

# La troponina T como posible marcador del daño miocárdico menor. Su aplicación en el miocardio aturdido y en la isquemia silente

Carmen Capdevila, Manuel Portolés, Amparo Hernández, Vicente Pallarés y Juan Cosín

Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe.  
Unidades de Investigación Cardiovascular y Biología y Patología Celular. Valencia.

**Introducción y objetivos.** La necesidad de disponer de marcadores bioquímicos más precoces y de mayor especificidad y sensibilidad para la detección del infarto agudo de miocardio ha impulsado la continua evaluación de métodos alternativos a la isoenzima MB de la creatinina (CK-MB). Nuestro objetivo ha sido conocer la utilidad de las determinaciones de la troponina T (TnT), frente a otros marcadores, para detectar procesos de isquemia transitoria en ausencia de necrosis.

**Métodos.** Se ha utilizado un modelo canino experimental de isquemias muy breves y repetidas (series I y II), y un modelo de isquemia única de 15 min de duración, y 60 min de reperusión (serie III). En la serie I el oclisor coronario se situó en la zona proximal de la arteria coronaria descendente anterior (DA), y en las series II y III en la zona distal de la DA. Las muestras de plasma se han obtenido de sangre venosa periférica (SVP) y coronaria (SVC), en distintas fases del estudio. Las concentraciones de adenosina, TnT, CK y CK-MB se determinaron por procedimientos bioquímicos. Se estudiaron los parámetros de función regional y general, y se realizó un estudio anatomopatológico para conocer el tamaño del área de riesgo.

**Resultados.** En la serie I se produjo hipocinesia que persistió 10 días, y en las series II y III la función regional se había recuperado a las 24 h. Las concentraciones de CK y CK-MB aumentaron ya significativamente tras la apertura del tórax ( $p < 0,05$ ) en las tres series, alcanzando el máximo valor a las 24 h del protocolo isquémico. La adenosina se elevó significativamente sólo tras la isquemia ( $p < 0,05$ ). Los valores de TnT se elevaron con la isquemia hasta los 5 días en las tres series en SVP. No hubo correlación entre la función regional del miocardio aturdido y el incremento de troponina T.

**Conclusiones.** La troponina T se eleva en ausencia de necrosis, preferentemente cuando los episodios isquémicos son prolongados.

**Palabras clave:** *Aturdimiento miocárdico. Isquemia. Troponina T. CK-MB. Adenosina.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 580-591)

## Troponine T as Possible Myocardial Injury Marker. Its Application in Myocardial Stunning and Silent Ischemia

**Introduction and objectives.** The need for more specific, more sensitive and earlier biochemical markers of acute myocardial infarction, has led to the development of alternative methods to CK-MB). The aim of this work is to assess the usefulness of TnT measurement, in comparison with other markers for detecting transitory ischemic processes without necrosis in some experimental models.

**Methods.** The plasma levels of Troponine T, CK, CK-MB and adenosine were assessed as markers of ischemic myocardial injury. Two protocols were used: in Series I and II very brief (2 min ischemia with 3-min reperfusion) repeated (20 episodes) ischemias were induced, while Series III involved a single 15-min ischemia with a 60-min reperfusion. In Series I the coronary occluder was placed close to the anterior descending coronary artery (AD); in Series II and III it was placed distally in the AD. Blood samples were taken from the peripheral vein (PVB) and corresponding coronary segment vein; in a basal situation, during ischemia, upon reperfusion, after 24 hours, and after 5 and 10 days. The plasma levels of adenosine, troponine T, CK and CK-MB as well as general and regional function parameters were measured.

**Results.** In Series I we observed hypokinesia that lasted 10 days, reaching its maximum on days 4-5. In Series II and III regional function was restored by 24 hours. CK and CK-MB showed similar behaviour; they rose significantly when the chest was opened ( $p < 0.05$ ) reaching the highest value at 24 hours in all the series. Adenosine rose significantly only during reperfusion ( $p < 0.05$ ). Troponine T increased after ischemia but not before, remained high for 5 days in all series (PVB).

**Conclusions.** Troponine T rises in absence of necrosis, preferably when the ischemia is longer.

**Key words:** *Stunning myocardial. Ischemia. Troponin T. CK-MB. Adenosine.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 580-591)

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda IX Beca de Investigación SCHERING-PLOUGH.

