

Artículo original

El grosor y una expresión de miARN alterada en la grasa epicárdica se asocian con enfermedad coronaria en víctimas de muerte súbita



Josep Marí-Alexandre^{a,◇}, Moises Barceló-Molina^{a,◇}, Jorge Sanz-Sánchez^b, Pilar Molina^{a,c}, Jennifer Sancho^{a,c}, Yolanda Abellán^{a,c}, María Luisa Santaolaría-Ayora^d, Juan Giner^{a,c}, Luis Martínez-Dolz^b, Amparo Estelles^a, Aitana Braza-Boils^{a,*} y Esther Zorio^{a,b,*}

^a Unidad de Cardiopatías Familiares, Muerte Súbita y Mecanismos de Enfermedad (CaFaMuSMe), Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España

^b Servicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

^c Servicio de Patología, Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Valencia, España

^d Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, España

Historia del artículo:

Recibido el 7 de septiembre de 2017

Aceptado el 4 de diciembre de 2017

On-line el 18 de mayo de 2018

Palabras clave:

Grasa epicárdica

MicroARN

Enfermedad coronaria

Muerte súbita

RESUMEN

Introducción y objetivos: El aumento de la grasa epicárdica (GE) es un nuevo factor de riesgo de enfermedad coronaria (EC). El estudio se propone profundizar en el papel de la GE como marcador de EC centrándose en su espesor, el perfil de expresión de los microARN (miARN) y los factores que podrían influir en ello.

Métodos: Se recogieron prospectivamente 155 autopsias de víctimas de muerte súbita cardiaca por EC y 84 de controles con muerte súbita no debida a EC. En un subgrupo se analizaron el espesor de la GE y su patrón de expresión de miARN.

Resultados: El grosor de GE estaba incrementado y brindaba buena precisión para discriminar a los pacientes (entre otras mediciones, área bajo la curva de la puntuación de GE, 0,718; $p < 0,001$). La GE de los pacientes presentó 14 miARN suprarregulados y 14 infrarregulados, y se validaron por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real miR-34a-3p, -34a-5p, -124-3p, -125a-5p, 628-5p, -1303 y -4286. Las proporciones de miR-34a-3p y -34a-5p en la GE de los pacientes fueron mayores que en los controles (con progresión entre la GE de coronarias sin estenosis, con estenosis estables y con placas complicadas) y solo se correlacionaron con la edad en los controles. La discreta correlación del miR-34a-5p en el hígado y la GE de los pacientes ($r = 0,295$; $p = 0,020$) aumentó llamativamente al considerar exclusivamente la GE de placas complicadas ($r = 0,799$; $p = 0,017$). Se observaron correlaciones similares con la proteína C reactiva ultrasensible y el miR-34a-5p en las muestras de GE e hígado.

Conclusiones: El patrón de expresión de miARN en la GE de la EC típicamente muestra un aumento de miR-34a-3p y -34a-5p que es independiente de la edad, el grosor de la GE, las mediciones antropométricas y la presencia de lesiones coronarias subyacentes.

© 2018 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Thickness and an Altered miRNA Expression in the Epicardial Adipose Tissue Is Associated With Coronary Heart Disease in Sudden Death Victims

ABSTRACT

Introduction and objectives: An increased epicardial adipose tissue (EAT) thickness has become a new risk factor for coronary heart disease (CHD). We aimed to study the role of EAT dysfunction as a CHD marker by focusing on its thickness and microRNA (miRNA) expression profile, and the potential factors possibly influencing them.

Methods: One hundred and fifty-five CHD sudden cardiac death victims and 84 non-CHD-sudden death controls were prospectively enrolled at autopsy. A representative subset underwent EAT thickness measurements and EAT miRNA expression profiling.

Results: Epicardial adipose tissue thickness was increased and allowed an accurate diagnosis of patient status (among other measurements, EAT score area under the curve 0.718, $P < .001$). Epicardial adipose tissue from patients showed 14 up- and 14 down-regulated miRNAs and miR-34a-3p, -34a-5p, -124-3p, -125a-5p, 628-5p, -1303 and -4286 were validated by quantitative real-time polymerase chain reaction. Patients exhibited higher EAT levels of miR-34a-3p and -34a-5p than controls (with a positive trend considering EAT from coronaries without stenosis, with stable stenosis and complicated plaques) and

Keywords:

Epicardial fat

MicroRNA

Coronary heart disease

Sudden death

* Autor para correspondencia: Servicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Avda. Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, España.

Correos electrónicos: zorio_est@gva.es (E. Zorio), aitana_braza@iislafe.es (A. Braza-Boils).

◇ Ambos autores han contribuido por igual a este trabajo como primeros autores.

correlated with age only in controls. The mild positive correlation between liver and EAT miR-34a-5p levels in patients ($r = 0.295$, $P = .020$) dramatically increased in EAT from complicated plaques ($r = 0.799$, $P = .017$). Similar correlations were observed for high-sensitivity-C-reactive protein levels and miR-34a-5p levels both in EAT and liver extracts.

Conclusions: Increased age-independent levels of miR-34a-3p and -34a-5p characterize the EAT miRNA expression profile of CHD regardless of EAT thickness, anthropometric parameters, and the presence of underlying atherosclerotic plaques.

Full English text available from: www.revespcardiol.org/en

© 2018 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

EC: enfermedad coronaria
 EHGNA: enfermedad de hígado graso no alcohólico
 GE: grasa epicárdica
 miARN: micro-ARN
 MS: muerte súbita
 MSC: muerte súbita cardíaca

INTRODUCCIÓN

La muerte súbita cardíaca (MSC) es la principal causa de muerte súbita no traumática inesperada en los adultos de los países occidentales. Con frecuencia es la primera manifestación de la enfermedad cardiovascular¹, con una incidencia estimada de 1,40-6,68/100.000 habitantes/año¹. La enfermedad coronaria (EC) es la causa de mayor prevalencia en los países industrializados, y supone del 60 al 80% del total de casos de MSC^{2,3}.

Recientemente se ha propuesto el empleo del grosor de la grasa epicárdica (GE) como nuevo factor de riesgo cardiovascular⁴⁻⁶. Se considera que se trata de grasa parda/beis y muestra una especial actividad transcriptómica, que incluye la expresión de adipocinas proinflamatorias y antifibrinolíticas⁷⁻¹⁰. Está situada entre el miocardio y el pericardio visceral, y se concentra principalmente a lo largo de las principales arterias coronarias. Así pues, su estrecha relación espacial con estas estructuras es el fundamento que permite sospechar que, por vía paracrina o vasocrina, la GE podría fomentar la EC y posiblemente su desestabilización¹¹.

Otras grasas ectópicas, como las asociadas con la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), se han asociado también con factores de riesgo cardiovascular, EC y eventos cardiovasculares¹²⁻¹⁵. Es de destacar que la EHGNA se ha asociado con el grosor de la GE^{16,17} y la EC¹⁷, pero es poco lo que se sabe acerca de los mecanismos subyacentes, que continúan siendo independientes de los factores de riesgo cardiovascular, incluido el síndrome metabólico¹⁷.

