no nos indica en absoluto el grado de integridad del ARNm [163], de modo que una muestra de ARNm puede estar muy limpia, libre de contaminantes, pero el ARNm que la integra puede estar degradado, roto, fracturado, no siendo por tanto susceptible de amplificación por qPCR, ya que los resultados obtenidos carecerían de fiabilidad.

Cuando analizamos muestras humanas, y más aún en casos de muestras postmortem, se ha de ser muy cuidadoso en la interpretación cuantitativa de la expresión génica, dado que un ARNm de baja integridad puede llevar a resultados erróneos [150, 157-159, 162]. Por ello la determinación de la integridad del ARNm es un paso crucial para poder hacer un análisis de expresión génica efectivo. El grado de integridad de una muestra de ARNm se puede medir a través del cálculo de un valor de RIN (*RNA integrity number*) siendo en la actualidad este método, el recomendado para este fin [150, 158, 159, 163-166]. Este valor de RIN se obtiene de la aplicación de un algoritmo [162], mediante el cual se asigna un valor de integridad a las muestra de ARNm estudiada. El instrumento empleado para tal estimación es el *Bio-Analyzer 2100 (Agilent Technologies)*. El rango de valores de RIN que se puede asignar a una muestra oscila entre 1 y 10, significando 1 que la muestra tiene un ARNm totalmente degradado, y 10 que este está completamente integro, siendo lo recomendado el uso de muestras de ARNm con el mayor valor de RIN posible [150, 158, 159, 163-166]. En este sentido es fundamental tener en cuenta que el mínimo valor de RIN que podemos considerar para hablar de un ARNm no dañado, y por tanto susceptible de amplificación mediante qPCR, está entre 3.95 y 5, según se recoge en diferentes

trabajos [157, 163, 167]. De este modo, aunque la degradación postmortem del ARNm es un proceso complejo, la verificación de la integridad del ARNm requiere un estudio sistemático, antes de cualquier amplificación génica.

En nuestro trabajo encontramos unos valores muy similares de RIN en muestras de tejido miocárdico (7.4 ± 1.1) (Tabla 3 y Figura 2), pudiéndose observar que el valor de RIN en muestras de sangre venosa femoral y de líquido pericárdico (4.25 ± 2.04 y 5.62 ± 1.63 respectivamente) fue menor que en tejido (Tabla 3 y Figura 13).

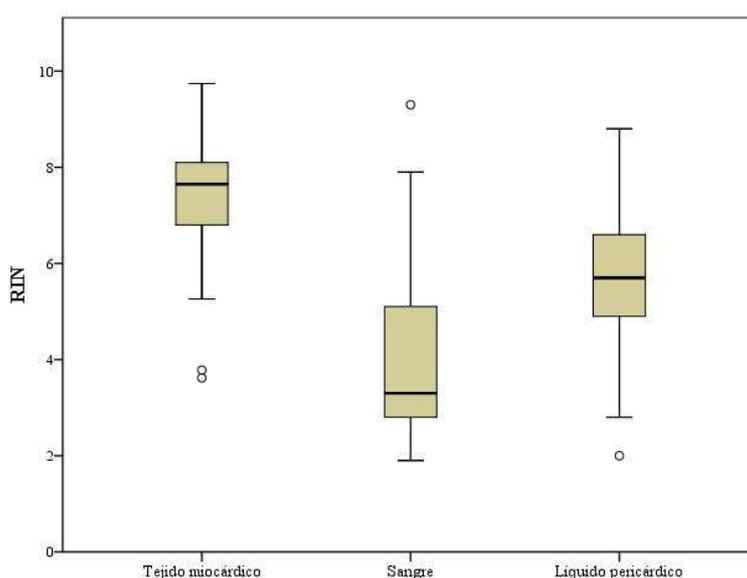


Figura 13. Valores de RIN en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico.

El resultado obtenido nos permite afirmar que el ARNm se conserva más íntegro en tejido miocárdico que en fluidos. Este hecho puede estar en relación a que, en primer lugar, la estructura fibrosa del corazón protege más a la célula haciendo de barrera con el ambiente extracardíaco [155], protegiendo a su vez al ARNm de la degradación, y en segundo lugar, en los fluidos hay una mayor exposición de las moléculas de ARNm, a nucleasas endógenas específicas y no específicas, que están libres en sangre y en líquido pericárdico. Además, otro hecho, que puede explicar estos hallazgos, es que como ya sabemos, la putrefacción se inicia antes en fluidos que en tejidos, y puede que la influencia de ribonucleasas de origen bacteriano que se liberan en la fase más precoz de la putrefacción de estos fluidos

las que también contribuyan a que encontremos un ARNm más degradado que en tejido miocárdico [144].

Junto con este hallazgo, hemos podido observar que existe una correlación en los valores de RIN entre sangre y líquido pericárdico ($R^2=0.4$; $P<0.05$) (Figura 1C y Tabla 3), de manera que podemos afirmar que este parámetro tiene un comportamiento uniforme en los fluidos, es decir unos altos valores de RIN en sangre se correlacionan con altos valores de RIN en líquido pericárdico y viceversa, por tanto son fluidos, que en lo que se refiere a la integridad/degradación del ARNm se comportan de forma similar.

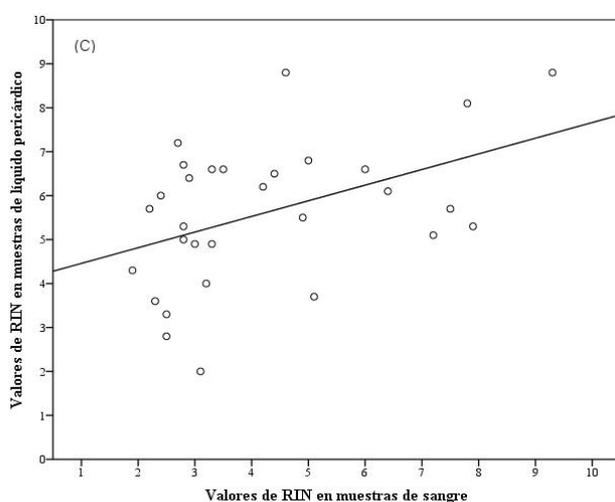


Figura 1C. Correlación entre los valores de RIN en líquido pericárdico y los valores de RIN en sangre ($R^2=0.4$; $P<0.05$).

Además se ha podido constatar que existe una correlación entre el rendimiento de ARNm de una muestra de líquido pericárdico y el valor de RIN de esta (Figura 1A y Tabla 3, $R^2=0.5$; $P<0.01$), este hecho implica que en este fluido, cuando se obtiene más cantidad de ARNm, este suele ser de mayor calidad y viceversa, es decir la cantidad se asocia a la calidad, lo que puede estar en relación a que el líquido pericárdico está localizado en un compartimento estanco que lo protege, el saco pericárdico, y esta barrera [155] permite obtener más cantidad de ARNm y menos degradado.

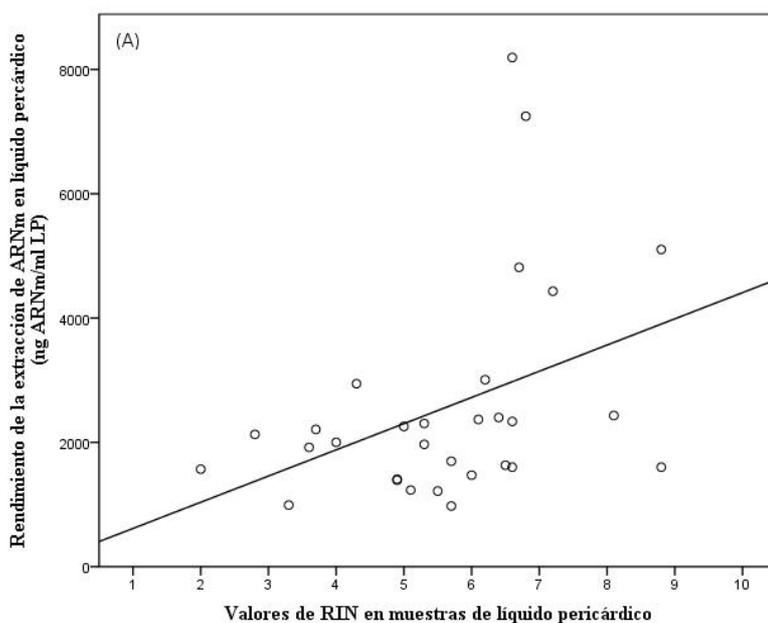


Figura 1A. Correlación entre el rendimiento de ARNm obtenido y el RIN en muestras de líquido pericárdico (LP) ($R^2=0.5$; $P<0.01$).

Al analizar la relación entre los valores de RIN de una muestra y la ratio de absorbancia 260/280 nm obtenida en la misma, no se encontraron resultados significativos para ningún tipo de muestra, salvo para sangre (Figura 1D, Tabla 3; $R^2=0.6$; $P<0.01$), este hallazgo nos indica que cuando una muestra de ARNm está menos degradada, y por tanto más íntegra, la contaminación es menor (se acerca más la ratio a 2.1). De este modo, en sangre, la contaminación se asocia a la integridad del ARNm, lo que puede estar en relación a que si hay mas contaminación, sea probablemente por que exista una mayor autólisis y putrefacción, lo que se puede asociar también a la presencia de ARNasas endógenas y de origen bacteriano.

Por otro lado cuando comparamos los valores de RIN entre las distintas zonas cardíacas (Figura 2C) y encontramos que existe una correlación entre ellas ($R^2 = 0.4-0.7$; $P < 0.01$), es decir el grado de integridad del ARNm es similar cuando estudiamos en un mismo corazón distintas zonas, de manera que unos altos

valores de RIN en una determinada zona miocárdica se asocian con una valores altos similares en las demás zonas y viceversa.

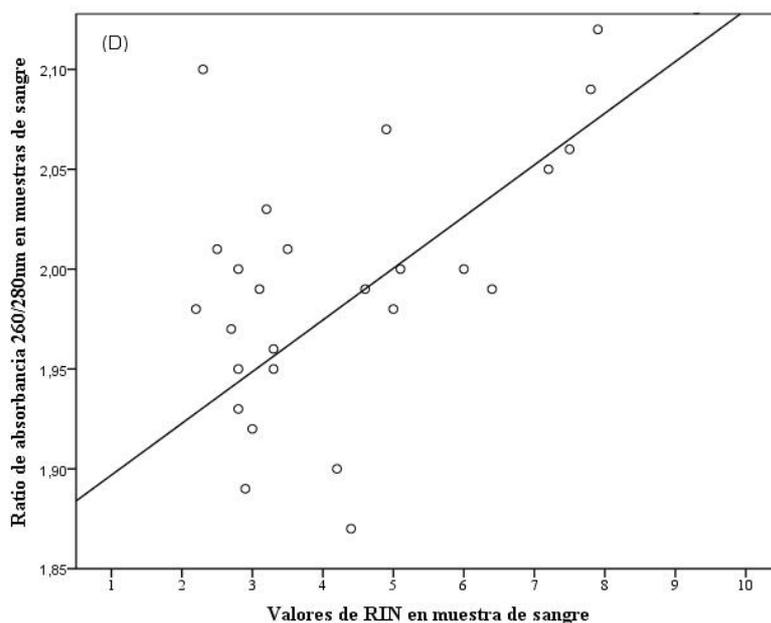


Figura 1D. Correlación entre la ratio de absorbancia 260/280 nm y los valores de RIN en muestras de sangre ($R^2=0.6$; $P<0.01$).

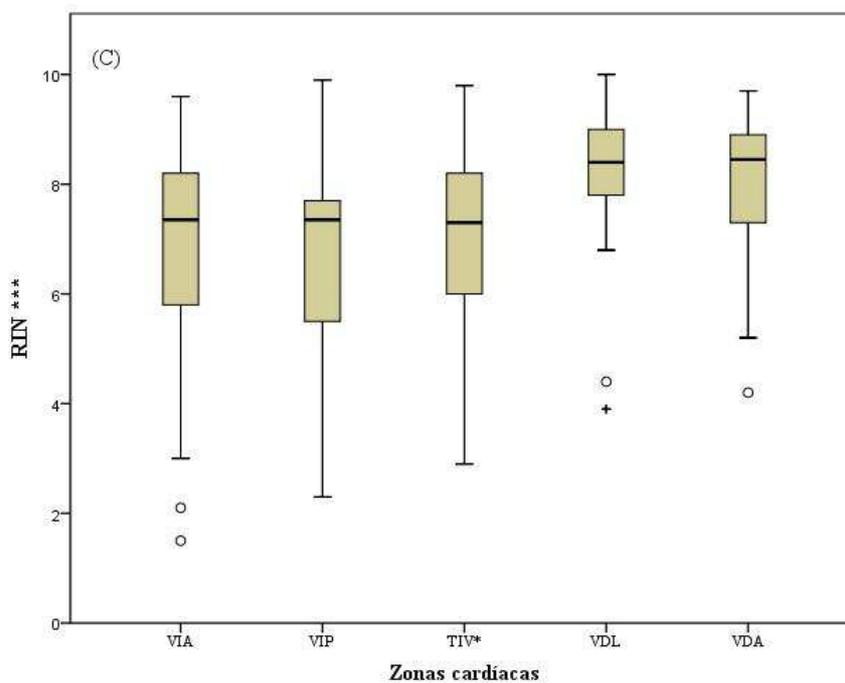


Figura 2C. Valores de RIN en las cinco zonas cardíacas. ***Correlación en los valores de RIN entre las distintas zonas cardíacas ($R^2 = 0.4-0.7$; $P < 0.01$).

Por tanto el ARNm se conserva íntegro o se degrada de forma homogénea en las distintas zonas cardíacas, existiendo una homogeneidad, en este sentido, dentro del tejido miocárdico. De igual modo no se ha demostrado que exista más degradación del ARNm en determinadas áreas miocárdicas, como en principio podríamos esperar, por ejemplo, en un individuo que tras la muerte permanece en decúbito supino, y en el que las hipostasias formadas en la pared posterior del miocardio podrían acelerar la autólisis y la putrefacción, y por tanto favorecer la degradación del ARNm, en esta localización, y en comparación con otras zonas en las que no se han producido hipostasias.

Cuando se ha analizado el RIN obtenido en las distintas zonas cardíacas en relación al rendimiento de cada muestra, solo se ha encontrado una correlación entre ambos parámetros en el tabique interventricular (Figura 14, $R^2=0.4$; $P<0.05$).

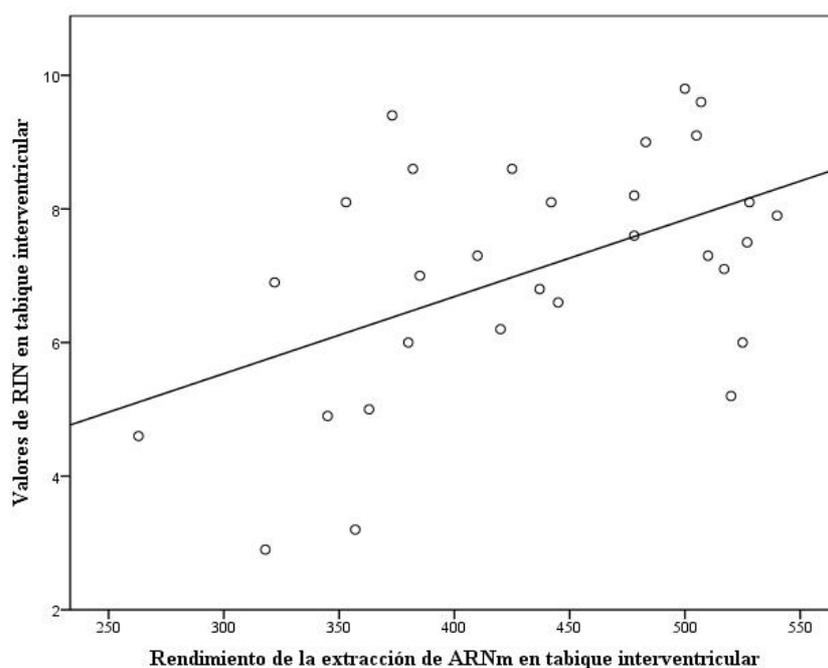


Figura 14. Correlación entre los valores de RIN y el rendimiento de la extracción de ARNm en muestras de tabique interventricular $R^2=0.4$; $P<0.05$).

Esto quiere decir que en el tabique se obtiene una mayor cantidad de ARNm de mayor integridad, y por tanto en este lugar la degradación del ARNm es menor. Este hallazgo puede estar en relación a la localización interna del tabique en el

corazón, lo que protege más de la autólisis a la célula y por tanto al ARNm, en comparación con las paredes cardíacas expuestas al espacio extracardíaco y a la cavidad pericárdica.

En nuestro trabajo, todos los resultados globales de integridad del ARNm que hemos obtenido oscilan entre moderados y altos, siendo estos además valores acordes con otros estudios [150, 154, 159], y que se puede considerar como adecuados para someter a las muestras a una posterior amplificación génica. Sin embargo, aunque el ARNm degradado puede afectar a la eficiencia de qPCR y reducir el rendimiento [157], debemos considerar, que obtener valores que representen un ARNm intacto no necesariamente nos va a garantizar obtener unos resultados fiables en la amplificación de un determinado gen por qPCR, dado que las muestras de ARNm pueden contener inhibidores que reducen la eficiencia qPCR. Y por otro lado, los patrones de expresión de genes obtenidos a partir de muestras de ARNm parcialmente degradadas, a veces pueden ser muy similares a los obtenidos a partir de muestras de ARNm intactas [157]. Además, la amplificación de un producto largo (> 400 pb) es fuertemente dependiente de ARNm de alta calidad, que requiere un valor RIN de al menos de 5, mientras que en los productos más cortos, la calidad del ARNm es menos importante. Por lo tanto, mientras que existe una relación entre la integridad del ARNm y la calidad de los datos cuantitativos de expresión que podemos obtener mediante qPCR, dependiendo del tipo de transcrito y del tejido, esta relación no será completamente directa, debido a la ya mencionada influencia de múltiples factores internos y externos tanto antemortem como postmortem, los cuales siempre deben tenerse en cuenta [152, 168, 191].

También se ha analizado la influencia de la data de la muerte tanto en el rendimiento obtenido en la extracción de ARNm, como en los resultados de la ratio de absorbancia 260/280 nm y en los valores de RIN, ya que esta información condiciona cualquier conclusión que pudiera obtenerse y es la primera condición que hay que exigir a cualquier marcador que se emplee en el diagnóstico bioquímico postmortem: que no se vea influenciado por la data y si se ve, que lo haga siguiendo una ecuación matemática, predecible, de ahí el gran interés que tiene conocer este dato en patología forense. En nuestro trabajo no hemos

encontrado correlación entre los rendimientos de la extracción de ARNm y la data de la muerte, en ninguna muestra estudiada, siendo estos resultados consistentes con la literatura [154, 191]. Esto implica que en un cadáver de mayor data, y por tanto con un mayor grado de autólisis y putrefacción, no se obtiene una menor cantidad de ARNm, como cabría esperar a priori. Esta afirmación la podríamos mantener, en nuestro caso, para datas inferiores a 24 horas.

Con respecto a la ratio 260/280 nm y la data de la muerte, hemos podido observar que, en líquido pericárdico, valores más bajos de esta ratio se correlacionan con datas más largas, lo que sugiere que en líquido pericárdico de cadáveres con datas largas el ARNm tendrá una calidad más pobre, es decir estará más contaminado (Figura 1B y Tabla 3; $R^2=-0.7$; $P<0.01$).

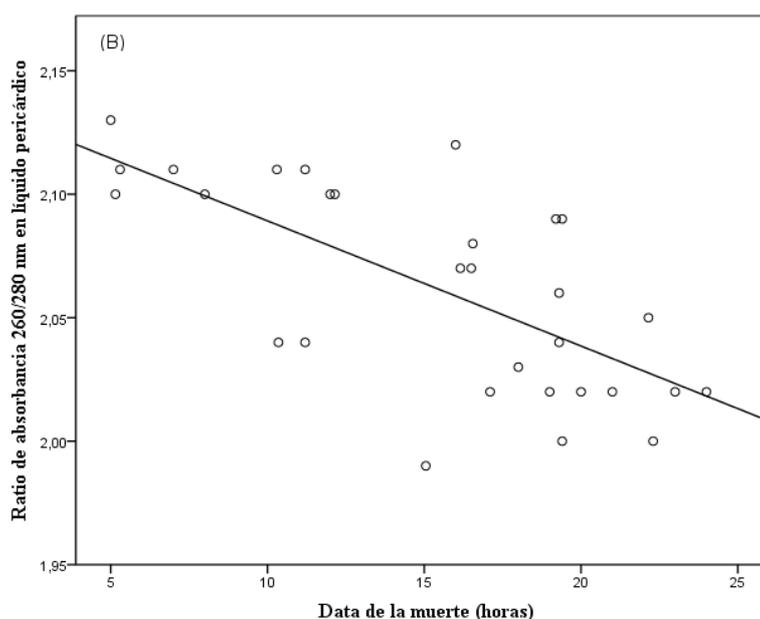


Figura 1B. Correlación entre la ratio de absorbancia 260/280 nm en líquido pericárdico y la data de la muerte ($R^2=-0.7$; $P<0.01$).

Este resultado puede estar en relación a que a mayor data mas autólisis, la cual además se produce dentro de un espacio confinado, como es el saco pericárdico, que acumula proteínas y otros productos biológicos que pueden contaminar la muestra. En tejido miocárdico y en sangre no se encontró correlación entra la ratio de absorbancia 260nm/280nm y la data, es decir la duración del intervalo

postmortem no afecta a la calidad del ARNm en muestras de tejido miocárdico y de sangre.