Correspondencia: Dra. A. Hernández.  
Unidad Cardiovascular. Centro de Investigación.  
Hospital Universitario La Fe.  
Avda. Campanar, 21. 46009 Valencia.  
Correo electrónico: hernandez\_amp@gva.es

Recibido el 21 de marzo del 2000.  
Aceptado para su publicación el 27 de diciembre del 2001.

**ABREVIATURAS**

IAM: infarto agudo de miocardio.  
 ECG: electrocardiograma.  
 CK: creatincinasa.  
 CK-MB: isoenzima MB de la creatincinasa.  
 TnT: troponina T.  
 TnI: troponina I.  
 LTD: longitud telediastólica.  
 LTS: longitud telesistólica.  
 FAc: fracción de acortamiento.  
 DA: arteria coronaria descendente anterior.  
 Cx: arteria coronaria circunfleja.  
 PVI: presión ventricular izquierda.  
 AR: área de riesgo.  
 Peso VI: peso del ventrículo izquierdo.

**INTRODUCCIÓN**

La necesidad de disponer de marcadores bioquímicos más precoces y de mayor especificidad y sensibilidad para la detección de lesiones miocárdicas reversibles ha impulsado la continua evaluación de métodos alternativos a la isoenzima MB de la creatincinasa (CK-MB)<sup>1-8</sup>. Recientemente se ha propuesto la determinación en plasma o suero de la troponina T (TnT) y de la troponina I (TnI) como posibles marcadores del IAM<sup>9,10</sup>. Tanto las concentraciones de troponina T como de I, liberadas en el plasma, se han correlacionado con éxito con el tamaño de infarto<sup>11,12</sup>. Sin embargo, no hay estudios referidos a situaciones de isquemia transitoria sin presencia de necrosis.

El complejo troponina lo forman tres moléculas, C, T e I, asociadas al filamento fino del miocito<sup>13</sup>. Únicamente la troponina T y la troponina I tienen interés en el diagnóstico miocárdico, ya que están codificadas por genes diferentes a los que codifica la proteína en el músculo esquelético<sup>14</sup>. Las troponinas cardíacas tienen una pequeña fracción disuelta en el citoplasma de los cardiomiocitos (el 8% de TnT en humanos, y el 2% en perros es citosólica)<sup>15</sup>; este hecho, junto a su pequeño tamaño molecular y a su especificidad tisular, otorga a esta proteína el papel de un buen candidato para la detección muy precoz de lesiones celulares reversibles (isquemia) o irreversibles (necrosis).

En estudios previos realizados por nuestro grupo<sup>16,17</sup> hemos observado cómo episodios de isquemia muy breves (2 min) seguidos de reperfusiones de muy corta duración (3 min) y que podrían ser equivalentes a episodios de isquemia silente son capaces de ocasionar aturdimiento miocárdico cuando son repetidos.

La finalidad del presente trabajo es conocer la utilidad de las determinaciones de troponina T para detectar procesos de isquemia transitoria, en ausencia de necrosis miocárdica en diversos modelos experimentales, comparando la evolución de sus concentraciones

con la de otros marcadores como CK, CK-MB y adenosina.

**MATERIAL Y MÉTODOS****Animales de experimentación**

Se han utilizado perros mestizos adultos de ambos sexos con un peso medio de aproximadamente 25 kg, que provienen de un centro especializado en animales de experimentación. Los animales acceden a los estabularios del Centro de Investigación con documentación sanitaria personalizada e identificados mediante tatuaje individual; todo el proceso está supervisado por un veterinario especialista. En todos los casos se cumplen las normas vigentes sobre protección de animales utilizados en experimentación, tanto nacionales como comunitarias (RD 223/1988). Todos los perros aceptados en el protocolo de experimentación han sido estabulados un mínimo de 7 días, antes de la realización de las oclusiones coronarias. El día previo a la experimentación se prepara al animal y se mantiene en jaula individualizada, donde permanece en ayunas las 12 h previas al protocolo isquémico. El protocolo de experimentación ha sido aprobado por el Comité de Experimentación Animal del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

**Series experimentales**

Se han constituido tres series de estudio asignando de modo alternativo los perros a cada una de las series. La asignación fue realizada por el personal de estabulario y no se utilizó ningún método específico de ocultación de la distribución (estudio abierto).