Los micro-ARN (miARN) son pequeños ARN sin función de codificación de proteínas que se expresan ampliamente en tejidos sanos y enfermos. Pueden desempeñar un papel clave como efectores de vías desreguladas (que pueden ser dianas terapéuticas) y también como biomarcadores útiles. Algunos de ellos se han relacionado con la dislipemia^{18,19}, la adipogénesis^{20,21}, la EHGNA (en especial el miR-34a^{22,23}) y una amplia variedad de trastornos cardíacos²⁴. Recientemente, en 2 artículos se ha descrito una firma proinflamatoria de miARN que afecta a la vía de señalización de la insulina en la GE de pacientes con EC^{25,26}. Aunque presentaron datos de gran valor y muy novedosos, hay determinados aspectos que continúan inexplorados. Uno de ellos

es la variabilidad de la expresión del miARN de la GE en función de la presencia y la estabilidad de las placas ateroscleróticas. Otro ejemplo es la posibilidad de que el aumento del grosor de la GE pueda explicar el aumento de los miARN en los pacientes con EC. Este estudio tiene como objetivo responder a estas incógnitas para caracterizar mejor la distribución y el espesor de la GE y su perfil de expresión de miARN como marcador de la EC en las víctimas de MSC. Primero, formaron el grupo no solo pacientes con lesiones coronarias estables, sino también pacientes con lesiones inestables. Segundo, además de los análisis de los miARN, se realizaron mediciones sistemáticas de la GE para determinar su correlación con la EC y la cantidad de miARN. Tercero, se estudiaron los perfiles de expresión de miARN de la GE en función de la presencia o ausencia de una estenosis subyacente significativa. Cuarto, se estudió la relación entre el miR-34a-5p de la GE y el hígado. Por último, el tamaño muestral de este estudio fue como mínimo del doble de pacientes que el de los estudios previos^{25,26}.

MÉTODOS

Grupos clínicos

Entre 2008 y 2013 se incluyeron prospectivamente 155 casos de MSC debida a EC (MSC-EC, pacientes) y 84 de muerte súbita (MS) inesperada no debida a una EC (MS-no-EC, controles) con pruebas de toxicología negativas. La definición de la MS se atuvo a lo establecido en las recomendaciones internacionales¹. En las autopsias de MSC por EC, se identificó como mínimo 1 estenosis coronaria significativa ($> 75\%$) o placas complicadas (con erosión, rotura, trombosis o hemorragia intraplaca) o signos histológicos agudos o ya cicatrizados de infartos de miocardio²⁷. Los controles con MS-no-EC fueron 38 casos de MS no cardíaca y 46 de MSC no isquémica (miocarditis y miocardiopatías primarias). La información clínica *premortem*, las circunstancias de la muerte, los datos de la autopsia como el índice de masa corporal, el perímetro abdominal, exploración cardíaca y hepática y los análisis toxicológicos ordinarios se atuvieron a lo establecido en la vigente guía²⁷.

El protocolo del estudio cumplió las normas éticas de la Declaración de Helsinki de 1975 y fue aprobado por el comité de investigación humana del centro. Los pacientes y los controles habían fallecido en el momento de la inclusión en el estudio y todas las muestras biológicas analizadas se habían obtenido en la autopsia forense exigida por la legislación española en casos de MS inesperada fuera del hospital. Por consiguiente, no se obtuvo un consentimiento informado por escrito.

Parámetros analíticos

Siempre que fue posible, se determinaron los parámetros analíticos en sangre periférica obtenida *post mortem*. Las

Tabla 1
Parámetros generales de los pacientes con MSC-EC frente a los controles con MS-no-EC

	Pacientes con MSC-EC (n = 155)	Controles con MS-no-EC (n = 84)	p, p ^a
Tiempo post mortem (h)	22,9 ± 12,2 (n = 155)	24,0 ± 9,7 (n = 84)	0,649
Arterias coronarias con estenosis significativa			
0 vasos	1%	—	—
1 vaso	26%		
2 vasos	33%		
3 vasos	40%		
	(n = 119)		
Placa complicada ^b	34% (n = 119)	—	—
Edad (años)	48,2 ± 7,2 (n = 155)	38,6 ± 11,5 (n = 84)	< 0,001, < 0,001
Varones	137 (88%) (N = 155)	58 (69%) (N = 84)	< 0,001, 0,005
IMC	28,7 ± 5,4	26,5 ± 4,7	0,003
> 30	52/143 (36,0) (n = 139)	13/73 (18,0) (n = 72)	0,005
PA (cm)	98,3 ± 14,3 (n = 144)	90,4 ± 11,9 (n = 71)	< 0,001, 0,008
Grosor de GE (mm) en			
Pared anterior del VD	3,0 [2,0-5,0]	2,0 [1,0-4,0]	0,013
Pared lateral del VD	5,0 [4,0-8,0]	4,0 (3,0-6,0)	0,013
Pared posterior del VD	0,0 [0,0-2,0]	0,0 [0,0-2,0]	0,842
Pared anterior del VI	2,00 [0,00-3,25]	1,00 [0,00-2,5]	0,003
Pared lateral del VI	1,0 [0,0-2,0]	0,0 [0,0-1,0]	0,070
Pared posterior VI	0,0 [0,0-2,0]	0,0 [0,0-2,0]	0,824
Surco AV derecho	15,0 [10,3-20,0]	12,0 [2,0-15,0]	< 0,001
Surco AV izquierdo	11,9 ± 4,8	9,7 ± 5,8	0,006, 0,004
Surco IV anterior	9,9 ± 4,4 (n = 130)	7,3 ± 4,5 (n = 73)	< 0,001, 0,026
Score de GE (mm)	53,0 ± 18,2 (n = 130)	39,6 ± 16,1 (n = 73)	< 0,001
Parámetros plasmáticos			
Colesterol total (mg/dl)	196,2 ± 55,7	164,6 ± 53,9	0,004
cLDL (mg/dl)	98,4 ± 47,1	80,5 ± 52,1	0,181
cVLDL (mg/dl)	82,9 ± 37,4	71,4 ± 22,1	0,088
cHDL (mg/dl)	36,7 ± 12,3	38,9 ± 12,8	0,347
Triglicéridos (mg/dl)	418,6 ± 188,5	357,8 ± 110,5	0,075
Lipoproteína(a) (mg/dl)	22,9 [6,7-50,4]	10,2 [4,3-36,9]	0,216
Lipoproteína(a) > 30 mg/dl	51/125 (40,8)	12/34 (35,3)	0,561
PCRas (U/l)	3,51 [1,5-8,0] (n = 125)	1,55 [0,49-3,63] (n = 34)	0,002

AV: auriculoventricular; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; EC: enfermedad coronaria; GE: grasa epicárdica; IMC: índice de masa corporal; IV: interventricular; MS: muerte súbita; MSC: muerte súbita cardíaca; PA: perímetro abdominal; PCRas: proteína C reactiva de alta sensibilidad; puntuación de GE: suma total de las mediciones del grosor de la grasa epicárdica de cada individuo; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo. Salvo otra indicación, los valores expresan media ± desviación estándar, mediana [intervalo intercuartílico] o n/N (%).

^a Modelo de regresión (método anterógrado condicional) que incluye las variables edad, sexo, IMC, perímetro abdominal, surco AV derecho, pared anterior del VD, pared lateral del VD, surco AV izquierdo, pared anterior del VI, tabique IV a lo largo de la arteria coronaria descendente anterior, puntuación de GE, colesterol total y PCRas.