Por otro lado, si bien sería razonable el esperar obtener valores más bajos RIN (ARNm más degradado) en muestras procedentes de cadáveres con intervalo postmortem más largo [149, 150, 154, 159, 192], en nuestro estudio no se observó tal correlación (Tabla 3), lo que nos lleva a la conclusión de que la integridad del ARNm en muestras postmortem se conserva, al menos durante las primeras 24 horas, siendo estas moléculas aptas para estudios de expresión de genes, incluso después de un lapso de tiempo razonable tras la muerte.

Por último hemos de considerar que se ha analizado la influencia del sexo y la edad en el momento de la muerte sobre el rendimiento de ARNm obtenido de una muestra, sobre la ratio de absorbancia 260/280 nm y sobre los valores de RIN. En este sentido existen trabajos que recogen que el sexo y la edad pueden interferir tanto en la cantidad de ARNm que obtengamos en una muestra, como en la estabilidad e integridad del ARNm extraído, pudiendo, por tanto estos factores condicionar los resultados que obtengamos en la posterior qPCR. [145, 149, 150, 152, 168]. En nuestro caso no se encontró que existiera relación del rendimiento de ARNm obtenido en las muestras estudiadas con el sexo o con la edad en el momento de la muerte. Respecto a la ratio de absorbancia 260/280 nm, y a los valores de RIN obtenidos en nuestras muestras, tampoco se ha podido demostrar que estén influenciados por el sexo y la edad.

1.2 Expresión génica: Aspectos generales

1.2.1 Selección del gen endógeno o gen de referencia

Continuando con el siguiente punto de cualquier estudio de expresión molecular, y que correspondería a la realización de la qPCR, debemos antes considerar que un aspecto controvertido asociado con este tipo de estudios es la selección apropiada de los genes endógenos o de referencia, paso fundamental para una adecuada normalización y validación de resultados. Ya hemos considerado que el gen endógeno ideal sería aquel que es expresado a un nivel constante entre diferentes tejidos [147, 172, 173]. En nuestro trabajo el gen

endógeno o de referencia más estable en nuestras muestras postmortem fue seleccionado después de la aplicación de una estrategia de validación. En las zonas cardíacas y en fluidos postmortem los valores de Ct se mostraron estables para todos los genes endógenos evaluados (GAPDH, ACTB, TBP, y CYCA) (Tabla 4). En tejido miocárdico, se encontraron resultados de Ct similares a otros trabajos [154]. Cuando, en tejido miocárdico, se estimó la expresión de los diferentes genes diana (TNNI3, MYL3, MMP3 y TGFB1) empleando diferentes genes endógenos, se obtuvieron resultados similares en los niveles de expresión, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas (Figura 3). Los hallazgos fueron similares cuando se estudiaron los genes endógenos en sangre y líquido pericárdico (Figuras 4 y 5), no existiendo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes diana en función del gen de referencia empleado para hacer la cuantificación relativa de la expresión.

Por otra parte, no se encontró correlación entre la expresión relativa de los genes diana y la data de la muerte, para ninguno de los genes endógenos estudiados, lo que implica que los cuatro genes son estables y que en principio cualquiera de ellos podría ser utilizado como gen control en la cuantificación de nuestras muestras.

Como el número de genes diana estudiado en nuestro trabajo ha sido bajo (cinco genes) se consideró que sólo era necesario usar un gen endógeno, hecho avalado por distintos autores [193, 194]. Tras el estudio de validación de los cuatro genes candidatos a gen control (Figura 15), finalmente se optó por el uso de la GAPDH. La beta actina no se empleó, a pesar de mostrarse como gen muy estable en los tres tipos de muestra, debido a que en tejido miocárdico no sería un buen gen endógeno por posibles interferencias con la actina cardíaca. La TBPX se descartó desde un primer momento, ya que los valores de Ct obtenidos en muestras de tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico fueron muy altos, lo que implicaba una expresión mínima de este gen, que en muchos casos llegaba a ser nula. La CYCA, al ser estudiada como gen control se mostró como un gen estable, y muy similar a la GAPDH en tejido miocárdico, pero con una variabilidad algo más elevada, mientras que en líquido pericárdico su expresión se mostró menor en

algunas muestras, obteniéndose niveles de Ct muy altos. Finalmente, entre las cuatro opciones posibles, la GAPDH fue seleccionada como el gen endógeno de control más estable en los tres tipos de muestra, siendo por lo tanto el más adecuado para el uso en nuestras muestras.

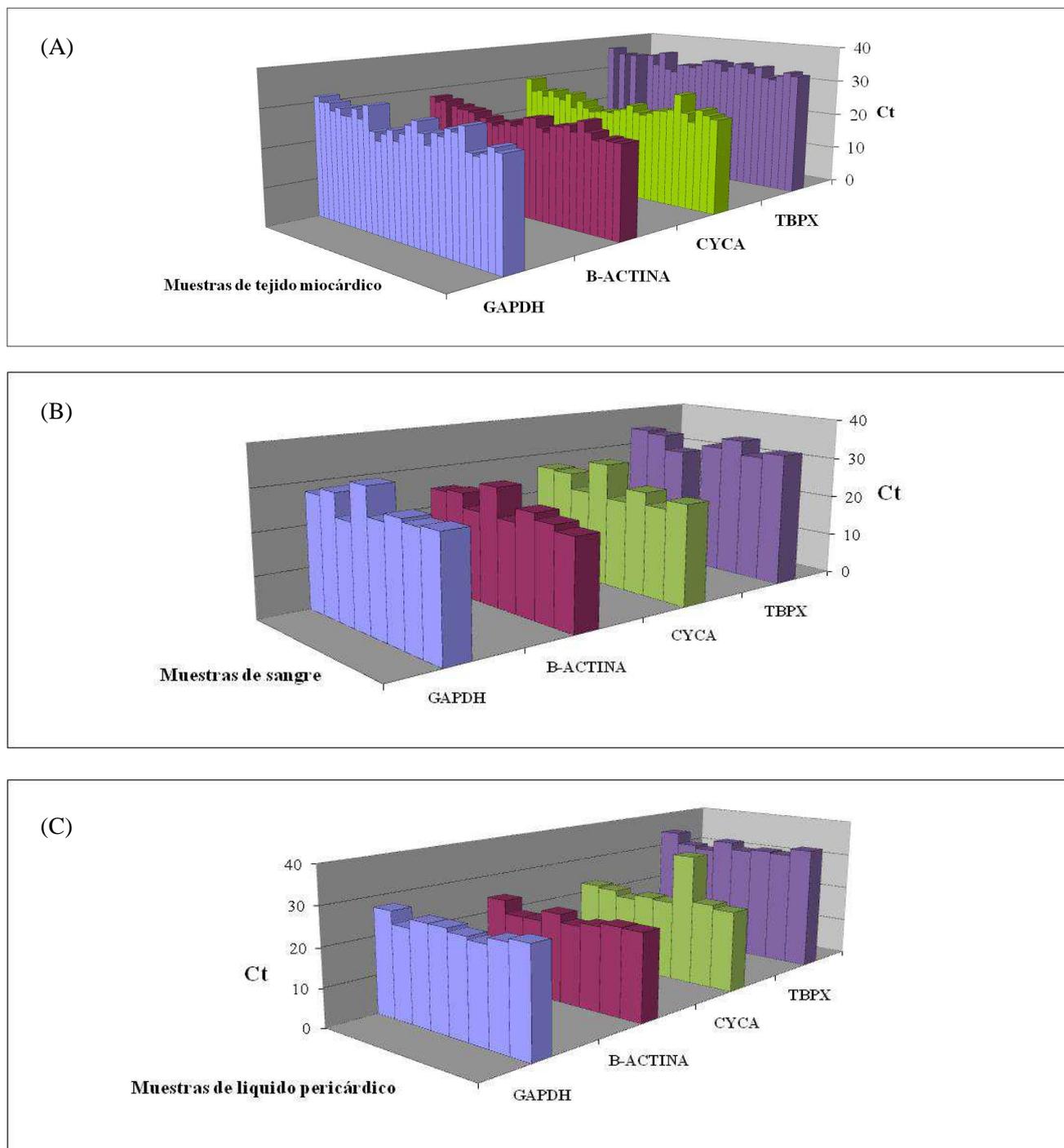


Figura 15. Comparación de valores de Ct obtenidos para los cuatro genes candidatos a gen de referencia, en muestras de tejido miocárdico (A), sangre (B) y líquido pericárdico (C).

1.2.2 Expresión génica. Influencia del rendimiento, la calidad y la integridad del ARNm. Influencia de la data de la muerte, el sexo y la edad.

Continuando con nuestro estudio, y comenzando con el análisis de expresión, en términos absolutos, considerar que los valores para los rangos de Cts del gen endógeno (GAPDH) y de todos los genes diana se consideran aceptables (Tabla 5), no apreciándose resultados extremos atribuibles a defectos de la técnica, estos resultados son además similares a los resultados publicados anteriormente para otros genes [154].

De acuerdo con la literatura anterior [150], se encontró una correlación entre los valores Ct y los valores de RIN para GAPDH, TNNI3 y MYL3, lo que indica que una alta integridad del ARNm en estas proteínas se relaciona con valores bajos Cts (Figura 6), es decir cuando el ARNm no está degradado se obtienen mayores niveles de expresión y viceversa. Por tanto, la expresión podría estar condicionada al grado de integridad del ARNm, hecho que valoraremos definitivamente cuando consideremos la expresión relativa, en relación al gen de referencia o gen endógeno. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes zonas cardíacas cuando se compararon los Cts obtenidos, por tanto en términos absolutos, no hay diferencias de expresión entre zonas cardíacas.

En lo que se refiere a la expresión relativa de los diferentes genes diana respecto a un gen de referencia (GAPDH), en primer lugar debemos considerar la influencia de la integridad del ARNm y de la data de la muerte de sobre la expresión génica.

Con el fin de establecer la relación entre los niveles de expresión de génica y la integridad del ARNm (RIN) en muestras postmortem, y tras estudiar la relación que existía con los Cts obtenidos, se realizaron estudios de correlación entre las expresiones de los diferentes genes diana y el RIN (Tabla 6, muestra los valores para los fluidos corporales). En este sentido no se encontró correlación para ningún tipo de muestra, demostrando este resultado que la expresión génica de estos genes diana no está condicionada y relacionada con la integridad del ARNm, tal como se publicó anteriormente [154].

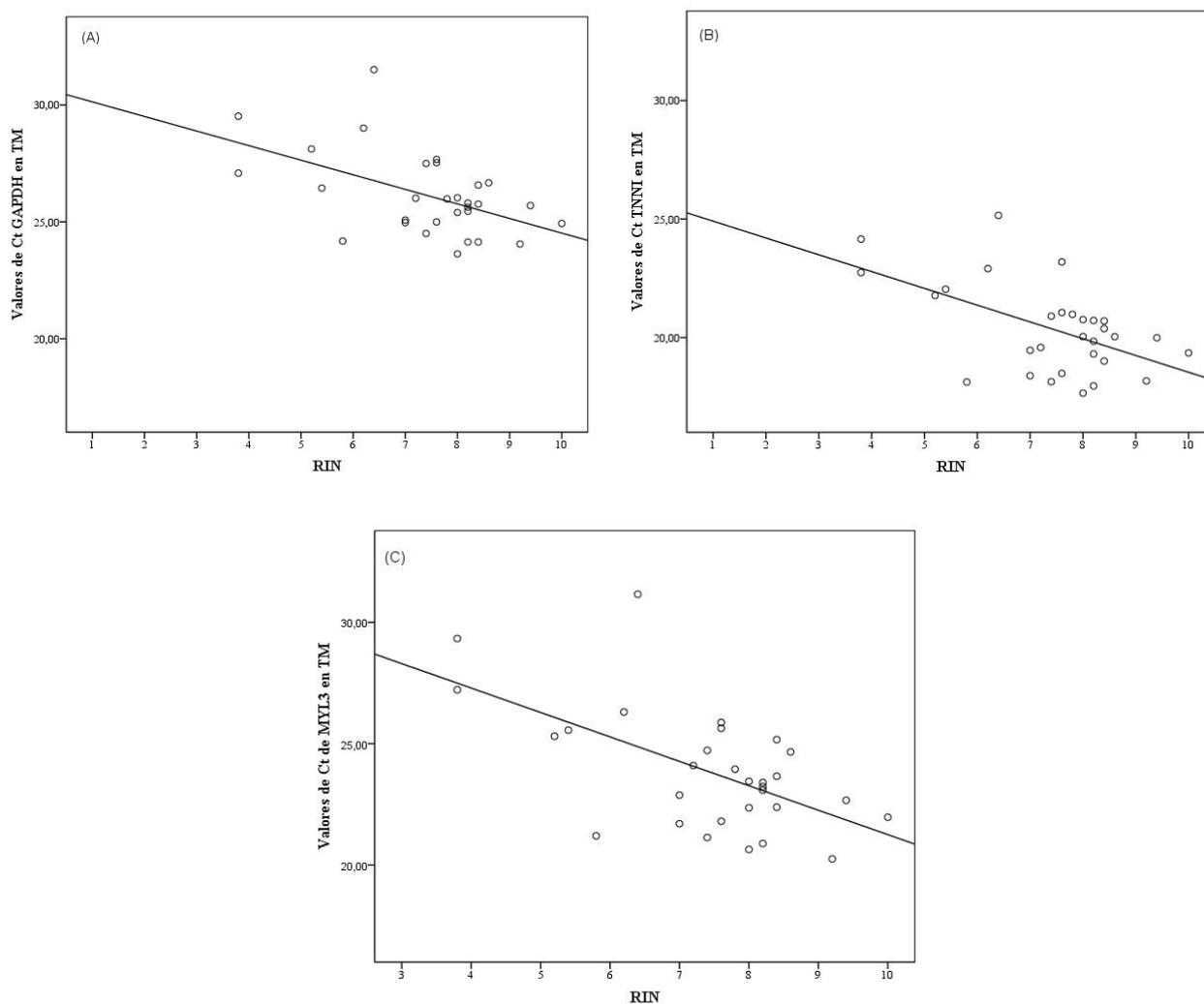


Figura 6. Valores de RIN y valores de Ct obtenidos para GAPDH (A), TNNI3 (B), MYL3 (C) en tejido miocárdico. *Correlación entre los valores de Ct de GAPDH y los valores de RIN ($R^2 = 0.5$; $P < 0.05$) (A). **Correlación entre los valores de Ct de TNNI3 Ct values y los valores de RIN ($R^2 = 0.5$; $P < 0.05$) (B). ***Correlación entre los valores de Ct de MYL3 y los valores de RIN ($R^2 = 0.5$; $P < 0.05$) (C)

Por tanto la correlación entre los valores Ct y los valores de RIN que se encontró para la GAPDH, TNNI3 y MYL3, desaparece en el momento que relativizamos la expresión respecto a un gen endógeno. Estos resultados, además, demuestran que los altos niveles de expresión génica encontrados en los fluidos corporales postmortem no están en relación con la calidad de la muestra de ARNm. De este modo podemos afirmar que los niveles de expresión de los diferentes genes diana estudiados, no están condicionados al grado de integridad del ARNm, pudiendo encontrar en ocasiones niveles de expresión adecuados con muestras de ARNm

algo degradadas, y peores niveles de expresión con muestras íntegras, lo que nos indica que esa diferencia en la expresión no depende de la integridad del ARNm, si no de la muestra en sí y de la cantidad real de ARNm que esta tiene.

Otro aspecto de gran importancia médico-legal es valorar si la expresión de las moléculas diana consideradas se ve afectada por la data de la muerte, teniendo en cuenta que los procesos biológicos de síntesis de ARNm cesan una vez que un individuo fallece, y que por tanto los cambios que se puedan producir con el avance del intervalo postmortem en la cantidad de ARNm de una determinada molécula estarán asociados a la autólisis y la putrefacción. En este sentido inicialmente se llevaron a cabo estudios de correlación entre la data y los niveles de expresión relativa obtenidos para cada molécula, encontrándose la existencia de una correlación negativa entre estas variables para las dos proteínas estructurales, la TNNI3 y la MYL3 en tejido miocárdico. Estos resultados implican que a una mayor data obtendremos una menor expresión y viceversa, hecho que podría condicionar los resultados de expresión obtenidos al intervalo postmortem, todo esto a pesar de que se ha demostrado una supervivencia a largo plazo del ARNm [155]. Cuando estos resultados se analizaron por zonas cardíacas (Tabla 7) se pudo observar que la correlación data-expresión relativa existía, para la TNNI3, en muestras de ventrículo derecho (lateral: $R^2 = -0.504$, $P < 0.01$; anterior: $R^2 = -0.365$, $P < 0.05$), y para el MYL3 en todas las aéreas miocárdicas (R^2 entre -0.527 y -0.728 ; $P < 0.01$), es decir la data afecta negativamente a la expresión de TNNI3 en ventrículo derecho y a la expresión del MYL3 en todas las zonas cardíacas. De estos resultados el hecho más llamativo que cabe destacar es que de todas las moléculas estudiadas, solo se ve afectada la expresión de aquellas que son estructurales del corazón, de manera que el intervalo postmortem, y por tanto la autólisis y la putrefacción, parecen tener una mayor influencia sobre los elementos estructurales cardíacos que sobre moléculas implicadas en la inflamación y la angiogénesis. Destacar que no se encontró que la data influenciara la expresión de ningún tipo de molécula en muestras de sangre y de líquido pericárdico.

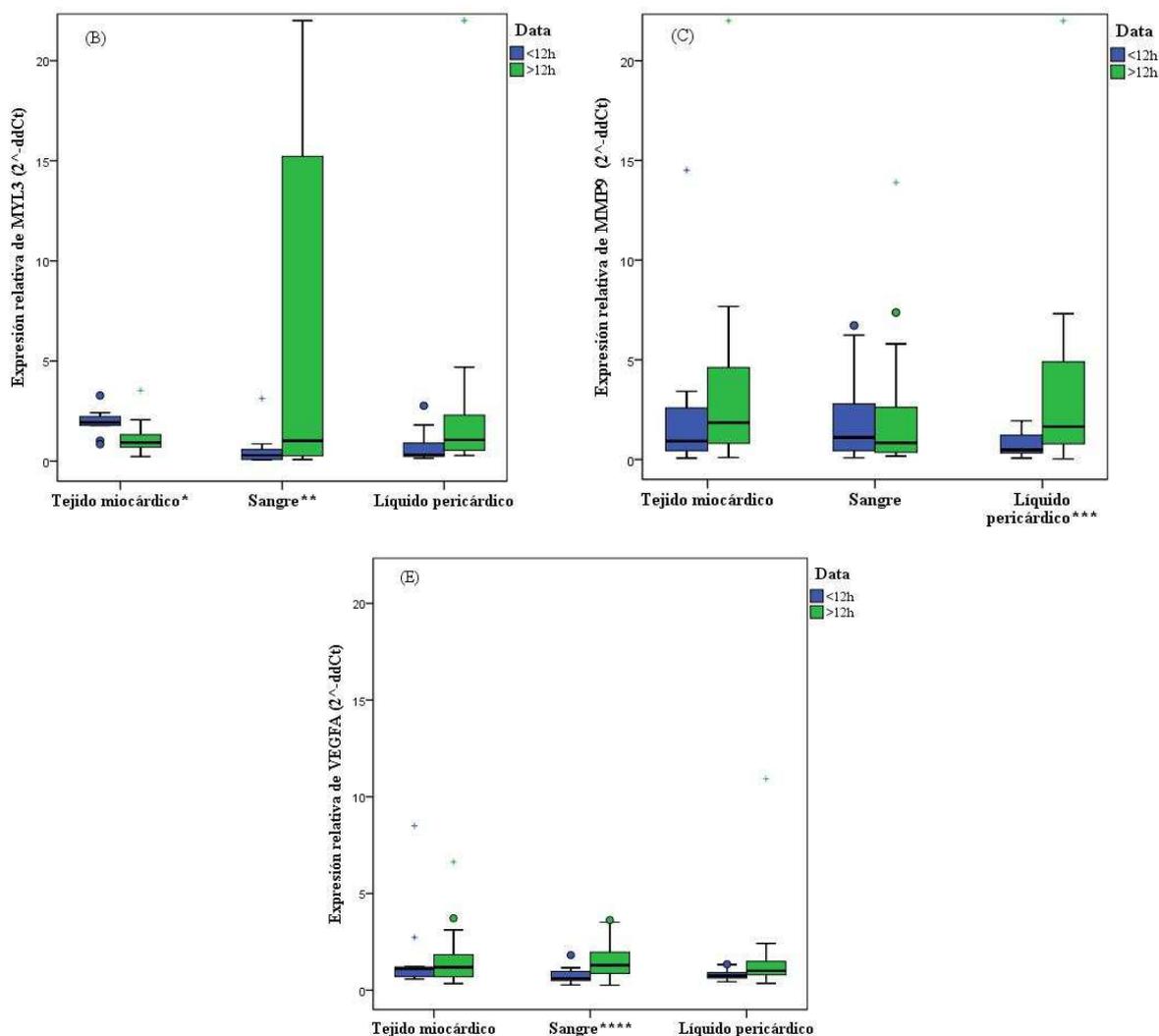


Figura 7B, 7C y 7E. Expresión relativa de MYL3 (B), MMP9 (C), y VEGFA (E) (2^{-ddCt}) en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico en casos con data de menos de 12 horas o mayor de 12 horas. *Diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de MYL3 en tejido miocárdico y en **sangre ($P < 0.05$) (B). *** Diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de MMP9 en líquido pericárdico ($P < 0.05$) (C). **** Diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de VEGFA en sangre ($P < 0.01$) (E).