^b Las placas complicadas incluían las placas ateroscleróticas con rotura, erosión, trombosis o hemorragia intraplaca.

concentraciones de colesterol total, triglicéridos y GGT se determinaron con métodos enzimáticos y el colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad, con métodos directos (Architect 16000, Abbott Diagnostic). Cuando los triglicéridos eran < 300 mg/dl, el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad se calculó con la fórmula de Friedewald. El colesterol unido a lipoproteínas de

muy baja densidad se obtuvo a partir de triglicéridos / 5. Los valores de lipoproteína(a) y apolipoproteínas A y B se determinaron por nefelometría cinética (Image Nephelometer, Beckman Coulter Inc.; Brea, California, Estados Unidos) y la proteína C reactiva de alta sensibilidad se determinó con métodos de turbidimetría cinética (Image Nephelometer).

Grosor de la grasa epicárdica

Durante el examen macroscópico del corazón, se realizaron cortes transversales cada 0,5 cm, empezando en el ápex cardiaco, siempre en paralelo a los surcos auriculoventriculares, con objeto de registrar el grosor máximo de la GE en cada lugar (figura 1 del material suplementario). Se designó como puntuación de GE la suma total de los grosores de la GE de cada individuo, y se consideró que ello constituía una estimación de la cantidad total de GE presente en el corazón.

Obtención de muestras de tejido para los análisis de miARN

Se obtuvieron muestras de GE de los pacientes, principalmente de las arterias coronarias con una estenosis significativa, algunas de la proximidad de placas complicadas y algunas de arterias coronarias sin estenosis, mientras que las muestras de GE de los controles procedieron siempre de arterias coronarias sin estenosis. Las muestras se lavaron de inmediato con solución salina tamponada con fosfato fría, con objeto de eliminar la contaminación de sangre, y se conservaron luego en ARN (Ambion; Austin, Texas, Estados Unidos) a -20 °C hasta el momento de su estudio. Se obtuvieron muestras de hígado en fresco y se procesaron según lo descrito anteriormente¹⁵.

Extracción del ARN

Se extrajo el ARN total de la GE con el kit de aislamiento de miARN mirVana-Paris (Ambion), según el protocolo del fabricante. La concentración de ARN y su pureza se determinaron con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies; Wilmington, Delaware, Estados Unidos). La calidad del ARN para los arrays de expresión de miARN se evaluó con el Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies; Santa Clara, California, Estados Unidos).

Perfiles de expresión de miARN

El ARN para los análisis de *microarray* incluyó 3 muestras de GE de los controles (concretamente, 1 muestra de la GE próxima a la arteria descendente anterior izquierda sana de cada control) y

3 muestras de GE de los pacientes (de arterias coronarias con una estenosis estable significativa, en concreto 2 de la arteria descendente anterior izquierda y 1 de la arteria coronaria derecha). Los análisis se realizaron en el Servicio de Array del centro (Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España) con el Array GeneChip miRNA 3.0 (Affymetrix; Santa Clara, California, Estados Unidos), que contiene sondas de 1.733 miARN humanos maduros (miRBase versión 17).

Los datos se analizaron con el software PARTEK Genomic Suite (PARTEK; St. Louis, Missouri, Estados Unidos) y se normalizó mediante un algoritmo Robust Multiarray Analysis. Se obtuvo una lista de los miARN con diferencias significativas (cambio de $\pm 1,5$ veces; $p < 0,05$) entre los pacientes y los controles. Las herramientas bioinformáticas (mirbase.org, microrna.org, targetscan.org y herramientas Diana) permitieron elegir 7 miARN de entre los que tenían una expresión diferente, cuyas dianas intervenían en la aterosclerosis, el metabolismo lipídico o la fisiopatología adipocitaria: miR-34a-3p, -34a-5p, -124-3p, -125a-5p, -628-5p, -1303 y -4286.

Cuantificación del miARN mediante reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real en muestras de grasa epicárdica y hepática

Los miARN seleccionados se validaron en 28 muestras de GE de 28 controles y en 186 muestras de GE de 99 pacientes (se obtuvo 1 muestra de GE procedente de una arteria coronaria con estenosis estable significativa en 78 pacientes, 1 muestra de GE procedente de una placa complicada en los 21 pacientes restantes y, por último, 1 muestra de GE de una arteria coronaria sin placas de aterosclerosis en 87 de los pacientes anteriormente mencionados). Dado que las cantidades de ARN pequeño nuclear RNU6B fueron muy variables en el presente análisis de reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real, se eligió en su lugar el miARN-363-3p como control endógeno, con una expresión estable en los arrays y en las cuantificaciones mediante reacción en cadena de polimerasa en tiempo real. Se cuantificó el miR-34a-5p hepático en muestras de hígado procedentes de 23 controles y 62 pacientes de los que se habían obtenido también muestras de GE emparejadas (se obtuvo 1 muestra de GE procedente de una arteria coronaria sin estenosis significativa de cada uno de los 23 controles, 1 muestra de GE procedente de una arteria coronaria

Tabla 2

Correlaciones entre las mediciones de la GE y los parámetros epidemiológicos, antropométricos y analíticos de los pacientes con MSC-EC (n = 130) y los controles con MS-no-EC (n = 73)

		Surco AV derecho, r (p)	Pared anterior del VD, r (p)	Pared lateral del VD, r (p)	Surco AV izquierdo, r (p)	Pared anterior del VI, r (p)	Surco IV anterior, r (p)	Puntuación de GE, r (p)
Edad	Pacientes	0,269 (0,022)	0,553 (< 0,001)	0,228 (0,054)	0,201 (0,091)	0,308 (0,009)	0,179 (0,133)	0,395 (0,001)
	Controles	0,099 (0,267)	0,251 (0,004)	0,176 (0,046)	0,082 (0,358)	0,136 (0,124)	0,117 (0,189)	0,254 (0,004)
IMC	Pacientes	0,217 (0,083)	0,420 (0,738)	0,320 (0,009)	0,182 (0,147)	-0,038 (0,764)	0,065 (0,605)	0,279 (0,027)
	Controles	0,214 (0,019)	-0,022 (0,808)	0,182 (0,045)	0,164 (0,172)	-0,011 (0,903)	0,174 (0,056)	0,185 (0,043)
PA	Pacientes	0,228 (0,072)	0,930 (0,467)	0,255 (0,044)	0,309 (0,014)	-0,054 (0,667)	0,064 (0,618)	0,288 (0,025)
	Controles	0,245 (0,007)	0,061 (0,507)	0,227 (0,012)	0,223 (0,014)	0,051 (0,582)	0,179 (0,151)	0,268 (0,003)
CT	Pacientes	0,283 (0,171)	0,214 (0,305)	0,258 (0,214)	0,277 (0,180)	-0,045 (0,833)	0,370 (0,068)	0,312 (0,129)
	Controles	-0,021 (0,829)	-0,072 (0,459)	-0,121 (0,208)	-0,034 (0,728)	0,123 (0,202)	-0,122 (0,206)	-0,115 (0,235)
PCRas	Pacientes	0,263 (0,203)	0,386 (0,057)	0,327 (0,110)	0,088 (0,677)	0,099 (0,638)	0,304 (0,139)	0,364 (0,073)
	Controles	0,016 (0,870)	0,087 (0,378)	0,100 (0,309)	0,073 (0,455)	-0,98 (0,315)	-0,047 (0,629)	0,086 (0,380)

AV: auriculoventricular; CT: colesterol total; EC: enfermedad coronaria; IMC: índice de masa corporal; IV: interventricular; MS: muerte súbita; MSC: muerte súbita cardiaca; PA: perímetro abdominal; PCRas: proteína C reactiva de alta sensibilidad; puntuación de GE: suma total de las mediciones del grosor de la grasa epicárdica de cada individuo; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo.