También se estudio la influencia de la data sobre la expresión haciendo dos grupos de data de muerte: menor o igual a 12 horas y mayor de 12 horas. Cuando se comparó la expresión génica de muestras procedentes de cadáveres con una data de menos de 12 horas con otras de más de 12 horas de data (Figura 8) no se encontraron diferencias significativas para la TNNI3 y para el TGFB1 en ningún tipo de muestra. En sangre, se observó que la expresión génica de MYL3 y de

VEGFA fue mayor para datas más largas, corriendo lo mismo para la expresión de MMP9, pero en este caso en líquido pericárdico.

Estos resultados demuestran que la expresión de algunas moléculas en los fluidos postmortem puede verse afectada por la data de la muerte, siendo llamativo el hecho de que a mayores datas la expresión sea también mayor, tendencia que se observa para casi todas las moléculas, y que puede estar en relación a que cuanto mayor es el intervalo postmortem más autolisis existe, por lo que se libera más ARNm al medio, hecho que puede traducirse en un aumento de las copias de ARNm y por tanto en más expresión detectada. En otros trabajos también se han encontrado relación entre la expresión y la data de la muerte, por ejemplo en el caso del VEGFA [107, 175, 176].

Por todos estos resultados, se debe prestar especial atención al utilizar la expresión de estas proteínas tanto en tejido miocárdico como fluidos postmortem, para diagnosticar la causa de la muerte en los casos de patología forense.

Como en algunos trabajos se ha establecido que el sexo y la edad en el momento de la muerte, pueden influenciar los resultados que obtengamos tras la amplificación con qPCR, ya que se afirma que estos factores pueden interferir en la cantidad de ARNm que obtengamos en una muestra (rendimiento de la extracción), y en la estabilidad e integridad del ARNm extraído (RIN) de la misma [145, 149, 150, 152, 168], en nuestro trabajo también consideró esta posibilidad. En relación al sexo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión entre hombres y mujeres, por tanto en nuestros casos no existe una expresión diferencial, aunque es verdad que el número de mujeres es muy reducido (5 mujeres de un total de 30 individuos), por lo que este resultado debe ser interpretado con precaución. Respecto a la edad en el momento de la muerte y su influencia en la expresión génica de nuestras moléculas no se encontró correlación entre ellas, ni se hallaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó la expresión entre tres grupos de edad (<45 años, 45-65 años y > de 45 años). Por tanto el sexo y la edad no han condicionado los resultados obtenidos en el estudio de expresión realizado sobre

genes diana, tanto sobre muestras de tejido miocárdico, como de sangre, o de líquido pericárdico, lo que se corresponde con los resultados obtenidos por otros autores [107, 176].

En resumen, el ARNm extraído de todas las muestras mostró una buena integridad, permaneciendo estable hasta 24 horas después de la muerte, siendo este susceptible de ser empleado para llevar a cabo todos los análisis posteriores.

1.2.3 Expresión génica. Comparación de resultados entre muestras de tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico.

Para aportar una mayor información sobre la expresión de las diferentes moléculas diana se analizó, en un primer lugar, la expresión relativa de estas comparando los distintos tipos de muestra empleados (tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico), y en un segundo lugar se estudió la expresión comparando entre si las diferentes zonas cardíacas. En este sentido debemos de tener en cuenta que existen muy pocos trabajos previos en los que se haya estudiado la expresión de alguno de estos genes en tejido miocárdico [107, 175], estando la mayoría dedicados solamente a algunas moléculas de angiogénesis (VEGFA y HIF-1 α) y sobre muestras *in vivo* [112, 174, 179, 180]; por todo ello será difícil comparar los resultados obtenidos en nuestro caso. Además, aparte de las primeras investigaciones realizadas por Lachica *et al.* [139] y Ramos *et al.* [88], existe poca información disponible sobre el metabolismo del músculo cardíaco en diferentes regiones cardíacas en sujetos humanos postmortem. Nuestro trabajo pretende proporcionar una nueva e importante contribución en este campo, especialmente con respecto a la función del metabolismo molecular en el tejido cardíaco humano. El músculo cardíaco, para un buen funcionamiento, precisa de una suficiente y adecuada vascularización para soportar los cambios en la demanda metabólica fisiológica de este órgano, principalmente a través de aumentos y disminuciones en el flujo sanguíneo coronario [195]. De todos los vasos coronarios, las lesiones ateromatosas más importantes se encuentran con mayor frecuencia en la arteria descendente anterior [11, 196], lo que conduce a un irregular suministro de sangre al miocardio. El conocimiento del nivel de expresión génica de proteínas estructurales del corazón, y de moléculas

relacionadas con la inflamación y la angiogénesis en el miocardio es de gran importancia para tener un mayor y mejor conocimiento del metabolismo cardíaco, en diferentes zonas cardíacas, y en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas, tales como la hipoxia o la isquemia.

En este punto, se encontró que en tejido miocárdico existe una correlación entre la expresión relativa de las moléculas de inflamación y angiogénesis: MMP9, TGFB1 y VEGF) (R^2 : 0.522-0.621; $P < 0.05$) (figura 8A). Es decir, en tejido, estas se comportan de manera homogénea en lo que se refiere a su expresión, pudiendo decir que tienen una expresión conjunta dentro de una compleja respuesta destinada a la puesta en marcha de fenómenos de reparación y de formación de neovasos en el tejido miocárdico, respuesta que, por tanto puede proceder de un mismo sistema de regulación.

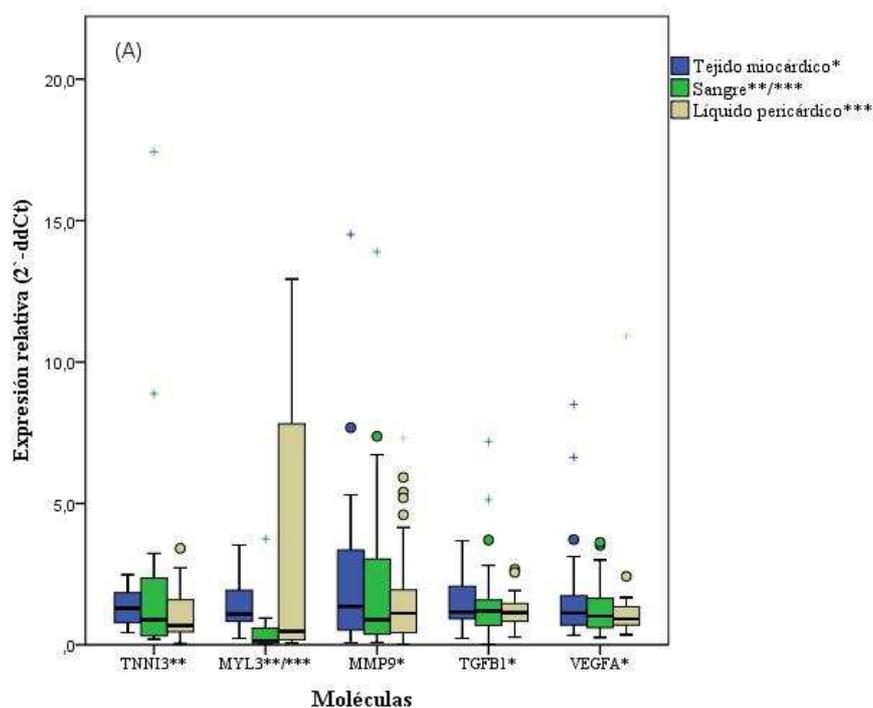


Figura 8A. Expresión relativa de TNNI3, MYL3, MMP9, TGFB1, y VEGFA (2^{-ddCt}) en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico. *Correlación entre la expresión relativa de MMP9, TGFB1 y VEGF (R^2 : 0.522-0.621; $P < 0.05$). ** Correlación en sangre entre la expresión relativa de TNNI3 y MYL3 ($R^2 = 0.429$; $P < 0.05$). *** Correlación entre la expresión relativa de MYL3 en sangre y en líquido pericárdico ($R^2 = 0.383$; $P < 0.05$).

También se pudo observar la existencia de una correlación, entre la expresión de TNNI3 y MYL3 en muestras de sangre ($R^2 = 0.429$; $P < 0.05$) (Figura 8A), de modo que en este fluido podemos afirmar que las proteínas estructurales del corazón se expresan con un comportamiento similar. Por otro lado también observamos la existencia de una correlación en la expresión de MYL3 entre sangre y líquido pericárdico ($R^2 = 0.383$; $P < 0.05$) (Figura 8A), de modo que la expresión de esta proteína estructural es similar en ambos fluidos, aunque sus niveles de expresión son mayores en líquido pericárdico que en sangre, lo que puede ser consecuencia de una mayor liberación de ARNm al líquido pericárdico por la autólisis.

A continuación se compararon los niveles de expresión de las moléculas diana entre las cinco zonas cardíacas seleccionadas: la pared anterior y posterior del ventrículo izquierdo, el tabique interventricular, y la pared anterior y lateral del ventrículo derecho.

En este sentido no se encontraron variaciones en los niveles de expresión, de los diferentes genes diana estudiados, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la expresión molecular entre las distintas zonas cardíacas, aunque sí existía una fuerte correlación entre ellas, en lo que se refiere a la expresión de todas las moléculas estudiadas (Figura 8B).

Por tanto, se ha observado una expresión homogénea de TNNI3, MYL3, MMP9, TGFB1, y VEGFA en todas las zonas cardíacas estudiadas. Por ello podemos afirmar que en nuestros casos, estas proteínas no se expresan más en unas áreas del corazón que en otras. Estos resultados contrastan por ejemplo con los obtenidos por otros autores en relación a la expresión de VEGFA, la cual fue mayor en ventrículo izquierdo que en el derecho, independientemente de la causa de la muerte [107], lo que atribuyen a una diferente intensidad de las lesiones causadas por la hipoxia o la isquemia durante la muerte.

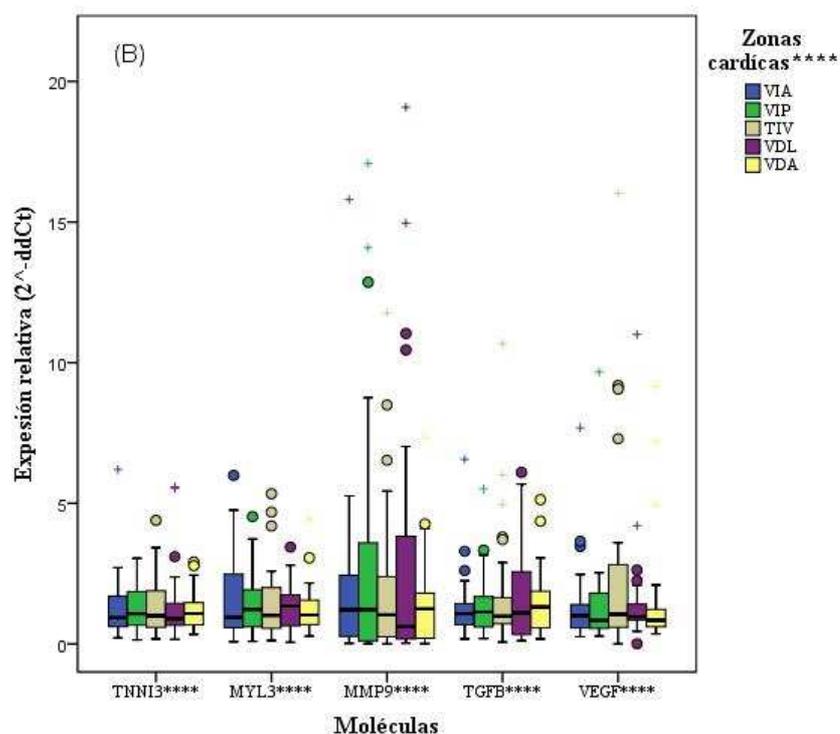


Figura 8B. Expresión relativa de TNNI3, MYL3, MMP9, TGFB1, y VEGFA (2^{-ddCt}) en las diferentes zonas cardíacas. **** Correlación entre las diferentes zonas cardíacas para la expresión relativa de todas las moléculas estudiadas (Valores en Tabla 8; $P < 0.05$).

Aunque no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas, si podemos observar que los valores más altos de expresión para MMP9 se encontraron en las muestras procedentes de la pared posterior del ventrículo izquierdo, y de la pared lateral del ventrículo derecho (Figura 8B). Estos interesantes resultados sugieren la presencia de mecanismos de remodelado en estas zonas, que pudieran tener una relación con eventos patológicos subyacentes, como la hipoxia o isquemia a estos niveles, lo que merece una mayor investigación en este sentido. Ya que esta información puede proporcionar, a los patólogos forenses, nuevos datos de interés en la búsqueda de marcadores moleculares en el diagnóstico postmortem de la isquemia miocárdica.

1.3 Expresión génica y causas de muerte

Con mucha frecuencia el establecimiento de la causa de la muerte es un problema difícil de resolver en la práctica forense, especialmente en los casos de MS, los cuales, como ya sabemos, en la mayoría de los casos están relacionados con enfermedad cardíaca [2, 5, 12-14, 18, 25], y sobre todo con la enfermedad isquémica del corazón [2, 5, 6, 8, 15, 17, 18, 26, 28, 29, 32]. El diagnóstico postmortem de lesiones isquémicas en el corazón es también un problema importante en la medicina forense porque los cambios típicos en el tejido miocárdico para el diagnóstico del IAM, tanto a nivel macroscópico como microscópico requieren un cierto tiempo de supervivencia del individuo, siendo el mínimo unas 5-6 horas [23, 26, 88-90, 90-96]. Por lo tanto son necesarios métodos de diagnóstico que permitan reconocer el IAM precozmente e inmediatamente después de la muerte. En este sentido ha habido muchos intentos desde diferentes perspectivas para encontrar marcadores fiables de daño isquémico miocárdico precoz, empleándose un gran número de métodos tanto morfológicos, como histoquímicos, inmunohistoquímicos, y bioquímicos [23, 78, 88, 94, 119, 124-126, 129, 131-134, 197, 198]. A pesar de todo ello en el momento actual podemos afirmar que no existe el método ideal para el diagnóstico de la lesión isquémica precoz, siendo lo recomendado, en los casos de MSC que se sospeche un IAM de corta evolución, el empleo combinado de técnicas convencionales (macroscópicas y microscópicas), junto con inmunohistoquímicas y bioquímicas, correlacionando siempre los resultados con los datos de autopsia, datos clínicos y el resto de información, y con todos los demás exámenes de que se disponga. En la mayoría de casos ningún estudio por si solo nos podrá ofrecer una información definitiva, para el diagnóstico de la lesión isquémica precoz, siendo el objetivo final la adquisición de suficiente información, de cualquier naturaleza, para poder así reconstruir lo más fielmente posible los hechos [90, 91, 94, 104-106].

Los estudios de expresión de genes en diferentes zonas cardíacas y fluidos humanos se están convirtiendo en un área de investigación necesaria para poder tener una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes a la isquemia miocárdica y su reparación. En este sentido, en la actualidad, está naciendo un

nuevo grupo de métodos diagnósticos dirigidos también el diagnóstico de la lesión isquémica precoz en casos de MSC, basados en el estudio de los cambios que se producen en el pool de ARNm de una determinada molécula de acuerdo a las necesidades fisiológicas de una célula, tejido u órgano, el cual puede variar con ciertas patologías, y de acuerdo a la causas de la muerte[144, 145]. Mediante esta metodología podremos determinar la expresión génica de moléculas relacionadas con la fisiopatología de la isquemia/necrosis miocárdica, pudiendo acercarnos al diagnóstico postmortem de esta patología. Este tipo de marcadores son un nuevo campo de gran interés para el diagnóstico de sufrimiento isquémico miocárdico, pudiendo ser útiles incluso antes de que puedan ser detectados los cambios estructurales y bioquímicos previamente reseñados, ya que, teóricamente, la respuesta molecular al daño isquémico es una respuesta inmediata, y por ello, aunque la MSC ocurra de repente, muriendo en muy poco tiempo desde el inicio de los síntomas, podemos encontrarnos cambios en los niveles de expresión de los diferentes tipos de moléculas.

Estos novedosos métodos se encuentran en pleno proceso de desarrollo y valoración, de modo que en la actualidad existen muy pocos trabajos en los que se haya estudiado la expresión de moléculas relacionadas con la fisiopatología de la isquemia/necrosis miocárdica, con la finalidad de establecer la causa de la muerte [107, 112, 174, 175, 176, 179, 180], y todos ellos se enfocan en el estudio de la expresión de VEGF y otras moléculas de angiogénesis [107, 112, 174, 175, 176, 179, 180], o en la expresión de TGFB1 o TNF α [178-180]. Estos análisis moleculares, en relación a la causa de la muerte, sólo se llevan a cabo en muestras forenses de tejido miocárdico en dos trabajos [107, 175], no existiendo valoración con esta finalidad en fluidos postmortem. El resto de estudios se realizan a partir de muestras tomadas de individuos vivos (sanos y enfermos), consintiendo estas en una pequeña muestra de orejuela derecha, tomada durante una cirugía cardíaca [112, 174] o bien en muestras de sangre [179, 180]. De esta información se desprende que este es un campo de investigación aún completamente novedoso.

Por todo lo anteriormente expuesto, en nuestro trabajo hemos analizado las expresiones relativas de moléculas diana relacionadas con la fisiopatología de la

isquemia/necrosis miocárdica, y sus posibles cambios en relación a la causa de la muerte.

La troponina I cardíaca (TNNI3) es una isoforma específica del tejido miocárdico, y se expresa en corazones humanos adultos normales [181], y la hemos seleccionado para ser estudiada, porque la determinación de los niveles de esta proteína en sangre se utilizan en la práctica clínica diaria para el diagnóstico del IAM. La MYL3 es la isoforma músculo ventricular y embrionaria de la cadena ligera de la miosina, y se considera una proteína estructural muy importante en el músculo cardíaco [183, 184, 187]. Estas dos proteínas estructurales del corazón pueden modificar sus expresiones, en el tejido del miocardio y fluidos corporales, en relación a una enfermedad cardíaca isquémica. Después de un proceso de isquemia miocárdica se pone en marcha una respuesta inflamatoria, con la finalidad de modular la adaptación del tejido al daño y la reparación del mismo [55]. Durante esta respuesta se liberan numerosas citocinas inflamatorias, tales como factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1), cuya producción se induce rápidamente en el miocardio infartado, teniendo efectos moduladores importantes de la respuesta inflamatoria. El TGFB1 se piensa es un vasoprotector, por tratarse de una citocina estabilizadora de placas de modo que la falta de su acción contribuye a la desestabilización de la placa aterosclerótica [60, 180]. Sus potentes efectos son capaces de jugar un papel central en la curación del infarto, la reparación cardíaca y el remodelado ventricular izquierdo, oponiéndose a la respuesta celular. De este modo la señalización TGFB1 puede ser crucial para la represión de la síntesis de genes inflamatorios en los infartos mediando la resolución del infiltrado inflamatorio [60, 62, 180]. Por todos estos motivos hemos considerado que el TGFB1 es una molécula de gran interés para ser estudiada en nuestro trabajo. El MMP9 tiene un papel muy importante en la remodelación de la matriz extracelular después de un IAM , contribuyendo a la remodelación del ventrículo izquierdo mediante la alteración de la membrana basal, hecho que es muy importante en la regulación del tráfico molecular alrededor de los miocardiocitos, la permeabilidad vascular y la hidratación del ventrículo izquierdo [58]. La MMP9 también tiene un papel importante en la remodelación del ventrículo izquierdo después de un infarto de miocardio [58, 188, 199], y por ello es una molécula de gran interés en nuestro estudio, y en

concreto en la búsqueda de la causa de la muerte en casos de MSC isquémica. Por otro lado, la hipoxia es un potente regulador de una gran variedad de procesos biológicos, incluyendo la angiogénesis [112]. La formación de nuevos vasos sanguíneos es un paso esencial después de una lesión isquémica miocárdica, ante la cual se produce una muy rápida liberación de factores angiogénicos en las áreas lesionadas. El VEGFA es un factor angiogénico inducido rápidamente en el miocardio isquémico [53], siendo esta la razón por la que se ha elegido esta molécula para ser valorada en el diagnóstico postmortem del IAM. Además de permitirnos el acercarnos al establecimiento de la causa de la muerte; conocer los patrones temporales y espaciales de la expresión de estas moléculas inflamatorias y de angiogénesis nos podrá ayudar a identificar los marcadores moleculares precoces de la respuesta del miocardio a la isquemia cardiaca.

En nuestro trabajo, con la finalidad de analizar la expresión génica de TNNI3, MYL3, MMP9, TGFB1 y VEGFA en relación a la causa de la muerte de los individuos que integraban nuestra muestra, dividimos la población de estudio en cuatro grupos: muertes súbitas cardíacas isquémicas, muertes por politraumatismo, muertes por asfixia mecánica y otras muertes naturales. Esta clasificación se realizó tras la realización de una autopsia completa, complementada con estudios toxicológicos e histopatológicos para cada individuo. Dentro del grupo de MSC de origen isquémico se incluyeron los casos en los que existía un diagnóstico anatomopatológico de IAM, y a aquellos individuos en los que una vez descartadas otras causas de muerte, sólo se hallaron datos indicativos de cardiopatía isquémica crónica (estenosis coronaria significativa en al menos una rama principal, y/o signos anatomopatológicos inespecíficos de isquemia, y/o infarto de miocardio antiguo, y/o presencia de trombo coronario oclusivo). En estos casos que clasificamos como MSC isquémica, en los que no podemos demostrar el IAM, casi con total probabilidad la muerte es consecuencia de una arritmia tipo fibrilación ventricular, que tiene su origen en un sustrato arritmogénico de tipo isquémico [5, 11, 14, 15, 28] o en un sustrato cicatricial/fibrótico [5, 14, 15, 29, 30], estando este tipo de sustrato detrás de aproximadamente el 50% de las MSC de origen isquémico. El problema en estos casos es que la arritmia es un fenómeno que no podemos demostrar en la

autopsia, y que, desgraciadamente para el patólogo forense, es la causa inmediata de más del 90% de las MSC de origen isquémico [5, 12, 14-17, 29].

Cuando analizamos la expresión de los diferentes genes diana en los diferentes tipos de muestra considerados, y para los cuatro grupos de causa de muerte, se obtuvieron una serie de resultados que es necesario discutir por ser uno de los objetivos del trabajo (Tabla 9 y Figura 9).

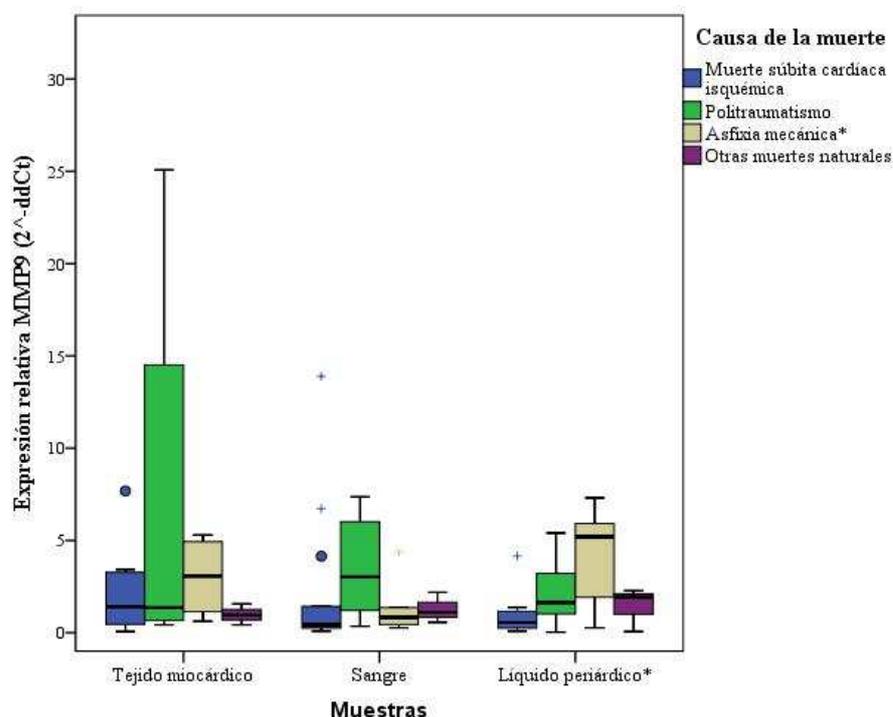


Figura 9. Expresión relativa de MMP9 en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico, por grupos de causa de muerte: muertes súbitas cardíacas isquémicas, politraumatismo, asfixia mecánica, y otras muertes naturales. *Diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa de MMP9 en líquido pericárdico para las muertes por asfixia mecánica ($P < 0.05$)

En relación a la expresión de TNNI3 hemos encontrado que su expresión en sangre, en las muertes por asfixia mecánica, es mayor que en el resto de las causas de muerte (15.12, frente a 4.06 en las MSCi, 0.42 en los politraumatismos, y 1.21 en las otras muertes naturales) lo que sólo podría estar en relación con el componente hipóxico-isquémico que tienen este tipo de muertes, el cual podría

condicionar una lisis del miocardiocito con liberación del ARNm que codifica TNNI3 a sangre. Sin embargo esta consideración no se ve sustentada por el hecho de que en líquido pericárdico los niveles de expresión en las asfixias (3.00) son muy similares a las MSCi (4.42) y a los politraumatismos (4.71), cuando según este razonamiento deberían ser también mayores los valores encontrados en el grupo de asfixias, en incluso por encima de los hallados en sangre. En sangre y también en relación a la TNNI3, su expresión en casos de MSCi (4.06) es considerablemente mayor que en las muertes por politraumatismos (0.42) y otras muertes naturales (1.21) hallazgo que si puede estar en relación al componente isquémico del primer grupo de causas de muerte, asociado a una lisis celular o a un aumento de expresión en sangre de esta proteína estructural del corazón como respuesta a un daño isquémico. Cuando analizamos la expresión de TNNI3 en líquido pericárdico, llama la atención que esta es considerablemente menor en otras muertes naturales (0.71), que en el resto de causas de muerte que presentan resultados muy similares (valores de 3.00 en asfixia, 4.71 en politraumatismos y 4.42 en MSCi). Teniendo en cuenta que cualquier daño o lesión que se produzca en el tejido miocárdico puede afectar inmediatamente a los componentes del líquido pericárdico, motivo por el cual cualquier estudio en este fluido es de gran utilidad, resulta relevante una mayor expresión de TNNI3, en los casos en los que existe un daño miocárdico directo (MSCi y politraumatismos con traumatismo torácico), o indirecto (mecanismo hipóxico-isquémico generalizado de la asfixia mecánica) en comparación con las muertes en las que el corazón no se ve afectado. Aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas, si nos aportan una información de gran riqueza en relación al comportamiento fisiopatológico a un nivel molecular de la TNNI3, pudiendo en este sentido ilustrarnos sobre los mecanismos de muerte implicados en un determinado caso dudoso, sobre todo de ocultar una MSC de origen isquémico.

Respecto a la expresión de MYL3, aunque no se han podido encontrar diferencias estadísticamente significativas, si es muy llamativo que su expresión en sangre es mucho mayor en casos de MSCi (40.25) y politraumatismos (59.04), en comparación con las muertes por asfixia (6039) y con las otras muertes naturales (0.16). La MYL3 se considera una proteína estructural muy importante en el músculo cardíaco [183, 184, 187] de modo que sus altos niveles de expresión en

las muertes de origen isquémico y en las que existe un traumatismo torácico, debe estar en relación directamente con el daño miocárdico directo de uno u otro origen, hechos que pueden explicar estos resultados. Además, aunque considerablemente menor que en los dos grupos anteriores, la expresión de esta molécula en casos de asfixia es mayor que en otras muertes naturales, lo que puede estar en relación con ese componente hipóxico-isquémico que presentan las asfixias, el cual supone un daño miocárdico menor que en las MSCi y los traumatismos torácicos pero mayor que en otro tipo de muertes naturales. Por otro lado, la expresión de MYL3 en líquido pericárdico es mayor en casos de asfixia (11.37) y politraumatismos (9.74) en comparación con las MSCi (1.24) y las otras muertes naturales (0.71). En este sentido, y en comparación con los resultados obtenidos en sangre, llama la atención la menor expresión de esta molécula en líquido pericárdico, lo que sugiere que esta expresión puede proceder de las células sanguíneas y no de ARNm liberado por un tejido miocárdico dañado, ya que si no los niveles de expresión en líquido pericárdico deberían haber sido mayores. Además, en casos de MSCi la expresión de MYL3 en sangre es mucho mayor que en líquido pericárdico, lo que puede indicar que, en este caso la respuesta de las células sanguíneas a la isquemia es mayor.

En relación a la MMP9, su expresión en tejido miocárdico en las muertes por politraumatismo (15.61) es mayor que en los demás grupos de causa de muerte (1.93 para las MSCi, 3.02 para las asfixias, y 0.99 para las otras muertes) no siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 9). Pero debemos destacar que en nuestros casos la expresión de MMP9, molécula muy íntimamente relacionada con la reparación del daño miocárdico y la angiogénesis, tiene una mayor expresión en las muertes con daño miocárdico directo (MSCi y politraumatismos con traumatismo torácico) o indirecto (mecanismo hipóxico-isquémico generalizado de la asfixia mecánica) en comparación con los que el corazón no se ve afectado (otras muertes naturales), siendo la expresión considerablemente mayor (hasta 5 veces más) en los politraumatismos, lo que puede estar en relación con un daño miocárdico mucho más intenso y extenso que en que se produce en las MSCi y en las asfixias. Estos mismos resultados hallados en tejido miocárdico, en lo que se refiere a su mayor expresión en el grupo de politraumatismos también se observan en sangre, aunque a una menor escala (Figura

9), lo que implica que esa respuesta que hemos podido observar en tejido se traduce también a sangre, existiendo una mayor expresión de esta molécula de remodelación en los casos de daño miocárdico de origen traumático. Sin embargo el comportamiento de la MMP9 en líquido pericárdico es diferente en las distintas causas de muerte. En este fluido si hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de MMP9. La expresión relativa de esta molécula en líquido pericárdico es mayor es las muertes por asfixia mecánica (12.61) en comparación con otras causas de muerte (1.07 para MSCi, 2.22 para los politraumatismos, y 1.43 para otras muertes naturales) (Tabla 9 y Figura 9; $P < 0.05$). De este modo, aunque la expresión de MMP9 es alta en los politraumatismos (como ocurría en tejido y sangre aunque con niveles menores), en el líquido pericárdico, es en los casos de asfixia cuando su expresión es más elevada, lo que puede estar en relación a que la respuesta a la hipoxia de esta molécula se expresa mucho más en este fluido.

Por último considerar que la expresión relativa de TGFB1 y VEGF en los diferentes grupos de causa de muerte se ha mostrado muy homogénea, no existiendo diferencias entre los diferentes mecanismos de muerte, por lo que estas moléculas, en nuestro caso no nos han servido para diferenciar la causa de la muerte, ya que no se han encontrado diferencias en ninguno de los tipos de muestras analizados. Estos resultados si contrastan con los obtenidos por otros autores para estas moléculas. Con respecto al VEGFA, al estudiar su expresión en muestras de orejuela y de ventrículo obtenidas durante cirugía coronaria, se encontró la existencia de una mayor expresión de VEGF en casos de isquemia miocárdica aguda y de IAM recientes (<24 horas de evolución) [174]. En casos forenses y para el VEGFA, se encontró, en muestras de tejido de ventrículo izquierdo, una mayor expresión en casos de IAM [107]. En relación al TGFB1 se ha estudiado, desde un punto de vista clínico, en muestras de sangre de pacientes con IAM, encontrándose que su expresión disminuye en este tipo de pacientes [179, 180].

Por otro lado en nuestro trabajo estudiamos la expresión de las diferentes moléculas consideradas en relación a causa de la muerte, pero en este caso comparando las diferentes zonas cardíacas (Tabla 10), obteniéndose unos

resultados muy homogéneos en las distintas causas de muerte, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas. De modo que no hemos podido encontrar que en determinados grupos de causa de muerte, como podrían ser las MSCi, haya una expresión diferencial por zonas de alguna de las moléculas analizadas, lo que nos hubiera permitido localizar el daño miocárdico. Otros autores si han podido encontrar una mayor expresión de VEGFA localizada en zonas de lesión isquémica, asociándose además los niveles de expresión con la severidad del daño miocárdico [107].

Por último, se llevó a cabo un estudio de comparación entre los dos subgrupos de MSC de origen isquémico:

- MSC de origen isquémico con IAM (MSCi+IAM): casos en los que existía un diagnóstico anatomopatológico de IAM, establecido por el hallazgo de necrosis de miocardiocitos en el estudio microscópico con H&E del corazón, o bien por la existencia de infiltrado inflamatorio agudo o subagudo.
- MSC de origen isquémico sin IAM (MSCi): casos diagnosticados como MSC de origen isquémico, por la presencia de signos inespecíficos de isquemia y/o infarto de miocardio antiguo, con evidencia de cardiopatía isquémica severa, y con antecedentes personales de cardiopatía isquémica, y siempre una vez descartadas otras causas de muerte.

Esta diferenciación es de un gran interés forense, ya que en primer caso estamos hablando de MSC en la que ha transcurrido un tiempo de al menos 5-6 horas entre el inicio de los síntomas y la muerte, por lo que ha dado más tiempo para que se pongan en marcha mecanismos de respuesta al daño miocárdico, frente a los casos de MSCi sin IAM, los cuales son muertes súbitas que se presentaron en menos de 5 horas desde el inicio de los síntomas, por lo que los mecanismos de respuesta generados serían menores.

Cuando se analizó la expresión relativa de las diferentes moléculas comparando el grupo de MSCi con el grupo de MSCi+IAM, tanto en tejido miocárdico, como en

sangre y en líquido pericárdico (Tabla 11), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo además los niveles de expresión de las diferentes moléculas muy similares en ambos grupos, por lo que la expresión de estas moléculas no nos ha permitido diferenciar entre las MSCi con y sin IAM. En este sentido solamente un autor ha encontrado, en aquellos casos en los que el miocardio mostraba cambios isquémicos precoces sin IAM (al igual que en casos de infartos evolucionados) unos niveles de expresión de VEGFA levemente aumentados en relación a los casos sin IAM, y en comparación a unos niveles más altos en los casos con IAM [107]. En nuestros casos, sólo cabe destacar que para la MYL3 la expresión relativa en sangre es mayor en los casos de MSCi sin IAM, aunque no existe significación (Tabla 11). Esto podría estar en relación con una respuesta rápida en la expresión de esta molécula, que está presente en las fases más precoces de la isquemia, y que se normaliza cuando trascurren varias horas desde el inicio de los síntomas y el infarto ya está establecido y se ha iniciado el proceso reparativo, al menos 6 horas después del comienzo de la isquemia.

También se comparó la expresión relativa de las diferentes moléculas entre estos dos subgrupos de causa de muerte por zonas cardíacas, apareciendo algunas diferencias estadísticamente significativas (Tabla 12 y Figura 10). Antes comentar que, en nuestros casos, la expresión de MMP9 en las MSCi sin IAM ha sido mayor en ventrículo izquierdo y sin embargo en las MSCi con IAM se ha expresado más en ventrículo derecho, sin que existan diferencias estadísticamente significativas. Esto puede estar en relación a que esta es una molécula de reparación cuya función será más importante en casos de IAM ya establecido, de modo que (habría que ver los casos individuales) puede ser que en los IAM diagnosticados y ya en fase, al menos inicial de reparación, estén localizados en ventrículo derecho, mientras que los casos de MSCi sin IAM, la isquemia esté predominantemente localizada en ventrículo izquierdo.

De este modo, la MMP9 y el VEGFA se expresan más en los casos con IAM establecido, lo que está en relación a que son moléculas de reparación y remodelación miocárdica y de angiogénesis, que se producen como respuesta a un daño miocárdico ya establecido, y que por tanto precisa de un tiempo mínimo de sobrevivencia para tener una expresión significativa. El que se eleven en zonas del

ventrículo derecho en casos de IAM, probablemente esté en relación con la localización de la lesión isquémica ya establecida y en proceso de reparación. Para comprobar esta afirmación debemos de hacer un estudio individual del caso. Esta localización del IAM también lo han podido realizar otros autores a través del estudio de la expresión del VEGFA [107].

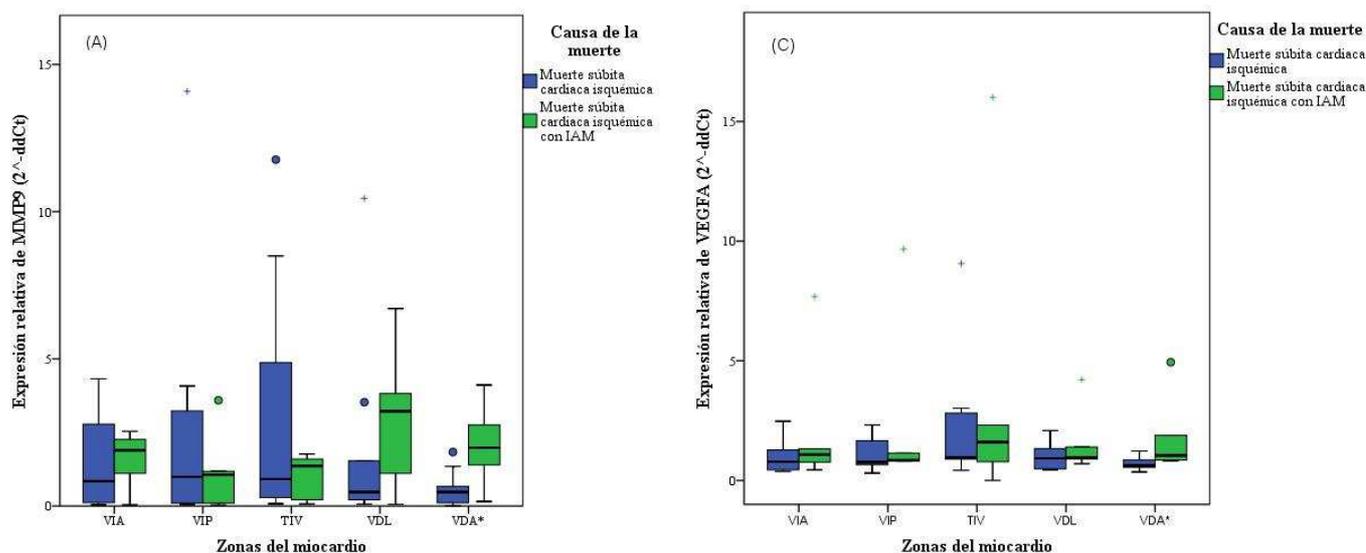


Figura 10A y 10C. Expresión relativa (2^{-ddCt}) de MMP9 y VEGFA en las diferentes zonas cardíacas por grupos de causa de muerte: muertes súbitas cardíacas isquémicas (MSCi) y muertes súbitas cardíacas isquémicas con IAM. *Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de MSCi y MSCi con IAM en la expresión relativa de MMP9 y de VEGFA ambas en VDA ($P < 0.05$).

Además, se encontró que la expresión de MMP9 (Tabla 12; Figura 10A) y de VEGFA (Tabla 12; Figura 10C) en ventrículo derecho, y en concreto en la pared lateral de este, era mayor en casos de MSCi con IAM, que en aquellos que no tienen IAM ($P < 0.05$).

Otro hallazgo de interés se refiere a que la expresión de TGFB1 (Tabla 12; Figura 10B), en el tabique interventricular, fue menor en los casos de MSCi con IAM ($P > 0.05$).

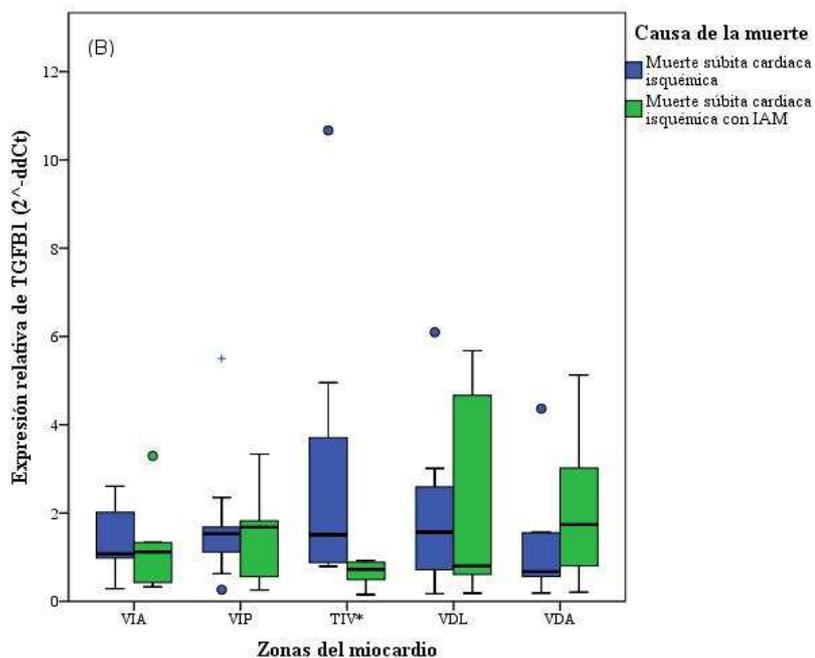


Figura 10B. Expresión relativa (2^{-ddCt}) de TGFB1 en las diferentes zonas cardíacas por grupos de causa de muerte: muertes súbitas cardíacas isquémicas (MSCi) y muertes súbitas cardíacas isquémicas con IAM. *Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de MSCi y MSCi con IAM en la expresión relativa de TGFB1 en TIV ($P < 0.05$).

Este resultado puede estar en relación con los obtenidos en sangre por otros autores, que demostraron la existencia de una menor expresión de esta molécula en muestras de sangre de pacientes con IAM [179, 180]. El que esta citocina este menos expresada en los casos de IAM establecido, está en relación a que sus potentes efectos orientados a la curación del infarto, la reparación cardíaca y el remodelado ventricular izquierdo, se basan su papel inhibitor de la respuesta celular, siendo la señalización del TGFB1 crucial para la represión de genes inflamatorios en los infartos mediando la resolución del infiltrado inflamatorio [60, 62, 180]. Por ello en una fase del IAM en la que el infiltrado inflamatorio es fundamental, y se está en un proceso de plena reparación, esta molécula moduladora debe estar en unos niveles más bajos. Por el contrario, el que su expresión sea mayor en los casos de MSCi sin IAM, es decir en fases más precoces de la isquemia, donde el infiltrado inflamatorio y el comienzo de la

reparación aún no es evidente, se relaciona con que esta es una citocina que se incrementa tempranamente en la zona isquémica, regulando la respuestas inflamatoria y neurohumoral, con la finalidad de delimitar el área dañada e iniciar la fibrosis reparativa [52, 60, 61]. El que las diferencias en la expresión de TGFB1 se manifiesten en tejido y, concretamente en el tabique interventricular, probablemente este en relación con la localización de la lesión isquémica, siendo necesario el estudio individual de los casos.