La significación estadística ($p < 0,05$) se evaluó mediante una correlación de Pearson.

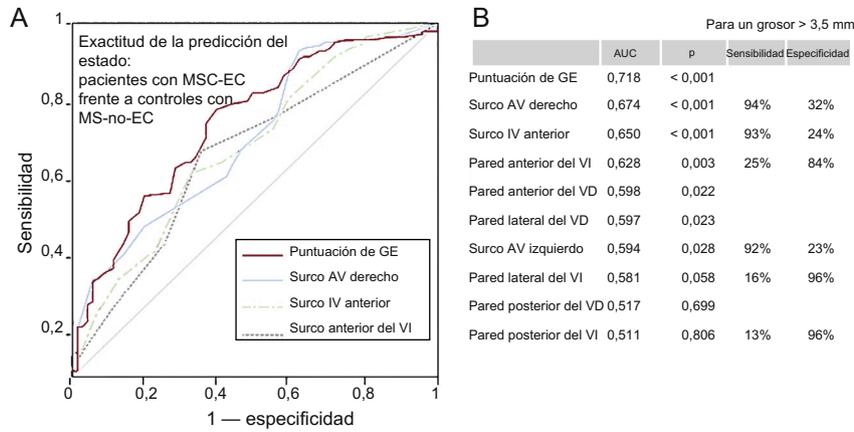


Figura 1. Exactitud de las mediciones de la GE en cuanto a la predicción del estado en los pacientes con MSC-EC (n = 130) y los controles con MS-no-EC (n = 73). A: solo se muestran las AUC con los valores de p más estadísticamente significativos y su línea de referencia. B: se indican todas las AUC con la combinación más útil de sensibilidad y especificidad para cada medida de la GE (umbral, > 3,5 mm). AUC: área bajo la curva; AV: auriculoventricular; EC: enfermedad coronaria; GE: grasa epicárdica; IV: interventricular; MS: muerte súbita; MSC: muerte súbita cardiaca; puntuación de GE: suma total de las mediciones del grosor de la GE en cada individuo; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo. La significación estadística (p < 0,05) se evaluó con el método de la curva de características operativas del receptor.

con una estenosis estable significativa de 54 pacientes, 1 muestra de GE procedente de una placa complicada de los 8 pacientes restantes y, por último, 1 muestra de GE de una arteria coronaria sin placas de aterosclerosis de 55 de los pacientes anteriormente mencionados).

Las determinaciones de la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real se realizaron mediante la PCR de microARN RT miRCURY LNA Universal (Exiqon; Vedbaek, Dinamarca) y un instrumento Light Cycler 480 II (Roche Applied Science; Penzberg, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

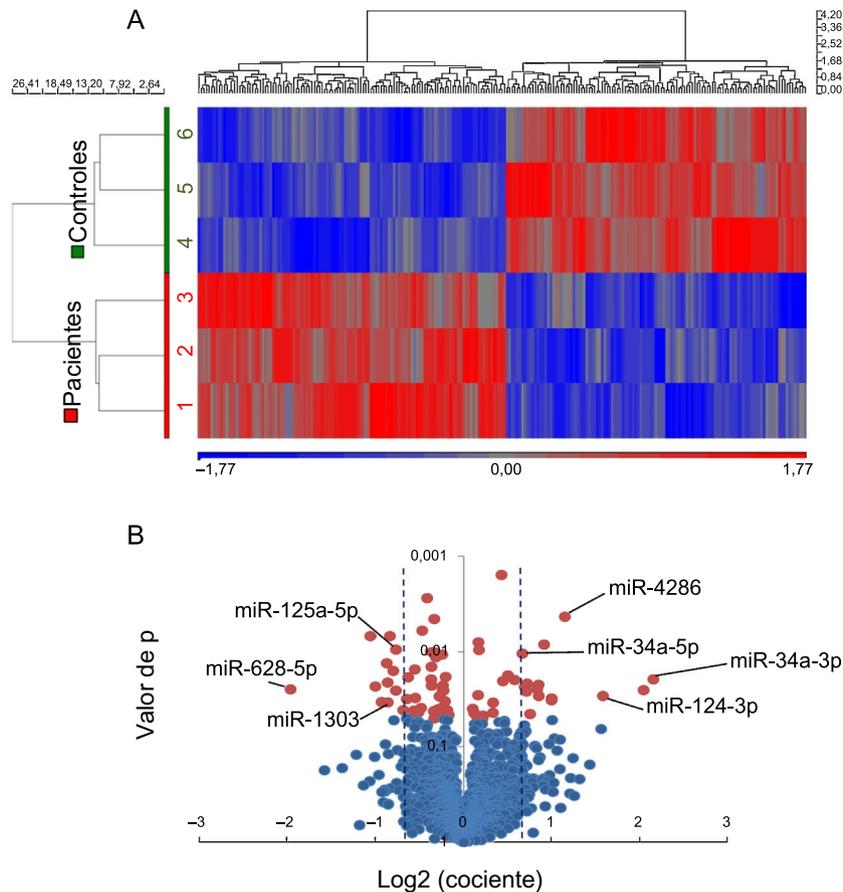


Figura 2. Perfil de expresión de miARN en muestras de GE de 3 pacientes con MSC-EC y 3 controles con MS-no-EC. A: agrupación jerárquica no supervisada que muestra patrones de expresión de miARN diferentes (en rojo, de aumento de los miARN; en azul, de disminución de los miARN). B: gráfico de volcán en el que se muestra la magnitud de los cambios de los miARN con una expresión diferente (líneas sombreadas, cambio de $\pm 1,5$ veces; p < 0,05). EC: enfermedad coronaria; GE: grasa epicárdica; miARN: micro-ARN; MS: muerte súbita; MSC: muerte súbita cardiaca. La significación estadística (p < 0,05) se evaluó mediante un ANOVA. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

Tabla 3

Cantidad de miARN determinada mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real en extractos de GE procedentes de controles con MS-no-EC y pacientes con MSC-EC, en estos según la presencia o ausencia de estenosis aterosclerótica estable y de placas inestables subyacentes

miARN	GE de arterias sin placa en controles con MS-no-EC (n = 28)	GE de arterias sin placa en pacientes con MSC-EC (n = 87)	GE de arterias con placa en pacientes MSC-EC (n = 78)	GE de arterias con placas complicadas en pacientes con MSC-EC (n = 21)
-34a-3p	1,00 ± 0,11	2,02 ± 0,17 ^{a,b}	1,97 ± 0,15 ^{a,b}	2,76 ± 0,61 ^c
-34a-5p	1,00 ± 0,14	1,83 ± 0,15 ^{a,b}	1,74 ± 0,14 ^a	2,65 ± 0,58 ^c
-124-3p	1,00 ± 0,08	0,92 ± 0,07	0,98 ± 0,07	0,95 ± 0,19
-125a-5p	1,00 ± 0,11	1,26 ± 0,10	0,99 ± 0,09	1,30 ± 0,19
-4286	1,00 ± 0,11	1,40 ± 0,15	1,13 ± 0,19	1,05 ± 0,24
-628-5p	1,00 ± 0,14 (n = 26)	1,32 ± 0,13 (n = 85)	1,22 ± 0,14 (n = 77)	1,25 ± 0,18 (n = 20)
-1303	1,00 ± 0,13 (n = 14)	1,11 ± 0,09 (n = 47)	1,23 ± 0,15 (n = 41)	0,93 ± 0,19 (n = 14)

GE: grasa epicárdica; miARN: micro-ARN; MSC-EC: muerte súbita cardiaca debida a enfermedad coronaria; MS-no-EC: muerte súbita no debida a enfermedad coronaria. Los valores expresan media ± error estándar de la media. La expresión de miARN se presenta como múltiplo de cambio relativo respecto a la concentración en la GE de arterias sin placa de los controles con MS-no-EC.

Cualquier grupo en comparación con los controles:

^a p < 0,01.

^b Modelo de regresión (método anterógrado condicional) que incluye los parámetros edad, sexo, índice de masa corporal, perímetro abdominal, puntuación de GE y colesterol total, p < 0,05.

^c p < 0,05.

Análisis estadístico

Las variables cualitativas se expresan en forma de porcentajes y se compararon con la prueba de la χ^2 . Dependiendo de la normalidad de la prueba, las variables continuas se expresan en forma de media ± desviación estándar, media ± error estándar de la media o mediana [intervalo intercuartílico] y se compararon con la prueba de la t de Student, un ANOVA o la prueba de la U de Mann-Whitney, según procediera. La cuantificación de los miARN se presenta en forma de múltiplos de cambio relativo respecto a los resultados obtenidos en la GE de las arterias coronarias sanas de los controles. Las correlaciones se determinaron con la prueba de la rho de Spearman o el coeficiente de correlación de Pearson, según procediera. Para evaluar los resultados obtenidos con los clasificadores, se elaboraron las curvas de características operativas del receptor. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p < 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistical Package for the Social Sciences versión 20.0 for Windows (SPSS Inc.; Chicago, Illinois, Estados Unidos).

RESULTADOS

Población del estudio

No se observaron diferencias significativas en los intervalos *post mortem*. En la *tabla 1* se presentan las características generales de los pacientes y los controles. En comparación con los controles, los pacientes eran de más edad, principalmente varones y mostraban unos valores superiores de los parámetros antropométricos, el colesterol total y la proteína C reactiva de alta sensibilidad. Se observaron placas ateroscleróticas complicadas en un 34% de los pacientes y su presencia se asoció solo con la edad (pacientes con y sin placas complicadas, 46,2 ± 8,4 frente a 48,6 ± 6,1 años; p = 0,002).

Grosor de la grasa epicárdica

Los pacientes presentaron en diferentes localizaciones mayor grosor de la GE que los controles (*tabla 1*). Tras un ajuste en un modelo multivariable teniendo en cuenta la edad, el sexo, el índice de masa corporal y el perímetro abdominal, solo el grosor de la GE

en el surco auriculoventricular izquierdo y el surco interventricular anterior siguieron mostrando un aumento significativo. El grosor máximo de la GE se observó en los surcos auriculoventriculares en ambos grupos.

Se observó una correlación significativa del grosor de la GE en cada localización con la puntuación de GE total (*figura 2 del material suplementario*). En diferentes lugares del ventrículo derecho y de los surcos auriculoventriculares, el grosor de la GE mostró con frecuencia una leve correlación positiva con la edad, el índice de masa corporal y el perímetro abdominal, que fue rara en el caso de la GE en localizaciones del ventrículo izquierdo (*tabla 2*).

Los valores de grosor de la GE permitían diferenciar bien a los pacientes de los controles (*figura 1*). La mejor área bajo la curva fue la observada para la puntuación de GE, seguida del surco

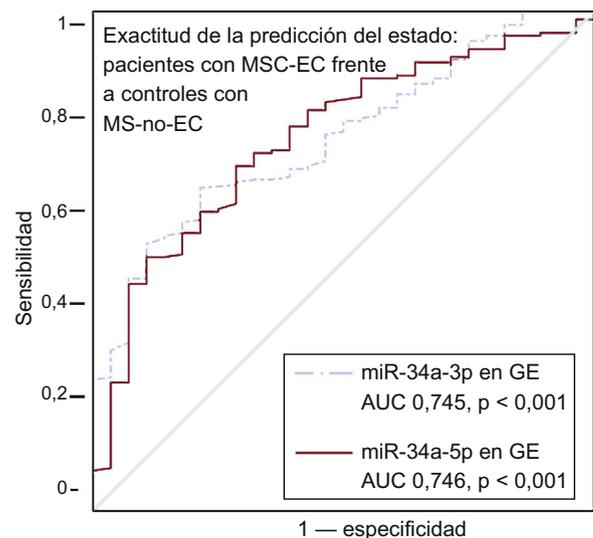


Figura 3. Exactitud de las determinaciones de miRNA-34a-3p y miRNA-34a-5p de la GE en cuanto a la predicción del estado de los pacientes con MSC-EC (n = 186) y los controles con MS-no-EC (n = 28). Se presentan las curvas ROC para los miARN con resultados estadísticamente significativos y sus líneas de referencia. AUC: área bajo la curva; EC: enfermedad coronaria; GE: grasa epicárdica; miARN: micro-ARN; MS: muerte súbita; MSC: muerte súbita cardiaca; ROC: características operativas del receptor. La significación estadística (p < 0,05) se evaluó con el método de ROC.

auriculoventricular derecho y el surco interventricular anterior. Estos análisis mostraron alta sensibilidad, pero con baja especificidad para el punto de corte de 3,5 mm, y se obtuvieron estimaciones opuestas para las paredes anterior, posterior y lateral del ventrículo izquierdo.

Perfiles de expresión de miARN en la grasa epicárdica

El perfil de expresión de miARN mostró agrupaciones separadas para los pacientes y los controles (figura 2A). Se observó una desregulación significativa en 28 miARN maduros: 14 con aumento y 14 con disminución en los pacientes (tabla 1 del material suplementario). Para validar estos resultados, se seleccionaron 7 miARN en función de sus posibles dianas (metabolismo lipídico, fisiopatología adipocitaria u otras vías relacionadas que intervienen en la aterosclerosis y la desestabilización de la placa), a saber: miR-34a-3p, -34a-5p, -124-3p, -4286, -125a-5p, -628-5p y -1303 (figura 2B).

Fase de validación de los miARN seleccionados

Se observó mayor cantidad de miR-34a-3p y -5p en la GE de los pacientes que en la de los controles, con independencia de la presencia o ausencia de placas de aterosclerosis en su proximidad

(tabla 3). Al examinarlo específicamente en los pacientes, no se observaron diferencias en ninguno de los miARN analizados por lo que respecta a la presencia o ausencia de estenosis coronarias subyacentes. Sin embargo, se observó una tendencia a una mayor desregulación de los miR-34a-3p y -34a-5p en la GE adyacente a placas de aterosclerosis complicadas (tabla 3). La exactitud en la predicción del grupo clínico (pacientes o controles) fue estadísticamente significativa para los miR-34a-3p y -34a-5p de la GE (figura 3).

Solo en el grupo de control hubo una correlación significativa de los miR-34a-3p y -34a-5p de la GE con la edad, y también una correlación de los miR-34a-3p, -34a-5p y -124-3p con la puntuación de GE y varias mediciones individuales del grosor de la GE (tabla 2 del material suplementario). No se observó ninguna otra correlación de posible relevancia ($r > 0,5$) y estadísticamente significativa en los controles ni en los pacientes.