Finamente, y en lo que se refiere a la expresión génica y el establecimiento de la causa de la muerte, nuestros resultados demuestran que, aunque este sea un campo todavía poco estudiado dentro del ámbito forense, la biología molecular puede ser un método más para el diagnóstico de la lesión miocárdica isquémica precoz y del IAM, y que incluso puede permitir localizar el lugar de la lesión isquémica, valorar la fase en la que esta se encuentra, y la severidad del daño isquémico. En este sentido podríamos establecer un perfil de expresión para las casusas de muerte que hemos considerado, según los resultados esperados para cada tipo de muestra:

- MSC isquémica: En sangre expresión elevada de TNNI3, MYL3 y MMP9; en tejido miocárdico alta expresión de MMP9.
- Politraumatismos: En sangre alta expresión de MYL3 y MMP9; en líquido pericárdico expresión elevada de TNNI3 y MMP9; en tejido miocárdico altos niveles de expresión de MMP9.
- Asfixias mecánicas: En sangre niveles de expresión elevados de TNNI3 y MMP9, en líquido pericárdico y tejido miocárdico alta expresión de MMP9
- Otras muertes naturales: En sangre bajos niveles de expresión de TNNI3 y MMP9; en líquido pericárdico baja expresión de TNNI3; en tejido miocárdico en expresión baja de MMP9.

Cando dividimos el grupo de MSC isquemia en casos con IAM y sin IAM, el perfil de expresión es el siguiente, el cual como ya hemos comentado se

correlaciona con la fisiopatología de la isquemia miocárdica, del IAM y su reparación:

- MSC isquémica sin IAM: Alta expresión en sangre de MYL3 y de TGFB1 en tejido, ambas moléculas relacionadas (sobre todo el TGFB1) con la fase aguda de la isquemia, y que se ponen de manifiesto en estos casos en los que no existe IAM manifiesto, y por tanto en los cuales no se ha iniciado un proceso de reparación aún.
- MSC isquémica con IAM: Alta expresión de MMP9 y de VEGFA en tejido miocárdico, ambas moléculas relacionadas con la reparación de la lesión isquémica y la neoangiogenesis, las cuales se expresan en la fase en la cual tenemos un IAM establecido y ya en proceso reparativo.

De este modo estos perfiles de expresión nos pueden ayudar claramente a diferenciar los casos de MSCi con y sin IAM, pero sobre todo, nos pueden permitir identificar aquellos casos de MSCi sin IAM, en los que han transcurrido menos de 6 horas entre el inicio de los síntomas y la muerte, en los que no tenemos datos suficientes para hacer un diagnóstico de isquemia por métodos convencionales (macro y microscópicos). De este modo, ante una sospecha de MSCi, si encontramos un perfil de expresión típico de una MSCi tras estudiar estos genes diana en sangre, líquido pericárdico y tejido miocárdico, podremos afirmar que con casi total probabilidad se trata de una muerte de origen isquémico, una vez descartadas otras causas de muerte, incluidas las muertes por politraumatismo y por asfixia mecánica, las cuales no suelen presentar dificultad al patólogo forense para su diagnóstico, muy al contrario de lo que ocurre con los casos de MSC de origen isquémico, en los que la muerte se produce de forma muy rápida desde el inicio de los síntomas sin que se pueda detectar la isquemia y/o el IAM.

Además, en función del perfil de expresión que encontremos, incluso podremos datar la isquemia, de modo que un perfil en el que predomine la expresión de MYL3 y TGFB1 indicara que la muerte se ha producido en el contexto de un evento isquémico en fase aguda, mientras si existe un predominio en la expresión de moléculas de reparación y angiogenesis, como son la MMP9 y el VEGFA, la muerte

se habrá producido en una fase de isquemia establecida y en fase reparativa, con lo que la probabilidad de encontrar en el estudio histopatológico una IAM en evolución o reciente será muy elevada. Por tanto, la valiosa información que se desprende de los estudios de expresión de estas moléculas esta directa mente en relación con la fisiología y la fisiopatología de las mismas que ya conocemos.

2. Estudios bioquímicos: Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnT_{hs}) en sangre y líquido pericárdico

La bioquímica postmortem se está convirtiendo cada vez más en un elemento esencial en la rutina de la patología forense. En la actualidad está completamente aceptado que, los análisis bioquímicos en tejidos y fluidos postmortem, son de gran utilidad para la investigación de la causa de la muerte, especialmente cuando los cambios fisiopatológicos involucrados en la muerte no pueden ser detectados mediante métodos morfológicos [115]. Además se debe tener en cuenta que los cambios en los parámetros bioquímicos pueden estar relacionados con la data de la muerte, siendo este siempre un aspecto de gran interés y que se debe valorar por parte del investigador en el campo de la medicina forense [115].

Ya hemos considerado que un problema de importante magnitud en la patología forense es el establecimiento de la causa de la muerte en casos especiales, y en particular para alcanzar diagnóstico postmortem de las lesiones isquémicas miocárdicas y del IAM, y por ello desde siempre se han buscado también marcadores bioquímicos que nos permitan hacer un diagnóstico postmortem del IAM. En esta búsqueda debemos considerar que un marcador bioquímico ideal para el diagnóstico del IAM [131, 200] debe ser específico de daño miocárdico, y ha de permitir el diagnóstico de un daño miocárdico en presencia de lesión de músculo esquelético. Además debe tener una alta sensibilidad, y ha de poder detectar incluso daños muy pequeños, no siendo detectado en casos en los que no exista daño a ese nivel. Junto con lo anterior, este marcador ideal debe estar presente en los miocardiocitos con unos niveles elevados, y debe permitir hacer tanto un diagnóstico precoz como tardío del IAM. Pero además, para que un marcador sea útil para el diagnóstico postmortem del IAM, este debe ser estable después de la muerte, y no modificarse en el intervalo postmortem más precoz (al menos durante las primeras 24 horas).

Varios autores ya han investigado en suero postmortem procedente de diferentes zonas y en líquido pericárdico marcadores bioquímicos de isquemia miocárdica y de IAM, tales como la miosina, la creatin-kinasa MB, la mioglobina, y especialmente, por su especificidad, la troponina I y T, que ya han sido y siguen siendo, usadas para

el diagnóstico postmortem del IAM [95, 119, 120, 126, 131-135]. En casos de MSC la elevación de las troponinas en sangre y líquido pericárdico puede depender de la severidad del daño miocárdico por varias causas, incluyendo el tamaño y la intensidad de las lesiones miocárdicas [133].

Hasta ahora, las troponinas cardíacas han sido estudiadas en muestras forenses mediante el uso de ensayos convencionales, y es en nuestro trabajo, cuando por primera vez se ha determinado troponina T cardíaca en sangre y líquido pericárdico postmortem usando métodos de alta sensibilidad, concretamente la conocida con troponina T cardíaca ultrasensible (cTnT_{hs}) estudiándose, además su estabilidad después de la muerte.

Antes de comenzar con el análisis de la utilidad que puede tener la cTnT_{hs} en el campo forense para el diagnóstico postmortem de la lesión isquémica precoz y del IAM, debemos estudiar cual es la estabilidad postmortem de este marcador bioquímico tanto en sangre como en líquido pericárdico. Para ello el primer punto que se debe considerar es la influencia de la data de la muerte. Los niveles de cTnT_{hs} en sangre no mostraron correlación con la data de la muerte, sin embargo si se encontró correlación entre el intervalo postmortem y los niveles de cTnT_{hs} en líquido pericárdico ($R^2 = 0.402$; $P < 0.01$), es decir a más data mayores niveles de cTnT_{hs} y viceversa. El hecho de que con la data aumente la cTnT_{hs} en el líquido pericárdico puede estar en relación con la autólisis, y a que este fluido se encuentra muy bien preservado en el saco pericárdico, de modo que a medida que la data aumenta la lisis celular es mayor, liberándose progresivamente más cantidad de troponina al líquido pericárdico.

Como posibles factores de interferencia en los niveles detectados de cTnT_{hs} en ambos fluidos también se estudió la influencia del sexo y de la edad, no encontrándose resultados significativos, por lo que la determinación de cTnT_{hs} es independiente de estas dos variables.

El siguiente punto a considerar son los valores obtenidos de cTnT_{hs} en sangre y líquido pericárdico, punto fundamental ya que es la primera vez que esta molécula se determina en muestras forenses. Debemos considerar que, en la práctica clínica, y para el diagnóstico del IAM, los valores de normalidad para la cTnT_{hs} en

sangre se encuentran entre 0 y 14 ng/L. En primer lugar, en la práctica clínica se determina la cTnThs en sangre para el diagnóstico del IAM, los valores de normalidad se encuentran entre 0 y 14 ng/L. De este modo, y en comparación con los valores *in vivo*, tanto en sangre como en líquido pericárdico se han obtenido valores considerablemente más altos (Tabla 13) estando el rango de cTnThs en sangre entre 3 y 10000 ng/L, y entre 872 y 50000 ng/L en líquido pericárdico, no pudiendo por tanto ser comparados con los valores de esta molécula en casos clínicos. Los altos valores obtenidos en sangre, pueden estar en relación a que durante el periodo postmortem, ocurren una serie de cambios fisiológicos, tanto a nivel bioquímico como hematológico, como la hemólisis y la influencia de otros fluidos extracelulares. Esta es la causa de que cuando se estudian diversos marcadores en sangre postmortem y los comparamos con los resultados obtenidos en sangre procedente de un individuo vivo se encuentren importantes diferencias. Respecto al líquido pericárdico destaca que los valores obtenidos son mayores que en sangre, siendo estos del orden de 16 veces mayores (Tabla 13, media de cTnThs en sangre de 1847 ng/L y en líquido pericárdico de 29677 ng/L). Este hallazgo puede ser consecuencia de que este fluido es un ultrafiltrado del plasma que contiene sustancias bioquímicas derivadas de la sangre y del tejido cardíaco, y que está muy bien preservado en el saco pericárdico, estando además en contacto directo con el corazón. Junto con lo anterior, la irrigación del pericardio es común a la del corazón por lo que las alteraciones miocárdicas se reflejan en el líquido pericárdico, con mucha mayor rapidez y con una mayor intensidad que en la sangre periférica [114, 117]. Por todo ello los niveles de este marcador pueden ser más elevados en el líquido pericárdico, junto con la influencia de la data de la muerte comentada anteriormente.

También se estudió si los niveles que encontramos de cTnThs en sangre estaban en relación con los hallados en el líquido pericárdico, y en este caso se pudo observar que existe una correlación de los niveles de este marcador bioquímico entre ambos fluidos (Tabla 13; $R^2= 0.449$; $P<0.01$). Este es un dato importante de modo que cuando la cTnThs se eleva en uno de estos dos fluidos postmortem también lo hace en el otro. Este hallazgo está en relación con la irrigación del pericardio, ya comentada con anterioridad y que es común a la del corazón, por lo que las modificaciones de este marcador se reflejan primero y con mucha mayor rapidez

e intensidad en el líquido pericárdico debido a la proximidad del corazón, y posteriormente en sangre periférica, de forma más tardía y con menor intensidad [114, 117]. De este modo si existe una elevación de este marcador en el líquido pericárdico también se podrá encontrar poco después en sangre.

El siguiente punto sería analizar los resultados obtenidos tras la determinación de cTnT_{hs} en sangre y en el líquido pericárdico, comparando los cuatro grupos de causa de muerte: Muerte súbita cardíaca isquémica (MSCi), politraumatismo, asfixia mecánica y otras muertes naturales (Tabla 14 y Figura 11).

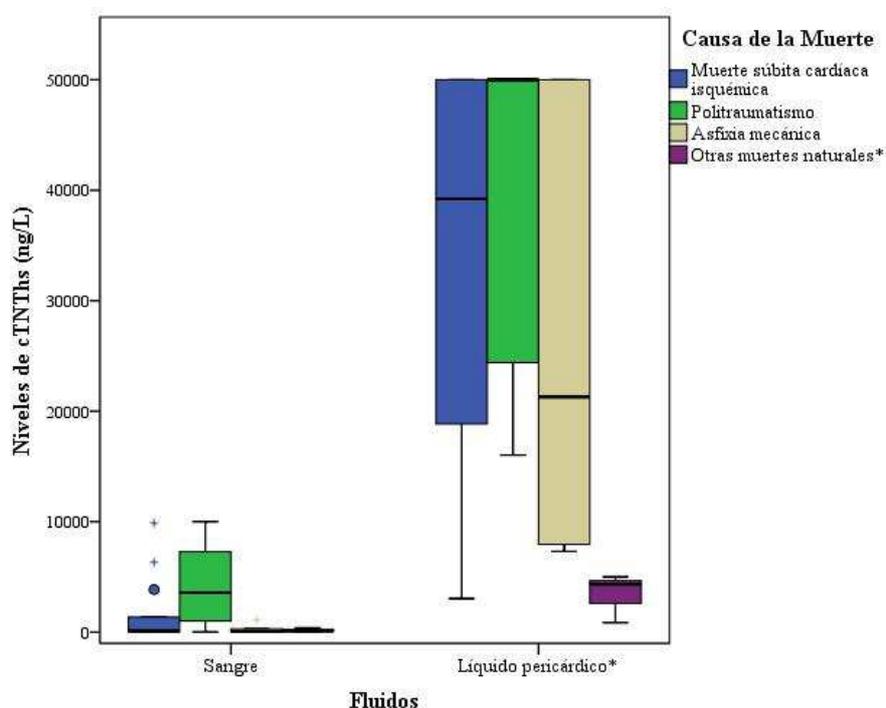


Figura 11. Niveles de Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnT_{hs}) en sangre y líquido pericárdico por grupos de causa de muerte: muertes súbitas cardíacas isquémicas, politraumatismo, asfixia mecánica, y otras muertes naturales. *Diferencias estadísticamente significativas en los niveles de cTnT_{hs} en líquido pericárdico entre el grupo de otras muertes naturales y el resto de causas de muerte ($P < 0.05$).

Cuando se compararon los resultados obtenidos en sangre entre las diferentes causas de muerte no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Si podemos destacar que en sangre (Tabla 14 y Figura 11) los mayores niveles de cTnT_{hs} los encontramos en las muertes por politraumatismo (media de

4310 ng/L), seguidas de las MSCi (media de 1651 ng/L), siendo considerablemente menores en las asfixias mecánicas (media de 265 ng/L) y sobre todo en el grupo de otras muertes naturales (media de 174 ng/L). De este modo la cTnThs que es una proteína estructural del corazón se eleva más en sangre en casos de daño miocárdico de origen traumático, en nuestros casos politraumatismos con traumatismo torácico, en los que existe un daño directo y marcado que se pone de manifiesto claramente en sangre. En las MSCi también se eleva este marcador indicando daño miocárdico isquémico, siendo los valores menores, sobre todo en relación a la intensidad de la lesión, la cual es mayor en el caso de un traumatismo. En las muertes por asfixia mecánica la elevación es mínima y puede ser consecuencia del mecanismo hipóxico-isquémico indirecto implicado en estas muertes y que también produce cierto daño miocárdico. Los valores más pequeños los hemos encontrado en el grupo de otras muertes naturales donde la movilización de este marcador es mínima, pero detectada por estas técnicas ultrasensibles, y que puede ser debida a la situación de hipoxia e isquemia global que se produce en cualquier periodo de agonía. En relación a nuestro interés en el diagnóstico de la lesión isquémica, y el IAM después de la muerte, debemos considerar que en sangre postmortem unas cifras elevadas de cTnThs podrán ser indicativas de una muerte de origen isquémico, y por tanto nos puede ayudar a hacer el diagnóstico de MSC de origen isquémico, siempre y cuando se hayan descartado otras causas de muerte, incluida el politraumatismo y/o el traumatismo torácico y cardíaco.

Cuando hemos estudiado la cTnThs en líquido pericárdico (Tabla 14 y Figura 11), los mayores niveles de cTnThs se hallaron también en los casos de muertes por politraumatismo (media de 37932 ng/L), obteniéndose valores muy cercanos en los casos de MSCi (media de 32672 ng/L) y valores algo menores en los casos de asfixia mecánica (media de 23312 ng/L). Los valores de cTnThs obtenidos en líquido pericárdico en el grupo de otras muertes naturales fueron muy inferiores en comparación con los otros tres grupos de causa de muerte (media de 3407 ng/L), existiendo además diferencias estadísticamente significativas en este grupo de causa de muerte y los demás (Tabla 14 y Figura 11; $P < 0.05$). Considerar cualquier daño o lesión que se produzca en el tejido miocárdico puede afectar inmediatamente a los componentes del líquido pericárdico, y además de manera

mucho más marcada que en sangre, como ya hemos visto [117], de manera que este es un fluido de gran sensibilidad para la detección de daño miocárdico por pequeño que este sea. Si a todo esto le unimos una técnica ultrasensible para la detección de lesiones a este nivel, encontramos que cuando hay daño miocárdico los niveles de cTnT_{hs} se disparan. Esto ocurre en muertes, tanto ante un daño miocárdico directo (MSCi y politraumatismos con traumatismo torácico), como ante un daño indirecto (mecanismo hipóxico-isquémico generalizado pero muy marcado presente en la asfixia mecánica). Por tanto este es un marcador que en líquido pericárdico es de una gran utilidad para diagnosticar daño miocárdico de cualquier origen debido a su alta sensibilidad, permitiéndonos discriminar con una muy alta probabilidad las muertes que tienen un componente cardiaco, directo o indirecto pero marcado, de las que no lo tienen (otras muertes naturales).

De este modo la cTnT_{hs} es un marcador bioquímico que nos puede prestar una gran ayuda para hacer el diagnóstico postmortem de lesión isquémica precoz y de IAM, y que por tanto nos puede permitir esclarecer aquellos casos de MSCi sin IAM, en los que ha transcurrido menos de 6 horas entre la muerte y el inicio de los síntomas, y no tenemos datos suficiente para hacer un diagnóstico por métodos convencionales (macro y microscópicos). De este modo, ante una sospecha de MSCi, si encontramos unos niveles muy elevados de cTnT_{hs} en líquido pericárdico podremos afirmar que con casi total probabilidad se trata de una muerte de origen isquémico, una vez descartadas otras causas de muerte, incluidas las muertes por politraumatismo y por asfixia mecánica, las cuales no suelen presentar dificultades para sus diagnóstico al patólogo forense, al contrario de lo que ocurre con las MSC de origen isquémico que se producen de forma muy rápida sin que se pueda detectar el IAM.

Por último se compararon los niveles de cTnT_{hs} en sangre y líquido pericárdico, entre los subgrupos de MSCi y de MSCi con IAM diagnosticado (Tabla 15 y Figura 12).

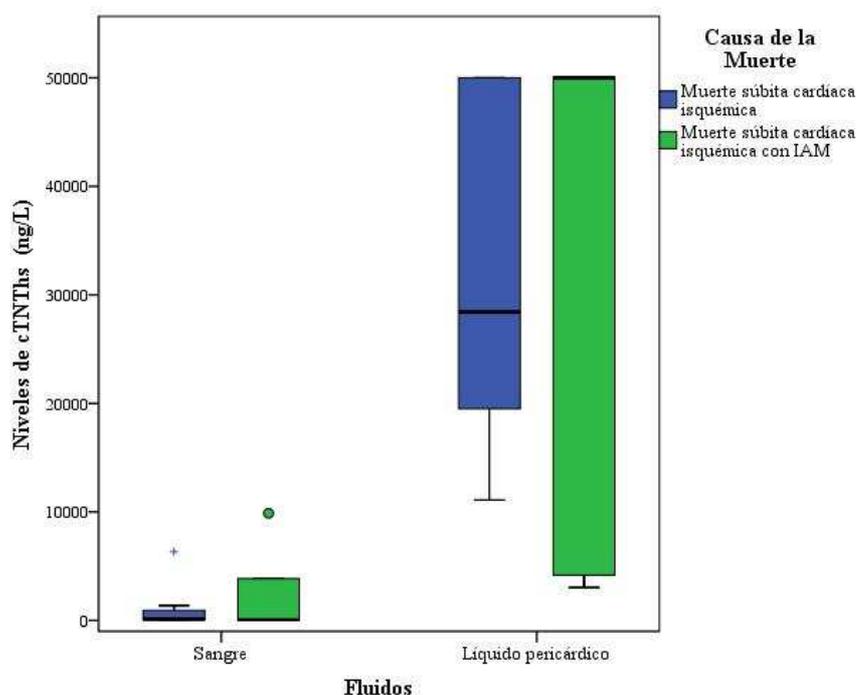


Figura 12. Niveles de Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnT_{hs}) en sangre y líquido pericárdico en los subgrupos de causa de muerte: muertes súbitas cardíacas isquémicas (MSCi) y Muerte Súbita cardíaca isquémica con IAM (MSCi+IAM).

En estas comparaciones no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, pero si cabe destacar que en sangre los valores de cTnT_{hs} fueron más de 2,5 veces mayores en el grupo de MSCi con IAM (media de 1027 ng/L), en comparación con las MSCi sin IAM manifiesto (media de 2776 ng/L). Este dato nos indica que ante la presencia de un IAM anatomopatológicamente establecido, los niveles de cTnT_{hs} en sangre se elevan más, lo que es lógico y esperable, ya que existe un daño isquémico más avanzado con mayor muerte celular, en comparación con las muertes que se producen en un periodo de tiempo muchos más corto desde el inicio de los síntomas donde la lesión suele ser de menor entidad, y la muerte suele estar más en relación directa con una arritmia tipo fibrilación ventricular. En líquido pericárdico los resultados obtenidos fueron muy similares para los dos subgrupos de causa de muerte (MSCi media de 33354 ng/L y MSCi+IAM media de 31443 ng/L), y estos resultados, como ya hemos comentado son consecuencia de la alta sensibilidad de este método, que detecta lesiones miocárdicas mínimas elevándose las cifras de cTnT_{hs} hasta los límites de determinación de la técnica,

ya que además estamos trabajando con un fluido muy sensible a cualquier cambio a nivel miocárdico. Por tanto esta técnica es capaz de detectar tanto un IAM establecido como una lesión isquémica muy precoz, y nos puede ser de gran utilidad en aquellos casos de MSCi sin IAM, que se producen muy rápidamente desde el inicio de los síntomas que son los que realmente plantean problemas al patólogo forense.

3. Expresión génica y estudios bioquímicos: Análisis de la relación entre ellos

Otro punto de nuestra investigación ha sido, una vez obtenidos los resultados de expresión molecular y de la troponina T cardíaca ultrasensible (cTnT_{hs}) como marcador bioquímico, estudiar si existe relación entre ellos, es decir, si la respuesta molecular y bioquímica se correlacionan. Para ello comparamos los niveles de expresión tanto en tejido miocárdico, como en sangre y en líquido pericárdico, de las moléculas estudiadas, TNNI3, MYL3, MMP9, TGFB1 y VEGFA, con los valores de cTnT_{hs} obtenidos en sangre y en líquido pericárdico. No se encontró correlación alguna entre ellos, salvo entre la expresión génica de VEGFA en líquido pericárdico y los valores de cTnT_{hs} en líquido pericárdico ($R^2 = 0.393$; $P < 0.05$). De este modo la expresión TNNI3 en tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico no se correlacionan con los valores de cTnT_{hs} que podemos obtenidos en sangre y líquido pericárdico, por tanto la expresión de esta molécula es independiente de los niveles bioquímicos encontrados en fluidos postmortem. Esta misma afirmación se puede mantener para el MYL3, la MMP9 y el TGFB1. En relación al VEGFA se ha comprobado que sus niveles de expresión en líquido pericárdico caminan paralelos a las cifras de cTnT_{hs} también en líquido pericárdico, de modo que sí encontramos unos niveles elevados de cTnT_{hs} en este fluido, lo que nos indica daño miocárdico, como ya hemos visto, junto con niveles elevados de expresión de VEGFA, que se puede asociar a la puesta en marcha de un mecanismo de reparación en el cual la angiogénesis juega un papel fundamental. Esto se detecta en el líquido pericárdico ya que cualquier daño o lesión que se produzca en el tejido miocárdico puede afectar inmediatamente a los componentes del líquido pericárdico, y además de manera mucho más marcada que en sangre [117], mostrando este fluido una gran sensibilidad para la detección de daño miocárdico.

4. Valoración fisiopatológica del mecanismo de la muerte súbita cardíaca isquémica con y sin infarto agudo de miocardio en casos individuales

Para llevar a cabo el análisis de cuál ha sido el mecanismo fisiopatológico implicado en nuestros casos de MSC isquémica con y sin IAM debemos recordar que, podamos o no detectar el IAM, son dos los mecanismos principales que dan origen a las arritmias ventriculares mortales en la cardiopatía isquémica.

El primer mecanismo está asociado generalmente a la ruptura o fisura de una placa de ateroma inestable, lo que condiciona la formación de un trombo que a su vez da lugar a la oclusión de una o más arterias coronarias principales. Esta oclusión coronaria aguda produce una isquemia miocárdica, la cual es un potente sustrato arritmogénico, que genera una taquicardia ventricular sostenida (TVS), la que a su vez degenera en una fibrilación ventricular (FV), arritmia que finalmente produce la muerte [14]. Por tanto este mecanismo implicado en la MSC de origen isquémico, provoca la muerte en la fase aguda de la isquemia, siendo los primeros 10 minutos los que más predisponen a la aparición de FV, aunque se pueda ampliar el riesgo hasta las primeras 24 horas [14]. En estos casos, generalmente, la MSC se produce muy rápidamente desde el inicio de los síntomas, no siendo posible el diagnóstico de IAM en la gran mayoría de los fallecimientos por este mecanismo de muerte. En más del 50% de los casos, de MSC de origen isquémico, se encuentran en la autopsia cambios agudos en placas de ateroma coronarias, especialmente si se realiza un estudio histopatológico detallado. Estos cambios agudos generalmente consisten en la rotura o fisura de una placa inestable, con o sin un trombo fresco asociado [5, 11, 14, 15, 18, 28]. Cuando, en estas MSC de origen isquémico, el trombo fresco no aparece, generalmente es debido a que se ha producido una lisis espontánea del mismo [18]. Por tanto estos hallazgos nos permiten explicar cuál ha sido el mecanismo fisiopatológico de la MSC isquémica en más de la mitad de los casos. Por ello, en la autopsia del corazón es fundamental el estudio de las arterias coronarias, en busca de placas inestables, rotas y/o con trombosis aguda. El estudio de las arterias coronarias, siempre se debe completar con un análisis microscópico de las mismas, que nos confirme el grado de estenosis y la lesión de la placa de ateroma, además de la

presencia del coágulo. De este modo, aunque este es el mecanismo que subyace en las MSC isquémicas que ocurren en la fase aguda del proceso isquémico, debemos considerar que con mucha menor frecuencia, la MSC isquémica en esta fase, puede ser consecuencia de un bloqueo cardíaco o por asistolia, sobre todo cuando la arteria coronaria implicada es la derecha [12].

El segundo mecanismo implicado en las MSC de origen isquémico, capaz de generar una arritmia mortal, se da en individuos que han sufrido un IAM, pero que han pasado ya la fase aguda del mismo, habiendo transcurrido al menos 48 horas desde el inicio de los síntomas. Son aquellos casos en los que existe un infarto de miocardio que se encuentra en evolución o que ya está establecido. Recordar que tras sufrir un IAM, durante los primeros 6 meses, se mantiene un riesgo elevado de sufrir arritmias malignas, y por tanto de MSC isquémica, siendo este riesgo particularmente alto en los 2-3 primeros meses. Cuando ante un IAM reciente en fase de evolución o ya en situación estable, se produce una MSC isquémica, el mecanismo subyacente, es también una arritmia mortal, tipo fibrilación ventricular, generada en un sustrato altamente arritmogénico, como es un área de fibrosis en proceso de estabilización o ya completamente establecida [14, 86]. Por tanto el proceso de cicatrización, o la propia cicatriz reciente de un IAM, produce una inestabilidad eléctrica, que puede ser el origen de una arritmia y de una MSC isquémica, estando este mecanismo presente en casi el otro 50% de este tipo de muertes. Además, en estos pacientes que ya han sufrido un IAM, el riesgo de MSC isquémica también está asociado de manera fundamental a la presencia de una isquemia residual y al peligro de sufrir un nuevo accidente isquémico [5, 14, 15, 29, 30]. De este modo, durante una autopsia en la que no hallamos cambios agudos en las placas de ateroma (ruptura, fisura, trombosis), pero si encontramos un infarto agudo de miocardio reciente, ya sea en evolución, y por tanto en fase de cicatrización o reparación, o bien un infarto ya establecido o cicatrizado, este será el sustrato que ha generado el mecanismo fisiopatológico de la MSC isquémica con seguridad. Por tanto en estos casos en los que podemos hacer el diagnóstico de IAM ha tenido que transcurrir un tiempo mínimo entre el inicio de los síntomas y la muerte. Destacar que el IAM en fase aguda o en evolución es un hallazgo presente en el 20-25% de casos de autopsias por MSC de origen isquémico. Por otro lado el infarto de miocardio cicatricial más o menos antiguo aparece en el 40-

4. VALORACIÓN FISIOPATOLÓGICA DEL MECANISMO DE LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA ISQUÉMICA CON Y SIN INFARTO AGUDO

70% de casos de autopsias con sospecha de MSC isquémica [7, 9, 11, 12, 15, 17, 29, 30].

Una vez considerados estos aspectos sobre cuáles son los mecanismos fisiopatológicos de la MSC de origen isquémico, atendiendo a ellos, y según los hallazgos de autopsia podemos establecer en nuestros casos de MSC isquémica tres opciones como posibles mecanismos de MSC isquémica (Tabla 16):

Tabla 16. Casos de MSC de origen isquémico según el mecanismo fisiopatológico de la muerte, y valores de Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnT_{hs}) en sangre y líquido pericárdico (LP).

Cadáver	Mecanismo MSC	Data (h)	Infarto agudo de miocardio			Infarto antiguo	cTnT _{hs}		
			AE/TROMBOSIS	Data	Localización		Histopatología	Sangre	LP
8	MSC con trombosis coronaria	12	DA:S/CD:T			VI	135,9	19505	
16		7	DA:STR/CX:M/CD:T			VIA/VIP	29,43	18845	
3	MSC con IAM en evolución	5	DA-CD:S/CX:M	10 días	VIP/TIV	M/L/CP/F/NV	VI	53,94	4180
15		21	DA:L/CX-CD:M	14 días	VIA	M/L	VD	21,78	50000
18		5	DA:M/CX:L/CD:M	10-24h--3-10 días	VIP--VIA	L/M/F--PMN	VIA/VIP	69,76	3033,5
27		19	DA:L/CX:S/CD:L	14-21 días	VI/TIV	L/M/F/NV/TC	VIA	9877	50000
29		11	DA-CX-CD:M-S	14-21 días	VIP/TIV	L/M/F/NV/TC		3857	50000
1	MSC isquémica	22	DA-CX-CD:S				VIP/TIV	42,24	50000
5		8	DA-CX-CD:L-M				VI	258,3	11095
7		12	DA-CX-CD:-M-S				TIV	6340	50000
13		16	DA-CX-CD:-M-S				VIP/VD	935,2	50000
23		10	DA-CX:M/CD				VIP	75,01	28430
25		20	DA-CX:M/CD:S				VIP	48,3	22315
26		23	DA-CX-CD:-L-M				VIP	1374	50000

DA: arteria coronaria descendente anterior; CX: arteria coronaria circunfleja; arteria coronaria derecha; AE: Arterioesclerosis; L: Leve; M: Moderada; S: Severa; T: Trombo coronario; VI: Ventrículo izquierdo; VD: Ventrículo derecho; M: Macrófagos; L: Linfocitos; CP: Células plasmáticas; F: Fibroblastos; PMN: Polimorfonucleares; NV: Neovasos; TC: Tejido conectivo.

Subgrupo 1 (casos 8 y 16). *MSC isquémicas con trombosis coronaria*: producidas en la fase aguda de la isquemia, cuyo mecanismo de muerte es una FV generada por la isquemia secundaria a la ruptura y trombosis de una placa de ateroma, pudiendo demostrarse el trombo fresco y oclusivo en la arteria coronaria.

Subgrupo 2 (casos 3, 15, 18, 27 y 29). *MSC isquémicas con IAM en evolución*: producidas en la fase subaguda de la isquemia, durante la fase de reparación y

cicatrización, en las que la muerte es consecuencia de una fibrilación ventricular desencadenada por la inestabilidad eléctrica de un tejido en proceso de cicatrización, y en las que se ha podido detectar un IAM de entre 3 y 21 días de evolución una vez analizado el infiltrado inflamatorio.

Subgrupo 3 (casos 1, 5, 7, 13, 23, 25, y 26). *MSC isquémicas sin trombosis ni IAM*: en ellas existe una estenosis coronaria significativa (luz del vaso menor de 1mm de diámetro o estenosis mayor del 70%) en al menos una arteria coronaria principal, sin que se haya podido encontrar trombo fresco. En estos casos se asume que el mecanismo de la muerte es una fibrilación ventricular, siendo el origen de esta arritmia en el contexto de un proceso isquémico de fase aguda con ruptura y trombosis oclusiva de una placa, en la que no hemos podido encontrar trombo fresco porque posiblemente se ha producido una lisis espontánea del mismo [18]. En estos casos también se ha podido evidenciar la existencia de un infarto de miocardio antiguo (cicatrizado con fibrosis), que también podría ser el sustrato arritmogénico responsable de la MSC isquémica en determinados casos, aunque con mucha menor probabilidad ya que, como hemos visto, el mayor riesgo de sufrir una MSC tras un evento isquémico se sitúa en las primeras 24 horas.

A continuación, considerando estos tres subgrupos fisiopatológicos de MSC isquémica, hemos procedido a comparar el comportamiento de la cTnT_{hs} en líquido pericárdico, y la expresión génica de las diferentes moléculas diana en este mismo fluido y en tejido miocárdico.

Cuando hemos considerado los niveles de cTnT_{hs} en líquido pericárdico y la expresión de TNNI3 en este mismo fluido y en tejido miocárdico, hemos podido observar que los casos de MSC isquémica sin IAM y sin trombosis tienen un comportamiento similar, de modo que los valores de cTnT_{hs} en líquido pericárdico se encuentran en el tercio medio o superior del total de casos de MSC isquémica, estando también los niveles de expresión de TNNI3, en este fluido y para este grupo de causas de muerte, en el tercio medio o superior.

En cuanto a la expresión en tejido, esta tiene un comportamiento menos diferenciado a los otros subgrupos de MSC isquémica (Figura 15). De este modo y para las MSC isquémicas en las que no encontramos trombosis coronaria aguda

4. VALORACIÓN FISIOPATOLÓGICA DEL MECANISMO DE LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA ISQUÉMICA CON Y SIN INFARTO AGUDO

ni IAM, y que por tanto son las que más problemas diagnósticos nos plantean, el hecho de encontrar unos niveles de cTnT_{hs} elevados en líquido pericárdico (por encima de 20.000 pg/ml) nos podrá orientar hacia el diagnóstico de MSC de origen isquémico, hecho que podrá aparecer asociado a unos niveles medios altos (mayores de 3.5) de expresión de TNNI3, también en líquido pericárdico.

En lo que se refiere al grupo de MSC con trombosis coronaria se puede observar que los dos casos estudiados tienen niveles similares de cTnT_{hs} en líquido pericárdico (en torno a 20.000 pg/ml), no existiendo tanta uniformidad para la expresión de TNNI3 en líquido pericárdico y tejido miocárdico para este grupo (Figura 16).

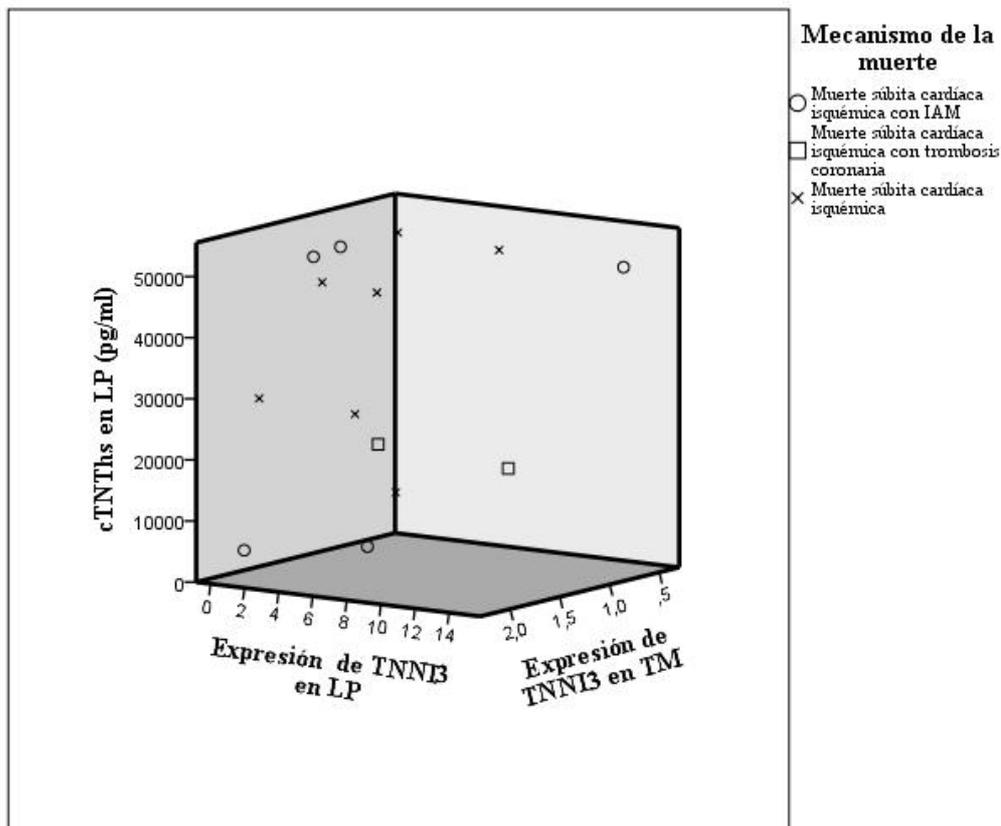


Figura 16. Niveles de cTnT_{hs} en líquido pericárdico (LP), y expresión relativa (2^{-ddCt}) de TNNI3 en líquido pericárdico y en tejido miocárdico (TM), en los subgrupos de MSC isquémica con IAM, con trombosis coronaria, y sin IAM ni trombosis.

4. VALORACIÓN FISIOPATOLÓGICA DEL MECANISMO DE LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA ISQUÉMICA CON Y SIN INFARTO AGUDO

expresión de MMP9 y VEGFA (Figura 18A y 18C). Este hallazgo puede estar en relación a que, por tratarse de muertes que acontecen en la fase aguda de la isquemia, la respuesta molecular de reparación, remodelación y angiogénesis, está en aún en fase incipiente de modo que esta es mínima.

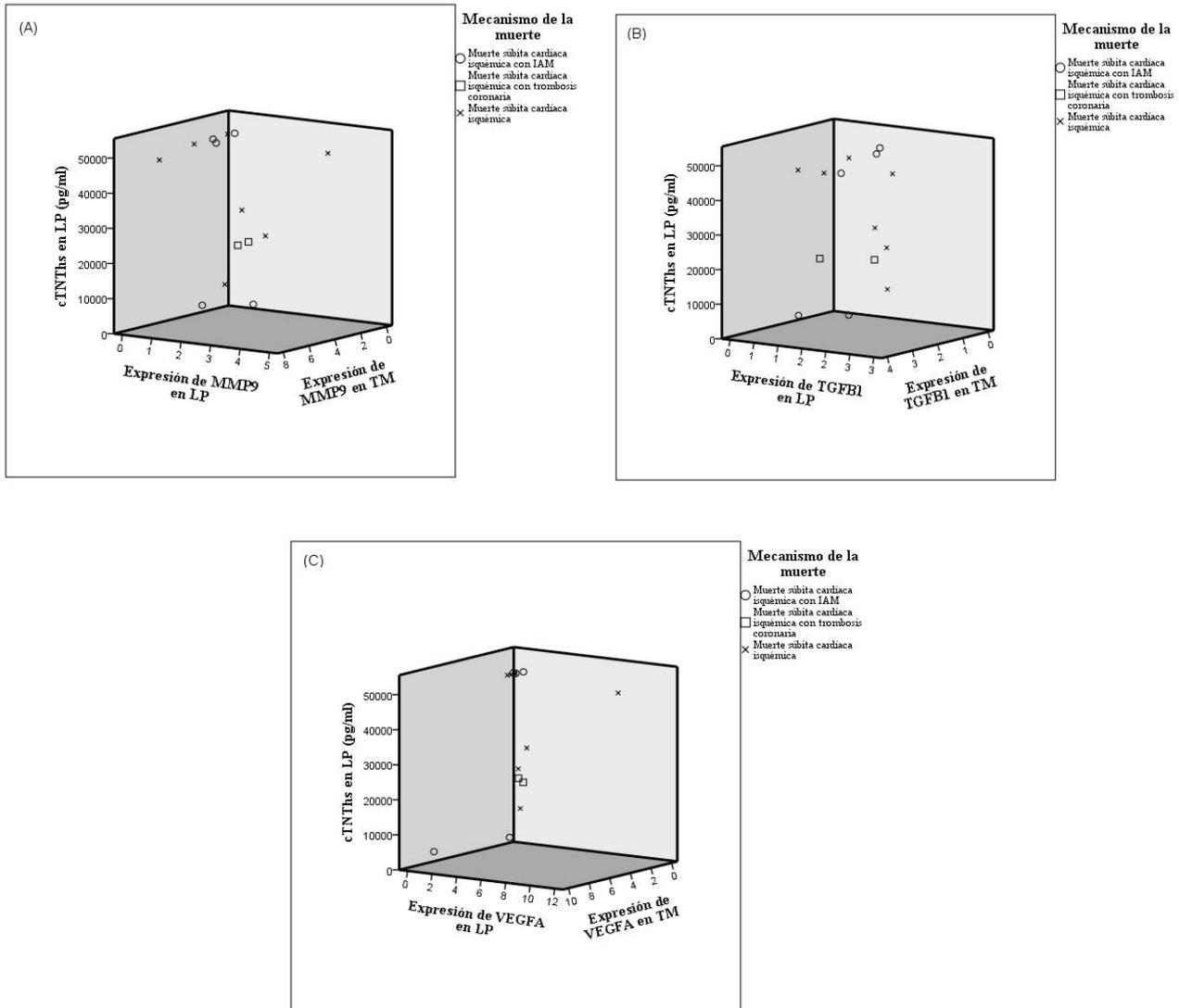


Figura 18. Niveles de cTnT en líquido pericárdico (LP), y expresión relativa (2^{-ddCt}) de MMP9 (A), TGFB1 (B), y VEGFA (C), en líquido pericárdico y en tejido miocárdico (TM), en los subgrupos de MSC isquémica con IAM, con trombosis coronaria, y sin IAM ni trombosis.