Este grupo anteriormente describió un aumento de miR-34a-5p hepáticos en las víctimas de una MS con EC o EHGNA¹⁵, y en el presente estudio se determinó simultáneamente en extractos de hígado y de GE de controles y pacientes. Se observó una correlación leve y significativa entre la cantidad de miR-34a-5p en el hígado y en la GE próxima a la estenosis coronaria de los pacientes, que aumentaba notablemente en el subgrupo de muestras de GE

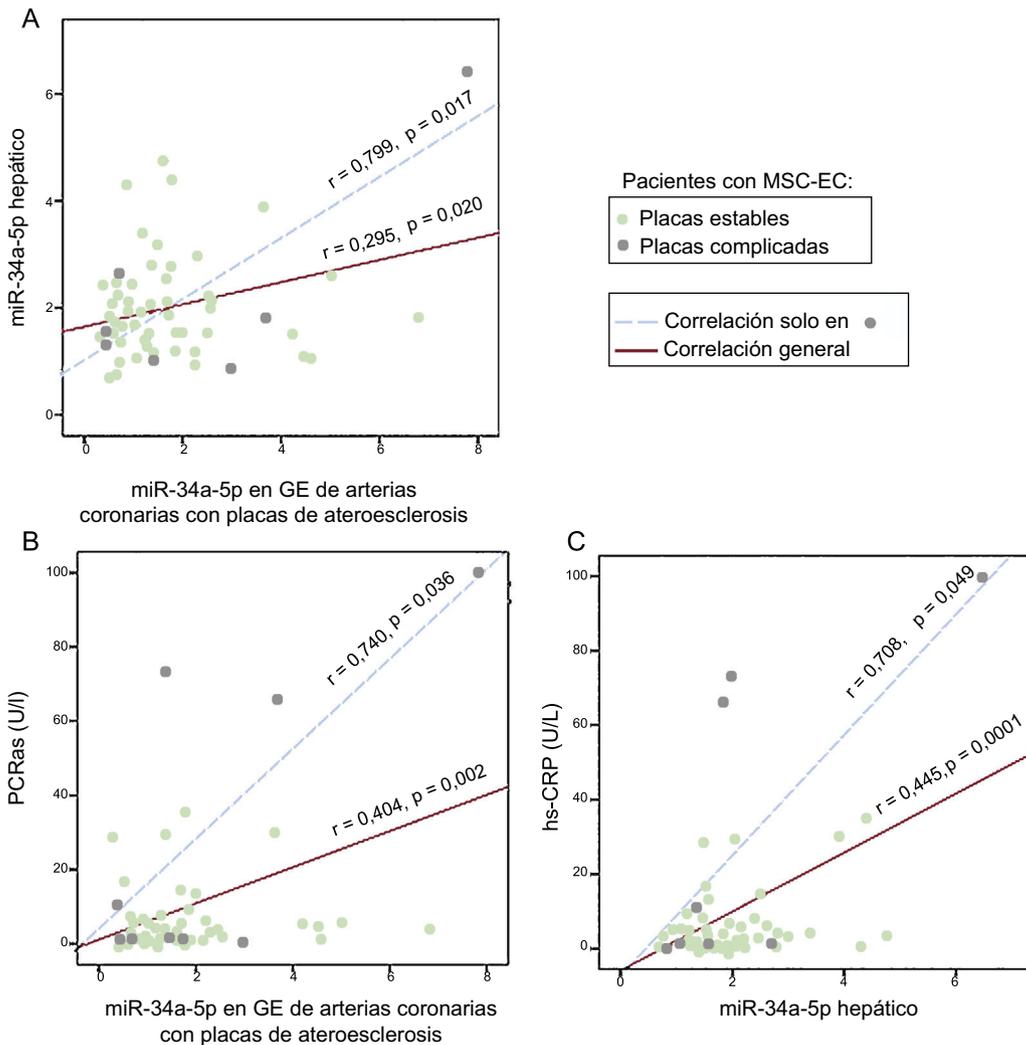


Figura 4. Correlaciones entre cantidad de miR-34a-5p en muestras de GE y hepáticas y entre cada uno de ellos y la PCRas de los pacientes con MSC-EC (n = 78). La GE se obtuvo de arterias coronarias con EC. A: correlación entre los valores de miR-34a-5p en la GE y el hígado. B: correlación entre los valores de miR-34a-5p en la GE y la PCRas. C: correlación entre los valores de miR-34a-5p hepáticos y la PCRas. EC: enfermedad coronaria; GE: grasa epicárdica; MSC: muerte súbita cardíaca; PCRas: proteína C reactiva de alta sensibilidad. La significación estadística ($p < 0,05$) se evaluó mediante correlaciones de Pearson.

procedentes de placas complicadas (figura 4A). Además, se exploró la relación de la proteína C reactiva de alta sensibilidad y el miR-34a-5p determinado en muestras de GE o de hígado procedentes de los mismos pacientes (figura 4B y C). Nuevamente, las correlaciones apenas significativas observadas en la GE adyacente a las placas de aterosclerosis pasaron a ser más intensas al analizar solo la GE procedente de placas de aterosclerosis complicadas. En cambio, no se observaron correlaciones significativas en la GE de las arterias coronarias sin estenosis de los mismos pacientes ni en la GE de los controles (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

La serie que se presenta aquí confirma el concepto conocido de que la MSC-EC predomina en los varones de más edad y que muestran un perfil antropométrico más desfavorable (mayores índice de masa corporal y perímetro abdominal) en comparación con las víctimas de una MS-no-EC. Y lo que es más importante, se ha explorado el papel de la GE en la EC desde una doble perspectiva innovadora, por lo que respecta al grosor anatómico y al efecto fisiopatológico mediado por los miARN.

El grosor de la GE en diferentes localizaciones mostró un aumento significativo en los pacientes respecto a los controles en los modelos univariable y multivariable, a pesar de que algunos parámetros analíticos importantes (colesterol total y proteína C reactiva de alta sensibilidad) perdieron la significación estadística en el modelo multivariable (tabla 1). Se presenta por primera vez en la literatura una buena exactitud del grosor de la GE *post mortem* en casi todas las localizaciones para predecir que la EC fue la causa de la muerte⁴, se propone que la grasa no se acumula de manera homogénea en el corazón; de hecho, los depósitos predominan en los surcos auriculoventriculares, donde hay más espacio que se puede llenar (figura 5). Sin embargo, el hallazgo de GE en la superficie del ventrículo izquierdo fuera de los surcos es claramente anormal. Así, se observó una sensibilidad alta y una especificidad baja para el grosor de la GE en los surcos auriculoventriculares y lo inverso para el grosor de la GE en la superficie del ventrículo izquierdo (figura 1), lo cual concuerda con lo descrito anteriormente en estudios de ecocardiografía²⁸.