Por otro lado, y en lo que se refiere a la expresión de TGFB1 (Figura 18B), cabe destacar que en el grupo de MSC sin trombosis ni IAM, encontramos unos niveles

de expresión ciertamente homogéneos, existiendo una expresión de esta molécula en líquido pericárdico por encima de la media, en comparación con los otros grupos de mecanismo de muerte. Esto nos indica que este grupo, que es el más desconocido, tiene un mecanismo de muerte que está más en relación con la posibilidad de una muerte en fase aguda de la isquemia, por ruptura de una placa inestable y trombosis, aunque no encontramos el trombo, el cual se ha podido lisar espontáneamente. Esta afirmación se basa en que el TGFB1 se expresa más en las fases más precoces de la isquemia, donde el infiltrado inflamatorio y el comienzo de la reparación aún no es evidente, de modo que esta citocina se incrementa tempranamente en la zona isquémica, regulando la respuestas inflamatoria y neurohumoral, con la finalidad de delimitar el área dañada e iniciar la fibrosis reparativa, disminuyendo después, una vez que la respuesta reparativa se ha iniciado [52, 60, 61]. Este hallazgo, también reduce que la posibilidad de que el origen de la MSC isquémica en estos casos, esté en el tejido fibrótico de los infartos antiguos, que encontramos en estos individuos, ya que se la expresión de TGFB1 apoya el hecho de que exista un mecanismo de muerte propio de la fase aguda de la isquemia.

De este modo los hallazgos observados en la expresión de moléculas de inflamación y angiogénesis, tanto en el grupo de MSC con trombosis coronaria aguda, como en el grupo de MSC sin trombosis ni IAM, son coherentes con la fisiopatología de la isquemia miocárdica aguda y del IAM, indicándonos, en ambos casos, que nos encontramos ante un mecanismo de MSC propio de la fase aguda de la isquemia, y asociado por tanto a la ruptura y/o trombosis de una placa de ateroma inestable, mecanismo típico implicado en cualquier síndrome coronario agudo. Además el hecho de encontrar en las MSC sin trombosis ni IAM unos niveles de expresión medios-altos de TNNI3 y el MYL3, nos indica que en la fase aguda de la isquemia, también se produce una rápida respuesta de síntesis de proteínas estructurales del corazón, que puedan ser útiles después, más tarde en la fase reparativa.

VI. CONCLUSIONES

Primera:

Es posible extraer satisfactoriamente ARNm procedente de muestras postmortem de tejido miocárdico, sangre y líquido pericárdico, con una data de hasta 24 horas, en cantidad suficiente, y con calidad e integridad adecuadas, que han permitido la realización precisa de estudios de expresión génica.

Segunda:

Para una correcta normalización de los estudios de expresión génica, se han valorado varios genes endógenos, siendo la GAPDH el gen de referencia que se comporta de manera más estable y baja variabilidad en las distintas muestras estudiadas. Se han obtenido resultados válidos de expresión génica relativa de los genes diana con el uso de la GAPDH como único gen endógeno.

Tercera:

El grado de integridad del ARNm no condiciona los niveles de expresión relativa de los diferentes genes diana considerados, y en ninguna de las muestras estudiadas. No existen diferencias en la expresión de los diferentes genes diana en las diferentes zonas cardíacas, no expresándose por tanto estos genes, más en unas áreas del corazón que en otras.

Cuarta:

Por primera vez se ha determinado la Troponina T cardíaca ultrasensible (cTnT_{hs}) en muestras postmortem de sangre y líquido pericárdico. En comparación con los resultados in vivo, los valores de cTnT_{hs} son más elevados, no pudiendo ser comparados con los que se obtienen en casos clínicos. Los valores de cTnT_{hs} en sangre y en líquido pericárdico se encuentran correlacionados. La data de la muerte no influye en los niveles de cTnT_{hs} en sangre, pero sí en líquido pericárdico, de modo que a mayor data, más cTnT_{hs}.

Quinta:

La data de la muerte no afecta al rendimiento de la extracción de ARNm, ni a la calidad, ni integridad de esta molécula, dentro de las primeras 24 horas postmortem. La data de la muerte afecta negativamente a la expresión de las moléculas estructurales cardíacas (TNNI3 y MYL3), mostrando éstas valores más bajos a datas más largas.

Sexta:

Existen unos patrones determinados de expresión génica de acuerdo a la causa de la muerte, de modo que en muertes súbitas cardíacas de origen isquémico hay una expresión elevada de TNNI3, MYL3 y MMP9 en sangre, y de MMP9 en tejido miocárdico. En las muertes por politraumatismo la expresión de MMP9 es marcada en sangre, líquido pericárdico y tejido miocárdico. En casos de asfixia mecánica existen niveles de expresión elevados de TNNI3 y MMP9 en sangre, y una alta expresión de MMP9 en líquido pericárdico y tejido miocárdico. En el grupo de otras muertes naturales, hay en sangre bajos niveles de expresión de TNNI3 y MMP9, y una baja expresión de TNNI3 en líquido pericárdico y de MMP9 en tejido miocárdico.

Séptima:

En las muertes súbitas cardíacas de origen isquémico, existe una diferencia importante en el patrón de expresión génica entre aquellas muertes sin infarto agudo de miocardio (IAM), y las que tienen un IAM en evolución o establecido. En las primeras, hay alta expresión de MYL3 en sangre, y de TGFB1 en tejido miocárdico, ambas moléculas relacionadas con la fase aguda de la isquemia, mientras que en las segundas, hay una alta expresión en tejido miocárdico de MMP9 y de VEGFA, proteínas relacionadas con la reparación de la lesión isquémica. Estos patrones se corresponden con la fisiopatología de la fase de isquemia en que se encuentra cada grupo de causa de muerte.

Octava:

La cTnT_{hs} también tiene unos patrones determinados según la causa de la muerte. En sangre presenta unos mayores niveles en muertes en las que existe un daño miocárdico directo (politraumatismos y muertes súbitas cardíacas isquémicas), que en los grupos de asfixias y otras muertes naturales. En líquido pericárdico, este marcador bioquímico presenta unos valores significativamente menores en el grupo de otras muertes naturales, en comparación con los otros grupos de causas de muerte (muertes súbitas cardíacas isquémicas, politraumatismos y asfixias mecánicas).

Novena:

En los casos de muerte súbita cardíaca isquémica en los que no se ha detectado IAM, ni trombosis coronaria aguda, existe un perfil bioquímico y molecular caracterizado por niveles moderados-altos de cTnT_{hs} en líquido pericárdico, junto con una moderada-alta expresión de TNNI3, MYL3 y TGFB1 en este mismo fluido. En estos casos, los cuales, más problemas plantean al patólogo forense, existe un perfil de expresión génica propio de una isquemia de inicio, lo que implica que la muerte se ha producido en el contexto de la fase aguda de un proceso isquémico, secundario a la ruptura y/o trombosis de una placa de ateroma inestable.

Decima:

En los casos de muerte súbita cardíaca isquémica con trombosis coronaria aguda evidenciada, el perfil bioquímico y molecular en líquido pericárdico, está definido por unos valores altos y muy similares de cTnT_{hs}, y una baja expresión de MMP9 y VEGFA, perfil que también corresponde a una isquemia de fase aguda, en la que aún no se han puesto en marcha los mecanismos de reparación propios de este tipo de lesiones.

Undécima:

El estudio de los niveles de cTnT_{hs} en sangre y líquido pericárdico, y el conocimiento de cuál es el perfil molecular de los genes diana estudiados en ambos fluidos y en tejido miocárdico, ofrece al patólogo forense una información complementaria fundamental para establecer el diagnóstico de muerte súbita cardíaca de origen isquémico en aquellos casos en los que la muerte se produce muy cercana al inicio de los síntomas, en los que los métodos clásicos, macro y microscópicos, no aportan información en relación a la causa de la muerte.

VII. Bibliografía

1. Concheiro L, Suarez JM (2004) Muerte súbita en el adulto y muerte súbita infantil. En: Villanueva E (ed) Gisbert Calabuig. Medicina Legal y Toxicología, 6th edn. Masson, Barcelona, pp 225-241
2. Castellá J, Medallo J, Marrón T (2013) Medicolegal Considerations in Sudden Cardiac Death. *Rev Esp Cardiol Supl* 13:30-37
3. Oliva A, Brugada R, D'Aloja E, Boschi I, Partemi S, Brugada J, Pascali VL (2011) State of the art in forensic investigation of sudden cardiac death. *Am J Forensic Med Pathol* 32:1-16
4. Basso C, Burke M, Fornes P, Gallagher PJ, De Gouveia RH, Sheppard M, Thiene G, Van Der Wal A, Association for European Cardiovascular Pathology (2010) Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Pathologica* 102:391-404
5. De Asmundis C, Brugada P (2013) Epidemiology of Sudden Cardiac Death. *Rev Esp Cardiol Supl* 13:2-6
6. Brugada J (2013) Sudden Cardiac Death. The Need for a Comprehensive Disease Management Strategy. *Rev Esp Cardiol Supl* 13:1
7. Morentin B, Audicana C (2011) Population-Based Study of Out-of-Hospital Sudden Cardiovascular Death: Incidence and Causes of Death in Middle-Aged Adults. *Rev Esp Cardiol* 64:28-34
8. Carter-Monroe N, Virmani R (2011) Current Trends in the Classification of Sudden Cardiac Death Based on Autopsy Derived Data: A Review of Investigations Into the Etiology of Sudden Cardiac Death. *Rev Esp Cardiol* 64:10-12
9. Oliva A, Brugada R, D'Aloja E, Boschi I, Partemi S, Brugada J, Pascali VL (2011) State of the art in forensic investigation of sudden cardiac death. *Am J Forensic Med Pathol* 32:1-16
10. de la Grandmaison GL (2006) Is there progress in the autopsy diagnosis of sudden unexpected death in adults?. *Forensic Sci Int* 156:138-144
11. Virmani R, Burke AP, Farb A (2001) Sudden cardiac death. *Cardiovasc Pathol* 10:275-282
12. Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P, Camm AJ, Cappato R, Cobbe SM, Di Mario C, Maron BJ, McKenna WJ, Pedersen AK, Ravens U, Schwartz PJ, Trusz-Gluza M, Vardas P, Wellens HJ, Zipes DP (2001) Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 22:1374-1450

-
13. Marrugat J, Elousa R, Gil M (1999) Muerte súbita (I). Epidemiología de la muerte súbita cardiaca en España. *Rev Esp Cardiol* 52:717-725
 14. Rodriguez E, Viñolas X (1999) Muerte súbita (III) Causas de muerte súbita. Problemas a la hora de establecer y clasificar los tipos de muerte. *Rev Esp Cardiol* 52:1004-1014
 15. Bayes de Luna A, Elosua R (2012) Sudden death. *Rev Esp Cardiol* 65(10):1039-1052
 16. Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C, Evanado A, Kehr E, Al Samara M, Mariani R, Gunson K, Jui J (2008) Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Prog Cardiovasc Dis* 51:213-228
 17. Adabag AS, Luepker RV, Roger VL, Gersh BJ (2010) Sudden cardiac death: epidemiology and risk factors. *Nat Rev Cardiol* 7:216-225
 18. Gallagher PJ (2007) The pathological investigation of sudden cardiac death. *Curr Diagn Path* 13:366-374
 19. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM (2000) Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1262-1275
 20. Arimany J, Barbería E, Rodríguez JJ (2009) El nuevo certificado médico de defunción. *Rev Esp Med Legal* 35:36
 21. Ley Orgánica 15/2003 de 25 de noviembre, de modificación de Ley Orgánica del Código Penal. BOE 283, de 26 de noviembre de 2003
 22. Navarrete M (1976) Demostración post-mortem del infarto de miocardio reciente. Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla
 23. Lachica E, Villanueva E, Luna A (1988) Comparison of different techniques for the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Forensic Sci Int* 38:21-26
 24. Recommendation no. R (99) 3 of the Committee of Ministers to member states on the harmonization of medico-legal autopsy rules (2000). *Forensic Sci Int* 111:5-58
 25. Subirana MT, Juan-Babot JO, Puig T, Lucena J, Rico A, Salguero M, Borondo JC, Ordonez J, Arimany J, Vazquez R, Badimon L, Thiene G, de Luna AB (2011) Specific characteristics of sudden death in a mediterranean Spanish population. *Am J Cardiol* 107:622-627
 26. de la Grandmaison GL (2006) Is there progress in the autopsy diagnosis of sudden unexpected death in adults?. *Forensic Sci Int* 156:138-144

27. Morentin B, Suarez-Mier MP, Aguilera B (2003) Sudden unexplained death among persons 1-35 years old. *Forensic Sci Int* 135:213-217
28. Sarkozy A, Chierchia G, Rodríguez-Mañero M, Brugada P (2013) Sudden Cardiac Death and Structural Heart Disease. *Rev Esp Cardiol Supl* 13:7-13
29. Lopera G, Huikurib HV, Makikallio TH, Castellanos A, Myerburg RJ (2000) Ischemic Sudden Cardiac Death: Critical Analysis of Risk Markers. *Rev Esp Cardiol* 53:568-578
30. Myerburg RJ, Junttila MJ (2012) Sudden cardiac death caused by coronary heart disease. *Circulation* 125:1043-1052
31. Kong MH, Fonarow GC, Peterson ED, Curtis AB, Hernandez AF, Sanders GD, Thomas KL, Hayes DL, Al-Khatib SM (2011) Systematic review of the incidence of sudden cardiac death in the United States. *J Am Coll Cardiol* 57:794-801
32. Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C, Evanado A, Kehr E, Al Samara M, Mariani R, Gunson K, Jui J (2008) Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Prog Cardiovasc Dis* 51:213-228
33. Cygankeiwick I, Guindo J, Bertomeu A, Borondo JC, Joan O, Bayes-Genis A (2004) Pathological aspects of sudden death in Mediterranean area. *Ital Heart J* 5 Suppl 1:156-161
34. Campuzano O, Allengue C, Brugada R (2013) Genética de la muerte súbita inexplicada. *Med Clin* xx:xxx-xxx
35. Benito B (2013) Sudden Cardiac Death in Patients Without Structural Heart Disease. *Rev Esp Cardiol* 13:14-23
36. Tester DJ, Ackerman MJ (2006) The role of molecular autopsy in unexplained sudden cardiac death. *Curr Opin Cardiol* 21:166-172
37. Rodríguez-Calvo MS, Brion M, Allegue C, Concheiro L, Carracedo A (2008) Molecular genetics of sudden cardiac death. *Forensic Sci Int* 182:1-12
38. Morentin-Campillo B, Suarez-Mier MP, Aguilera-Tapia B (2013) Autopsia cardiaca en patología forense. *Rev Esp Med Legal* 39:106-111
39. Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo, por la que se aprueban las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (2010). BOE 122, de 19 de mayo de 2010

-
40. Sheppard M, Davies MJ (1998) Investigation of sudden cardiac death. En: Sheppard M, Davies MJ (eds) Practical cardiovascular pathology. Arnold, London, pp 191-204
 41. Davies MJ (1999) The investigation of sudden cardiac death. Histopathology 34:93-98
 42. Thiene G, Basso C, Corrado D (2001) Cardiovascular causes of sudden death. . In: Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ (eds) Cardiovascular pathology. Churchill Livingstone, Philadelphia, pp 326-375
 43. Basso C, Calabrese F, Corrado D, Thiene G (2001) Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings. Cardiovasc Res 50:290-300
 44. Sheppard MN (2012) Approach to the cardiac autopsy. J Clin Pathol 65:484-495
 45. Kitzman DW, Scholz DG, Hagen PT, Ilstrup DM, Edwards WD (1988) Age-related changes in normal human hearts during the first 10 decades of life. Part II (Maturity): A quantitative anatomic study of 765 specimens from subjects 20 to 99 years old. Mayo Clin Proc 63:137-146
 46. Scholz DG, Kitzman DW, Hagen PT, Ilstrup DM, Edwards WD (1988) Age-related changes in normal human hearts during the first 10 decades of life. Part I (Growth): A quantitative anatomic study of 200 specimens from subjects from birth to 19 years old. Mayo Clin Proc 63:126-136
 47. Carbonell A, Segura T, Zamorano JL (2013) Ischemic heart disease. Medicine 11: 2179-2187
 48. Bardaji A, Camprubi R, De Castro R, Merce J (2009) Cardiopatía isquémica. Concepto. Aspectos epidemiológicos. Medicine 10:2391-2398
 49. Salguero R, Sánchez I, Matía R, Sáenz C (2005) Cardiopatía isquémica. Concepto. Aspectos epidemiológicos. Etiopatogenia. Clasificación biológica y clínica. Implicaciones en la calidad de vida. Medicine 9:2571-2579
 50. Kinlay S, Libby P, Ganz P (2001) Endothelial function and coronary artery disease. Curr Opin Lipidol 12:383-389
 51. Garcia-Castrillo L (2002) Epidemiología del síndrome coronario agudo en los servicios de urgencias. Emergencias 14:69-74
 52. Martinez M (2006) Cardiac remodeling and inflammation. Arch Cardiol Méx v 76 supl 4 México oct /dic 2006 76 supl. 4:58-66

53. Frangogiannis NG (2012) Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 110:159-173
54. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML (2002) The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 53:31-47
55. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P (2004) Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 94:1543-1553
56. Bujak M, Frangogiannis NG (2007) The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 74:184-195
57. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S (2006) Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res* 69:604-613
58. Lindsey ML (2004) MMP induction and inhibition in myocardial infarction. *Heart Fail Rev* 9:7-19
59. Baxter GF (2004) Natriuretic peptides and myocardial ischaemia. *Basic Res Cardiol* 99:90-93
60. Bujak M, Frangogiannis NG (2007) The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 74:184-195
61. LaFramboise WA, Bombach KL, Dhir RJ, Muha N, Cullen RF, Pogoselski AR, Turk D, George JD, Guthrie RD, Magovern JA (2005) Molecular dynamics of the compensatory response to myocardial infarct. *J Mol Cell Cardiol* 38:103-117
62. Frangogiannis NG (2012) Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 110:159-173
63. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J (1999) The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 43:860-878
64. Jasra SK, Badian C, Macri I, Ra P (2012) Recognition of early myocardial infarction by immunohistochemical staining with cardiac troponin-I and complement C9. *J Forensic Sci* 57:1595-1600
65. Sun Y (2007) Oxidative stress and cardiac repair/remodeling following infarction. *Am J Med Sci* 334:197-205
66. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Qu Y, Gerling IC, Sun Y (2013) Modification of oxidative stress on gene expression profiling in the rat infarcted heart. *Mol Cell Biochem* 379:243-253

-
67. Carmeliet P, Collen D (2000) Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 902:249-62; discussion 262-4
68. Twerenbold R, Jaffe A, Reichlin T, Reiter M, Mueller C (2012) High-sensitive troponin T measurements: what do we gain and what are the challenges?. *Eur Heart J* 33:579-586
69. Eggers KM, Venge P, Lindahl B (2012) High-sensitive cardiac troponin T outperforms novel diagnostic biomarkers in patients with acute chest pain. *Clin Chim Acta* 413:1135-1140
70. Jaffe AS, Ordonez-Llanos J (2010) High sensitivity troponin in chest pain and acute coronary syndromes. A step forward?. *Rev Esp Cardiol* 63:763-769
71. Keller T, Zeller T, Peetz D, Tzikas S, Roth A, Czyz E, Bickel C, Baldus S, Warnholtz A, Frohlich M, Sinning CR, Eleftheriadis MS, Wild PS, Schnabel RB, Lubos E, Jachmann N, Genth-Zotz S, Post F, Nicaud V, Tiret L, Lackner KJ, Munzel TF, Blankenberg S (2009) Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 361:868-877
72. Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, Biedert S, Schaub N, Buergel C, Potocki M, Noveanu M, Breidthardt T, Twerenbold R, Winkler K, Bingisser R, Mueller C (2009) Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* 361:858-867
73. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Writing Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction (2012) Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 60
74. Thygesen K, Mair J, Katus H, Plebani M, Venge P, Collinson P, Lindahl B, Giannitsis E, Hasin Y, Galvani M, Tubaro M, Alpert JS, Biasucci LM, Koenig W, Mueller C, Huber K, Hamm C, Jaffe AS, Study Group on Biomarkers in Cardiology of the ESC Working Group on Acute Cardiac Care (2010) Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 31:2197-2204
75. Keller T, Zeller T, Peetz D, Tzikas S, Roth A, Czyz E, Bickel C, Baldus S, Warnholtz A, Frohlich M, Sinning CR, Eleftheriadis MS, Wild PS, Schnabel RB, Lubos E, Jachmann N, Genth-Zotz S, Post F, Nicaud V, Tiret L, Lackner KJ, Munzel TF, Blankenberg S (2009) Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 361:868-877
76. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction (2007) Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 28:2525-2538

77. Hallen J (2012) Troponin for the estimation of infarct size: what have we learned?. *Cardiology* 121:204-212
78. Tomaskova E, Vorel F (2010) Some possibilities in the diagnosis of early acute ischaemic changes in the heart muscle in sudden death. *Soud Lek* 55:32-35
79. Omland T (2012) Sensitive cardiac troponin assays: sense and sensibility. *Eur Heart J* 33:944-946
80. Aldous SJ, Richards M, Cullen L, Troughton R, Than M (2012) Diagnostic and prognostic utility of early measurement with high-sensitivity troponin T assay in patients presenting with chest pain. *CMAJ* 184:E260-8
81. Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, Jarausch J, Jaffe AS, Katus HA (2010) Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clin Chem* 56:254-261
82. Aldous SJ, Richards M, Cullen L, Troughton R, Than M (2012) Diagnostic and prognostic utility of early measurement with high-sensitivity troponin T assay in patients presenting with chest pain. *CMAJ* 184:E260-8
83. Morentin B, Suárez-Mier MP, Aguilera B (2001) Sudden Death due to Atheromatous Coronary Disease in the Young. *Rev Esp Cardiol* 54:1167-1174
84. Barrabés JA, Bodí V, Jiménez-Candil V, Fernández-Ortiz A (2011) Actualización en cardiopatía isquémica. *Rev Esp Cardiol* 64(Supl 1):50-58
85. Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P, Camm AJ, Cappato R, Cobbe SM, Di Mario C, Maron BJ, McKenna WJ, Pedersen AK, Ravens U, Schwartz PJ, Trusz-Gluza M, Vardas P, Wellens HJ, Zipes DP (2001) Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 22:1374-1450
86. Rodriguez-Sinovas A, Cinca J (1999) Muerte súbita (II). Isquemia miocárdica y arritmias ventriculares en modelos experimentales: mecanismos desencadenantes. *Rev Esp Cardiol* 52(10):851-859
87. Bunch TJ, Hohnloser SH, Gersh BJ (2007) Mechanisms of sudden cardiac death in myocardial infarction survivors: insights from the randomized trials of implantable cardioverter-defibrillators. *Circulation* 115:2451-2457
88. Ramos V, Valenzuela A, Villanueva E, Miranda MT (1997) Antioxidant-related enzymes in myocardial zones and human pericardial fluid in relation to the cause of death. *Int J Legal Med* 110:1-4
89. Chang JV, Luk A, Butany J (2012) Pathology of myocardial infarction. *Diagnostic Histopathology* 19:7-12

-
90. Blanco J, Garcia SA, Hinojal R (2004) Proteínas estructurales y mediadores de la inflamación: marcadores para el diagnóstico postmortem de la isquemia miocárdica (estudio inmunohistoquímico). *Cuad med forense* 35:51-70
91. Bi H, Yang Y, Huang J, Li Y, Ma C, Cong B (2013) Immunohistochemical detection of S100A1 in the postmortem diagnosis of acute myocardial infarction. *Diagn Pathol* 8:84-1596-8-84
92. Jasra SK, Badian C, Macri I, Ra P (2012) Recognition of early myocardial infarction by immunohistochemical staining with cardiac troponin-I and complement C9. *J Forensic Sci* 57:1595-1600
93. Jenkins CP, Cardona DM, Bowers JN, Oliai BR, Allan RW, Normann SJ (2010) The utility of C4d, C9, and troponin T immunohistochemistry in acute myocardial infarction. *Arch Pathol Lab Med* 134:256-263
94. Campobasso CP, Dell'Erba AS, Addante A, Zotti F, Marzullo A, Colonna MF (2008) Sudden cardiac death and myocardial ischemia indicators: a comparative study of four immunohistochemical markers. *Am J Forensic Med Pathol* 29:154-161
95. Martinez Diaz F, Rodriguez-Morlensin M, Perez-Carceles MD, Noguera J, Luna A, Osuna E (2005) Biochemical analysis and immunohistochemical determination of cardiac troponin for the postmortem diagnosis of myocardial damage. *Histol Histopathol* 20:475-481
96. Ortmann C, Pfeiffer H, Brinkmann B (2000) A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage. *Int J Legal Med* 113:215-220
97. White PD, Mallory GK, Salcedo-Salgar J (1936) The Speed of Healing of Myocardial Infarcts. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 52:97-104.1
98. Sauko P (1999) Diagnóstico de la lesión miocárdica precoz en la muerte súbita de origen cardíaco. *Revista Aragonesa de Medicina Legal* 1:23-33
99. Kakimoto Y, Tsuruyama T, Miyao M, Abiru H, Sumiyoshi S, Kotani H, Haga H, Tamaki K (2013) The effectiveness and limitations of triphenyltetrazolium chloride to detect acute myocardial infarction at forensic autopsy. *Am J Forensic Med Pathol* 34:242-247
100. Nachlas MM, Shnitha TK (1963) Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity. *Am J Pathol* 42:379-405
101. Ramkissoon RA (1966) Macroscopic identification of early myocardial infarction by dehydrogenase alterations. *J Clin Pathol* 19:479-481

102. Burns DK, Kumar V (1998) Corazon. En: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL Patología humana, 6 edn. McGraw-Hill Interamericana, Philadelphia, pp 337-371
103. Hougen HP, Valenzuela A, Lachica E, Villanueva E (1992) Sudden cardiac death: a comparative study of morphological, histochemical and biochemical methods. *Forensic Sci Int* 52:161-169
104. Ouyang J, Guzman M, Desoto-Lapaix F, Pincus MR, Wieczorek R (2009) Utility of desmin and a Masson's trichrome method to detect early acute myocardial infarction in autopsy tissues. *Int J Clin Exp Pathol* 3:98-105
105. Ribeiro-Silva A, S Martin CC, Rossi MA (2002) Is immunohistochemistry a useful tool in the postmortem recognition of myocardial hypoxia in human tissue with no morphological evidence of necrosis?. *Am J Forensic Med Pathol* 23:72-77
106. Luna A (2009) Is postmortem biochemistry really useful? Why is it not widely used in forensic pathology?. *Leg Med (Tokyo)* 11:S27-30
107. Zhu BL, Tanaka S, Ishikawa T, Zhao D, Li DR, Michiue T, Quan L, Maeda H (2008) Forensic pathological investigation of myocardial hypoxia-inducible factor-1 alpha, erythropoietin and vascular endothelial growth factor in cardiac death. *Leg Med (Tokyo)* 10:11-19
108. Hansen SH, Rossen K (1999) Evaluation of cardiac troponin I immunoreaction in autopsy hearts: a possible marker of early myocardial infarction. *Forensic Sci Int* 99:189-196
109. Ahmed HA, Yehia AM, Assaad GA, Tabak SA, Hassan HH (2011) Immunohistochemistry in the detection of early myocardial infarction. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 1:5-12
110. Piercecchi-Marti MD, Lepidi H, Leonetti G, Vire O, Cianfarani F, Pellissier JF (2001) Immunostaining by complement C9: a tool for early diagnosis of myocardial infarction and application in forensic medicine. *J Forensic Sci* 46:328-334
111. Nie R, Xie S, Du B, Liu X, Deng B, Wang J (2009) Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is increased in human left ventricle after acute myocardial infarction. *Arch Med Res* 40:605-611
112. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA (2000) Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342:626-633
113. Yuan XT, Peng X, Jin ZF (2012) Expression of FAPalpha and TGF-beta1 in sudden deaths due to acute myocardial ischemia. *Fa Yi Xue Za Zhi* 28:18-20

-
114. Luna A (1999) La utilidad de los marcadores bioquímicos en el diagnóstico post-mortem del infarto de miocardio y el sufrimiento agónico cardíaco. *Revista Aragonesa de Medicina Legal* 1:35-53
115. Palmiere C, Mangin P (2012) Postmortem chemistry update part I. *Int J Legal Med* 126:187-198
116. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Bessho Y, Kamikodai Y, Tsuda K, Okazaki S, Maeda H (2007) Postmortem cardiac troponin I and creatine kinase MB levels in the blood and pericardial fluid as markers of myocardial damage in medicolegal autopsy. *Leg Med (Tokyo)* 9:241-250
117. Kawamoto O, Michiue T, Ishikawa T, Maeda H (2013) Comprehensive evaluation of pericardial biochemical markers in death investigation. *Forensic Sci Int* 224:73-79
118. Sapouna R, Gourgiotis D, Athanaselis S, Papadodima S, Spiliopoulou C (2013) Diagnostic value of cardiac troponin I in postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Am J Forensic Med Pathol* 34:139-141
119. Batalis NI, Marcus BJ, Papadea CN, Collins KA (2010) The role of postmortem cardiac markers in the diagnosis of acute myocardial infarction. *J Forensic Sci* 55:1088-1091
120. Davies SJ, Gaze DC, Collinson PO (2005) Investigation of cardiac troponins in postmortem subjects: comparing antemortem and postmortem levels. *Am J Forensic Med Pathol* 26:213-215
121. Khalifa AB, Najjar M, Addad F, Turki E, Mghirbi T (2006) Cardiac troponin T (cTn T) and the postmortem diagnosis of sudden death. *Am J Forensic Med Pathol* 27:175-177
122. Uemura K, Shintani-Ishida K, Saka K, Nakajima M, Ikegaya H, Kikuchi Y, Yoshida K (2008) Biochemical blood markers and sampling sites in forensic autopsy. *J Forensic Leg Med* 15:312-317
123. Luna A, Villanueva E, Castellano M, Jimenez G (1982) The determination of Ck, LDH and its isoenzymes in pericardial fluid and its application to the post-mortem diagnosis of myocardial infarction. *Forensic Sci Int* 19:85-91
124. Osuna E, Perez Carceles MD, Jakobsson SW, Luna A (1990) Biochemical and morphological markers in the post mortem diagnosis of ischemic heart distress. *Acta Med Leg Soc (Liege)* 40:275-283
125. Osuna E, Perez-Carceles MD, Vieira DN, Luna A (1998) Distribution of biochemical markers in biologic fluids: application to the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Am J Forensic Med Pathol* 19:123-128

126. Perez-Carceles MD, Osuna E, Vieira DN, Luna A (1995) Usefulness of myosin in the postmortem diagnosis of myocardial damage. *Int J Legal Med* 108:14-18
127. Osuna E, Perez-Carceles MD, Alvarez MV, Noguera J, Luna A (1998) Cardiac troponin I (cTn I) and the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Int J Legal Med* 111:173-176
128. Navarro E, Bañon R, Giner S, Devesa MA, Cardona B (2007) Utilidad de la determinación de la fracción I de la Troponina cardiaca (cTnI), en el diagnóstico de la muerte súbita de origen cardiaco en autopsias forenses. *Cuad Med forense* 13:131-142
129. Hougen HP, Valenzuela A, Lachica E, Villanueva E (1992) Sudden cardiac death: a comparative study of morphological, histochemical and biochemical methods. *Forensic Sci Int* 52:161-169
130. Wang Q, Michiue T, Ishikawa T, Zhu BL, Maeda H (2011) Combined analyses of creatine kinase MB, cardiac troponin I and myoglobin in pericardial and cerebrospinal fluids to investigate myocardial and skeletal muscle injury in medicolegal autopsy cases. *Leg Med (Tokyo)* 13:226-232
131. Perez-Carceles MD, Noguera J, Jimenez JL, Martinez P, Luna A, Osuna E (2004) Diagnostic efficacy of biochemical markers in diagnosis post-mortem of ischaemic heart disease. *Forensic Sci Int* 142:1-7
132. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Oritani S, Kamikodai Y, Tsuda K, Okazaki S, Maeda H (2006) Postmortem cardiac troponin T levels in the blood and pericardial fluid. Part 1. Analysis with special regard to traumatic causes of death. *Leg Med (Tokyo)* 8:86-93
133. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Kamikodai Y, Tsuda K, Okazaki S, Maeda H (2006) Postmortem cardiac troponin T levels in the blood and pericardial fluid. Part 2: analysis for application in the diagnosis of sudden cardiac death with regard to pathology. *Leg Med (Tokyo)* 8:94-101
134. Osuna E, Perez-Carceles MD, Alvarez MV, Noguera J, Luna A (1998) Cardiac troponin I (cTn I) and the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Int J Legal Med* 111:173-176
135. Ellingsen CL, Hetland O (2004) Serum concentrations of cardiac troponin T in sudden death. *Am J Forensic Med Pathol* 25:213-215
136. Palmiere C, Mangin P (2012) Postmortem chemistry update part II. *Int J Legal Med* 126:199-215

-
137. Vargas SO, Grudzien C, Tanasijevic MJ (2008) Postmortem cardiac troponin-I levels predict intramyocardial damage at autopsy. *J Thromb Thrombolysis* 26:132-137
138. Domenech P, Carbonell L, Perez Carceles MD, Falcon M, Luna A, Osuna E (2004) Application of postmortem lipid peroxidation in heart tissue to the diagnosis of myocardial damage. *Int J Legal Med* 118:19-23
139. Lachica E, Villanueva E, Luna A (1988) Regional study of free fatty acids and free carnitine behavior in cardiac tissue in relation to different causes of death. *J Forensic Sci* 33:1483-1490
140. Valenzuela A, Hougen HP, Villanueva E (1994) Lipoproteins and apolipoproteins in pericardial fluid: new postmortem markers for coronary atherosclerosis. *Forensic Sci Int* 66:81-88
141. Rautureau Y, Baxter GF (2004) Acute actions of natriuretic peptides in coronary vasculature and ischaemic myocardium. *Curr Pharm Des* 10:2477-2482
142. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Tanaka S, Kamikodai Y, Tsuda K, Okazaki S, Maeda H (2007) Postmortem pericardial natriuretic peptides as markers of cardiac function in medico-legal autopsies. *Int J Legal Med* 121:28-35
143. Chen JH, Michiue T, Ishikawa T, Maeda H (2012) Pathophysiology of sudden cardiac death as demonstrated by molecular pathology of natriuretic peptides in the myocardium. *Forensic Sci Int* 223:342-348
144. Bauer M (2007) RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* 1:69-74
145. Vennemann M, Koppelkamm A (2010) mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic Sci Int* 203:71-75
146. Courts C, Madea B (2010) Micro-RNA - A potential for forensic science?. *Forensic Sci Int* 203:106-111
147. Heinrich M, Lutz-Bonengel S, Matt K, Schmidt U (2007) Real-time PCR detection of five different "endogenous control gene" transcripts in forensic autopsy material. *Forensic Sci Int Genet* 1:163-169
148. Koppelkamm A, Vennemann B, Fracasso T, Lutz-Bonengel S, Schmidt U, Heinrich M (2010) Validation of adequate endogenous reference genes for the normalisation of qPCR gene expression data in human post mortem tissue. *Int J Legal Med* 124:371-380
149. Heinrich M, Matt K, Lutz-Bonengel S, Schmidt U (2007) Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. *Int J Legal Med* 121:136-142

150. Koppelkamm A, Vennemann B, Lutz-Bonengel S, Fracasso T, Vennemann M (2011) RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int J Legal Med* 125:573-580
151. Liu J, Lewohl JM, Dodd PR, Randall PK, Harris RA, Mayfield RD (2004) Gene expression profiling of individual cases reveals consistent transcriptional changes in alcoholic human brain. *J Neurochem* 90:1050-1058
152. Preece P, Cairns NJ (2003) Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Brain Res Mol Brain Res* 118:60-71
153. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA (2000) Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342:626-633
154. Partemi S, Berne PM, Batlle M, Berruezo A, Mont L, Riuro H, Ortiz JT, Roig E, Pascali VL, Brugada R, Brugada J, Oliva A (2010) Analysis of mRNA from human heart tissue and putative applications in forensic molecular pathology. *Forensic Sci Int* 203:99-105
155. Fordyce SL, Kampmann ML, van Doorn NL, Gilbert MT (2013) Long-term RNA persistence in postmortem contexts. *Investig Genet* 4:7-2223-4-7
156. Lee J, Hever A, Willhite D, Zlotnik A, Hevezi P (2005) Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues. *FASEB J* 19:1356-1358
157. Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 27:126-139
158. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 33:e56
159. Vennemann M, Koppelkamm A (2010) Postmortem mRNA profiling II: Practical considerations. *Forensic Sci Int* 203:76-82
160. Manchester KL (1996) Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *BioTechniques* 20:968-970
161. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22:474-6, 478-81

-
162. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3
163. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28:1601-1613
164. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611-622
165. Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R, Ilsley D (2000) A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* 21:128-134
166. Stan AD, Ghose S, Gao XM, Roberts RC, Lewis-Amezcuca K, Hatanpaa KJ, Tamminga CA (2006) Human postmortem tissue: what quality markers matter?. *Brain Res* 1123:1-11
167. Weis S, Llenos IC, Dulay JR, Elashoff M, Martinez-Murillo F, Miller CL (2007) Quality control for microarray analysis of human brain samples: The impact of postmortem factors, RNA characteristics, and histopathology. *J Neurosci Methods* 165:198-209
168. Tomita H, Vawter MP, Walsh DM, Evans SJ, Choudary PV, Li J, Overman KM, Atz ME, Myers RM, Jones EG, Watson SJ, Akil H, Bunney WE, Jr (2004) Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol Psychiatry* 55:346-352
169. Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1:1559-1582
170. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
171. Moreno LI, Tate CM, Knott EL, McDaniel JE, Rogers SS, Koons BW, Kavlick MF, Craig RL, Robertson JM (2012) Determination of an effective housekeeping gene for the quantification of mRNA for forensic applications. *J Forensic Sci* 57:1051-1058
172. Sun JH, Nan LH, Gao CR, Wang YY (2012) Validation of reference genes for estimating wound age in contused rat skeletal muscle by quantitative real-time PCR. *Int J Legal Med* 126:113-120

173. Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-193
174. Xu X, Li J, Simons M, Li J, Laham RJ, Sellke FW (2001) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors is increased, but microvascular relaxation is impaired in patients after acute myocardial ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121:735-742
175. Zhao D, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Li DR, Maeda H (2006) Real-time RT-PCR quantitative assays and postmortem degradation profiles of erythropoietin, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 alpha mRNA transcripts in forensic autopsy materials. *Leg Med (Tokyo)* 8:132-136
176. Zhao D, Zhu BL, Ishikawa T, Li DR, Michiue T, Maeda H (2006) Quantitative RT-PCR assays of hypoxia-inducible factor-1alpha, erythropoietin and vascular endothelial growth factor mRNA transcripts in the kidneys with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med (Tokyo)* 8:258-263
177. Xiao H, Chen Z, Liao Y, Cheng X, Liu K, Wang Y, Wang M, Guo H (2008) Positive correlation of tumor necrosis factor-alpha early expression in myocardium and ventricular arrhythmias in rats with acute myocardial infarction. *Arch Med Res* 39:285-291
178. Akatsu T, Nakamura M, Satoh M, Hiramori K (2003) Increased mRNA expression of tumour necrosis factor-alpha and its converting enzyme in circulating leucocytes of patients with acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 105:39-44
179. Kempf K, Haltern G, Futh R, Herder C, Muller-Scholze S, Gulker H, Martin S (2006) Increased TNF-alpha and decreased TGF-beta expression in peripheral blood leukocytes after acute myocardial infarction. *Horm Metab Res* 38:346-351
180. Dabek J, Mazurek U, Gasior Z, Wilczok T, Kulach A, Kucia-Kuzma S (2006) Transcriptional activity of genes encoding Transforming Growth Factor beta and its receptors in peripheral blood mononuclear cells from patients with acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 111:275-279
181. Hunkeler NM, Kullman J, Murphy AM (1991) Troponin I isoform expression in human heart. *Circ Res* 69:1409-1414
182. Gassenmaier T, Buchner S, Birner C, Jungbauer CG, Resch M, Debl K, Endemann DH, Riegger GA, Lehn P, Schmitz G, Luchner A (2012) High-sensitive Troponin I in acute cardiac conditions: implications of baseline and sequential measurements for diagnosis of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 222:116-122

-
183. Barton PJ, Buckingham ME (1985) The myosin alkali light chain proteins and their genes. *Biochem J* 231:249-261
184. Barton PJ, Moscoso G, Thompson RP (1991) Detection of myosin gene expression in the developing heart using probes derived by polymerase chain reaction. *Int J Cardiol* 30:116-118
185. Barton PJ, Robert B, Cohen A, Garner I, Sassoon D, Weydert A, Buckingham ME (1988) Structure and sequence of the myosin alkali light chain gene expressed in adult cardiac atria and fetal striated muscle. *J Biol Chem* 263:12669-12676
186. Barton PJ, Robert B, Fiszman MY, Leader DP, Buckingham ME (1985) The same myosin alkali light chain gene is expressed in adult cardiac atria and in fetal skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 6:461-475
187. Zhang SZ, Xu Y, Xie HQ, Li XQ, Wei YQ, Yang ZM (2009) The possible role of myosin light chain in myoblast proliferation. *Biol Res* 42:121-132
188. Peterson JT, Li H, Dillon L, Bryant JW (2000) Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc Res* 46:307-315
189. Davis GK, Labugger R, Van Eyk JE, Apple FS (2001) Cardiac troponin T is not detected in Western blots of diseased renal tissue. *Clin Chem* 47:782-783
190. Ricchiuti V, Voss EM, Ney A, Odland M, Anderson PA, Apple FS (1998) Cardiac troponin T isoforms expressed in renal diseased skeletal muscle will not cause false-positive results by the second generation cardiac troponin T assay by Boehringer Mannheim. *Clin Chem* 44:1919-1924
191. Barton AJ, Pearson RC, Najlerahim A, Harrison PJ (1993) Pre- and postmortem influences on brain RNA. *J Neurochem* 61:1-11
192. Sampaio-Silva F, Magalhaes T, Carvalho F, Dinis-Oliveira RJ, Silvestre R (2013) Profiling of RNA degradation for estimation of post mortem interval. *PLoS One* 8:e56507
193. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034
194. Bar M, Bar D, Lehmann B (2009) Selection and validation of candidate housekeeping genes for studies of human keratinocytes--review and recommendations. *J Invest Dermatol* 129:535-537

195. Reimer KA, Richard VJ, Murry CE, Ideker RE (1991) Myocardial ischemia and infarction: anatomic and biochemical substrates for ischemic cell death and ventricular arrhythmias. En: Virmani R, Atkinson JB, Fenoglio JJ *Cardiovascular Pathology*, 1ª edn. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp 61-85
196. Camps FE, Robinson AE, Lucas BGB (1976) *Gradwohl's Legal Medicine*. John Wright and Sons Ltd, Bristol
197. He K, Lu JP, Zhu XJ, Wang ZY (2006) Research evolvement of postmortem diagnosis of early myocardial infarction in forensic pathology. *Fa Yi Xue Za Zhi* 22:381-384
198. Mao RM, Zheng QQ, Li XL, Xiong CY, Zhu BL (2009) The application of biochemical indexes detecting in sudden cardiac death in forensic autopsy. *Fa Yi Xue Za Zhi* 25:451-454
199. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S (2006) Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res* 69:604-613
200. Mair J (1997) Cardiac troponin I and troponin T: are enzymes still relevant as cardiac markers?. *Clin Chim Acta* 257:99-115