La inflamación crónica de bajo grado que caracteriza la EC puede inducir un perfil de expresión de miARN diferente en la GE^{29,30}. Hasta donde se sabe, solo hay 2 estudios en los que se haya

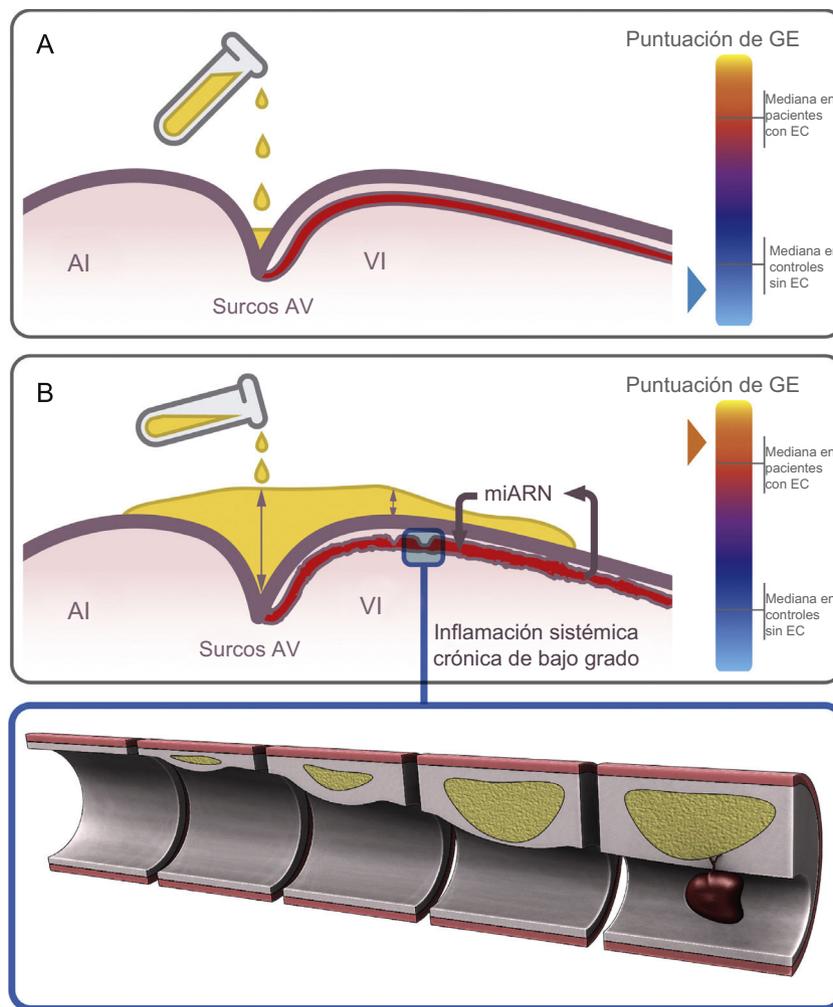


Figura 5. Hipótesis para la acumulación de GE dependiente de la región y su papel en el corazón. Los depósitos de grasa se inician en los surcos y luego se extienden a la superficie del VD y finalmente a la del VI. A: representación esquemática del depósito inicial de GE en los surcos AV de un individuo de control, con una puntuación de GE baja. B: en un estadio de depósito avanzado, la GE se acumula no solo en los surcos (con la máxima profundidad), sino también en el surco interventricular anterior y la superficie del VI en un paciente con EC y una puntuación de GE alta; la inflamación sistémica crónica de bajo grado induce una alteración del perfil de miARN en la GE que circunda las arterias coronarias, y ello fomenta la aterosclerosis y la desestabilización de las placas. AI: aurícula izquierda; AV: auriculoventricular; EC: enfermedad coronaria; GE: grasa epicárdica; puntuación de GE: suma total de las mediciones del grosor de la GE en cada individuo; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo.

evaluado el papel de los miARN de la GE en la EC estable y se han basado en un reducido número de muestras obtenidas durante la realización de intervenciones de *bypass* o de cirugía valvular^{25,26}. En cada uno de estos estudios se identificó un perfil de miARN específico en los pacientes con EC, pero no hubo correlaciones con el grosor de la GE y no se realizaron subanálisis respecto a la estabilidad de las placas subyacentes a la GE. Al igual que otros autores³¹, se obtuvieron muestras de GE *post mortem* de buena calidad. Los resultados obtenidos confirman que la EC se asocia con una desregulación del patrón de expresión de miARN en la GE (figura 2). Existen diferencias considerables entre el diseño de del presente estudio y el de los 2 previos^{25,26}, lo cual explica las diferencias en los miARN identificados. Esta serie pone de manifiesto por primera vez que la asociación lineal existente en los controles entre el grosor de la GE o la edad y la cantidad de miARN se pierde cuando la EC está establecida (tabla 2 del material suplementario). Es probable que el cambio del perfil de miARN sea gradual debido al incremento de miR-34a-3p y -34a-5p en la GE de las arterias coronarias sanas de los controles, de los pacientes sin estenosis, alrededor de estenosis estables o de placas complicadas (sin diferencias estadísticas en estos últimos 2 grupos) (tabla 3). Así pues, se demuestra que, siempre que la GE cambia hacia un perfil más desfavorable, la cantidad de miR34a-3p y -34a-5p aumenta de tal manera que la edad y el grosor de la GE llegan a perder su influencia previa en ellos. Además, se propone que la desregulación de los miARN en la GE podría preceder a la aparición de la EC en las arterias coronarias subyacentes como signo de una enfermedad sistémica latente, ya que la GE de las arterias coronarias sin una estenosis significativa en los pacientes también estaba alterada en comparación con la de los controles (tabla 3 y figura 5).

La diabetes mellitus no se incluyó en el modelo multivariable. Un motivo es que no se disponía de ese dato en los registros forenses. Además, la glucemia en la bioquímica *post mortem* no fue útil (su valor depende del tiempo transcurrido desde la última comida, y es muy variable en las víctimas de una MS). Anteriormente se ha descrito la alteración inducida por la hiperglucemia en el perfil de expresión de miARN en la GE^{32,33}, y hay que reconocer que las diferencias en el perfil de expresión de miARN podrían deberse en parte a diferencias en el metabolismo glucémico.

El reducido número de pacientes con placas complicadas impide extraer conclusiones firmes, pero apunta claramente a la expresión de miARN en la GE como otro factor que interviene en la desestabilización de la placa de aterosclerosis. Es posible que nuevos estudios prospectivos centrados en las placas complicadas permitan superar esta limitación.

Por último, como un avance respecto a las observaciones previas¹⁵, una nueva observación de una correlación positiva entre la cantidad de miR-34a-5p en las muestras de GE y hepáticas de los pacientes y de ambas con la concentración de proteína C reactiva de alta sensibilidad respalda la existencia de un efecto nocivo de la inflamación sistémica como promotor de la EHGNA y la EC y puede ayudar a explicar también el mecanismo por el que la inflamación desencadena la desestabilización de las placas coronarias con aterosclerosis (figura 4).

CONCLUSIONES

En resumen, el grosor de la GE está aumentado en las víctimas de una MSC-EC, no está correlacionada con parámetros analíticos y, cuando se encuentra en la superficie del ventrículo izquierdo, muestra buena especificidad para la identificación de EC y tiene mala correlación con la edad y las variables antropométricas. Este tejido muestra un perfil de expresión de miARN desregulado en los

pacientes con EC, que es independiente del grosor, afecta también a la GE de las arterias coronarias sin estenosis y se presenta en paralelo a la inflamación sistémica, lo cual respalda el concepto de que la aterosclerosis es una enfermedad sistémica. Por último, la tendencia a una mayor desregulación en la zona próxima a las placas complicadas deberá confirmarse en el futuro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a José Ramón Sanz y la Asociación Valenciana de Cardiopatías Familiares y Muerte Súbita por su ayuda técnica.

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado mediante subvenciones del Instituto de Salud Carlos III, Fondo Europeo de Desarrollo Regional «European Union. A way of making Europe» (RD12/0042/0029, PI14/01477 y La Fe Biobank PT17/0015/0043), y el «Premio Borrasca» (Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia). A. Braza-Boils cuenta con el apoyo de Roche «Stop Brain Drain»-Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (2017/0055) y J. Marí-Alexandre, con el de una subvención de la Fundación Española de Trombosis y Hemostasia, 2016.

CONFLICTO DE INTERESES

No se declara ninguno.

¿QUÉ SE SABE DEL TEMA?

- La GE puede cambiar su comportamiento metabólico en circunstancias patológicas. Las arterias coronarias están rodeadas de GE. El aumento del grosor de la GE y también la presencia de EHGNA han aparecido como nuevos factores de riesgo cardiovascular para la EC, si bien aún no se conocen con exactitud los mecanismos subyacentes. Los miARN regulan las vías fisiológicas y patológicas. El miR-34a-5p hepático está aumentado cuando hay una EHGNA o una EC.

¿QUÉ APORTA DE NUEVO?

- El perfil de expresión de miARN en la GE de víctimas de una MSC-EC está desregulado. El incremento de miR-34-3p y -34-5p observado en los pacientes no tiene relación con la edad, el grosor de la GE o los parámetros antropométricos y muestran una tendencia positiva considerando la GE de arterias coronarias con una carga de aterosclerosis creciente. Los pacientes presentan una correlación significativa de la cantidad de miR-34a-5p en la GE y extractos de hígado, y también de la proteína C reactiva de alta sensibilidad y el miR-34a-5p de la GE, sobre todo cuando la GE está próxima a una placa complicada. Serán necesarios nuevos estudios para clarificar el mecanismo de acción por el que la GE resulta nociva en el fomento de la EC y su desestabilización.

MATERIAL SUPLEMENTARIO



Se puede consultar material suplementario a este artículo en su versión electrónica disponible en <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2017.12.003>.

BIBLIOGRAFÍA

- Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J*. 2015;36:2793–2867.
- Morentin B, Audicana C. Population-Based Study of Out-of-Hospital Sudden Cardiovascular Death: Incidence and Causes of Death in Middle-Aged Adults. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:28–34.
- Lewis ME, Lin FC, Nanavati P, et al. Estimated incidence and risk factors of sudden unexpected death. *Open Heart*. 2016;3:e000321.
- Sinha SK, Thakur R, Jha MJ, et al. Epicardial adipose tissue thickness and its association with the presence and severity of coronary artery disease in clinical setting: a cross-sectional observational study. *J Clin Med Res*. 2016;8:410–419.
- Mangili LC, Mangili OC, Bittencourt MS, et al. Epicardial fat is associated with severity of subclinical coronary atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2016;254:73–77.
- Mahabadi AA, Lehmann N, Kälisch H, et al. Association of epicardial adipose tissue with progression of coronary artery calcification is more pronounced in the early phase of atherosclerosis: results from the Heinz Nixdorf recall study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7:909–916.
- Sacks HS, Fain JN, Bahouth SW, et al. Adult epicardial fat exhibits beige features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E1448–E1455.
- Gaborit B, Venteclef N, Ancel P, et al. Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical peri-atrial, peri-ventricular, or peri-coronary location. *Cardiovasc Res*. 2015;108:62–73.
- Iacobellis G, Bianco AC. Epicardial adipose tissue: emerging physiological, pathophysiological and clinical features. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22:450–457.
- Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003;108:2460–2466.
- Nakanishi K, Fukuda S, Tanaka A, et al. Persistent epicardial adipose tissue accumulation is associated with coronary plaque vulnerability and future acute coronary syndrome in non-obese subjects with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2014;237:353–360.
- Hu KC, Wang HY, Liu SC, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: updates in noninvasive diagnosis and correlation with cardiovascular disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20:7718–7729.
- Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease, the metabolic syndrome and the risk of cardiovascular disease: the plot thickens. *Diabet Med*. 2007;24:1–6.
- Petta S, Argano C, Colomba D, et al. Epicardial fat, cardiac geometry and cardiac function in patients with non-alcoholic fatty liver disease: association with the severity of liver disease. *J Hepatol*. 2015;62:928–933.
- Braza-Boils A, Marí-Alexandre J, Molina P, et al. Deregulated hepatic microRNAs underlie the association between non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *Liver Int*. 2016;36:1221–1229.
- Kim BJ, Kim HS, Kang JG, Kim BS, Kang JH. Association of epicardial fat volume and nonalcoholic fatty liver disease with metabolic syndrome: From the CAESAR study. *J Clin Lipidol*. 2016;10:1423–1430.
- Wolff L, Bos D, Murad SD, et al. Liver fat is related to cardiovascular risk factors and subclinical vascular disease: the Rotterdam Study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2016;17:1361–1367.
- Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*. 2010;328:1570–1573.
- Fernández-Hernando C, Suárez Y, Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNAs in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22:86–92.
- Ling H, Li X, Yao CH, et al. The physiological and pathophysiological roles of adipocyte miRNAs. *Biochem Cell Biol*. 2013;91:195–202.
- Romao JM, Jin W, Dodson MV, Hausman GJ, Moore SS, Guan LL. MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis. *Exp Biol Med*. 2011;236:997–1004.
- Liu XL, Pan Q, Zhang RN, et al. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World J Gastroenterol*. 2016;22:9844–9852.
- Salvoza NC, Klinzing DC, Gopez-Cervantes J, Baclig MO. Association of circulating serum miR-34a and miR-122 with dyslipidemia among patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2016;11:e0153497.
- Zorio E, Medina P, Rueda J, et al. Insights into the role of microRNAs in cardiac diseases: from biological signalling to therapeutic targets. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2009;7:82–90.
- Vacca M, Di Eusanio M, Cariello M, et al. Integrative miRNA and whole-genome analyses of epicardial adipose tissue in patients with coronary atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2016;109:228–239.
- Liu Y, Fu W, Lu M, Huai S, Song Y, Wei Y. Role of miRNAs in epicardial adipose tissue in CHD patients with T2DM. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1629236.
- Basso C, Aguilera B, Banner J, et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Arch*. 2017;471:691–705.
- Hirata Y, Yamada H, Kusunose K, et al. Clinical utility of measuring epicardial adipose tissue thickness with echocardiography using a high-frequency linear probe in patients with coronary artery disease. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28:1240–1246.
- Xu S, Chen P, Sun L. Regulatory networks of non-coding RNAs in brown/beige adipogenesis. *Biosci Rep*. 2015;35:e00262.
- Trajkovski M, Lodish H. MicroRNA networks regulate development of brown adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24:442–450.
- Chandrasekaran S, Bonchev D. Network topology analysis of post-mortem brain microarrays identifies more Alzheimer's related genes and microRNAs and points to novel routes for fighting with the disease. *PLoS One*. 2016;11:e0144052.
- Ocloñ E, Latacz A, Zubel-Lojek J, Pierzchała-Koziec K. Hyperglycemia-induced changes in miRNA expression patterns in epicardial adipose tissue of piglets. *J Endocrinol*. 2016;229:259–266.
- Blumensatt M, Fahlbusch P, Hilgers R, et al. Secretory products from epicardial adipose tissue from patients with type 2 diabetes impair mitochondrial β -oxidation in cardiomyocytes via activation of the cardiac renin-angiotensin system and induction of miR-208a. *Basic Res Cardiol*. 2017;112:2.