– Serie I: producción de isquemia miocárdica mediante 20 obstrucciones de la arteria coronaria descendente anterior (DA), en su porción proximal, de 2 min de duración cada una y con 3 min de reperfusión entre ellas (6 animales).

– Serie II: realización de 20 obstrucciones de la DA, en su porción distal, de 2 min de duración cada una y con 3 min de reperfusión entre ellas (6 animales).

– Serie III: en esta serie se provocó una isquemia única por oclusión distal de la DA de 15 min de duración con reperfusión de 60 min (6 animales).

**Fase de quirófano**

La anestesia fue inducida mediante la administración en forma de bolo intravenoso (i.v.) de pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso), cloruro morfíco (10 mg, dosis total) y succinilcolina (2,5 mg, dosis total). Se procedió a la intubación orotraqueal y conexión inmediata a ventilación mecánica, la cual se mantuvo durante toda la experiencia con una mezcla de 40% de

oxígeno y 60% de protóxido de nitrógeno. Se realizaron controles gasométricos.

Durante todo el experimento se mantuvo la relajación muscular mediante la administración continua con bomba de perfusión de succinilcolina y cloruro mórfico en dilución con suero fisiológico (7,5 mg de succinilcolina más 20 mg de cloruro mórfico con 46,5 ml de suero fisiológico) a una velocidad media de 6 ml/h.

Una vez anestesiado el animal se procedió a la monitorización y control de ECG periférico y se realizó toracotomía lateral izquierda en el quinto espacio intercostal. Posteriormente se efectuó pericardiectomía y disección proximal (serie I) o distal (series II y III) de la DA, colocándose a su alrededor un lazo no traumático y un medidor electromagnético de flujo. En todos los casos se implantaron 2 pares de cristales ultrasónicos crónicos siguiendo el eje longitudinal del corazón, situando un par en el subendocardio dependiente de DA (área isquémica) y un par en el subendocardio dependiente de la arteria circunfleja (Cx, área testigo). Para la medida de la presión ventricular izquierda (PVI) se colocó un catéter en la cámara ventricular a través de su pared libre.

Durante la fase de quirófano se controlaron los siguientes parámetros de función global: frecuencia cardíaca (FC), presión sistólica del ventrículo izquierdo (PVI) y  $dp/dt$  de PVI. También determinamos los parámetros de función regional: longitudes telediastólica (LTD), telesistólica (LTS) y fracción de acortamiento segmentario (FAC) en ambas áreas, isquémica y testigo.

Se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica y de la vena coronaria segmentaria, en tubos provistos de EDTA, en los siguientes momentos: *a*) previa a la apertura del tórax (sólo venosa periférica); *b*) previa a la realización del protocolo isquémico; *c*) durante el protocolo isquémico (tras la quinta, décima y quinceava oclusión en las series I y II, y a los 12 min del comienzo de la isquemia en la serie III), y *d*) en la reperusión inmediata.

Una vez finalizadas las oclusiones y tras la retirada del medidor de flujo, del catéter transmiciocárdico de PVI y de los cristales ultrasónicos de la zona control, se cerró el tórax manteniendo exteriorizados los cables procedentes de los cristales de la zona isquémica para controlar diariamente los parámetros de función regional. Los perros se estabularon bajo control veterinario.

## Fase de seguimiento

Durante el período de seguimiento se controlaron los parámetros electrocardiográficos y de función miocárdica regional. Se tomaron muestras de sangre venosa periférica a las 24 h, a los 5 días y, finalmente, a los 10 días (en esta ocasión también sangre coronaria) tras la producción de la isquemia. Cada muestra fue centri-

fugada (2.000 g, 4 °C) y el plasma obtenido conservado a -80 °C hasta el momento de su análisis.

## Determinación de los parámetros bioquímicos

### Determinación de CK-MB

Hemos utilizado el método inmunológico de CK-MB NAC activado, donde las subunidades de la CK-M son inhibidas por un anticuerpo específico sin influir en las CK-B, modificado en 1992 por Boehringer Mannheim (n.º de catálogo 1442414), y descrito por Würzburg et al<sup>18</sup>.

### Determinación de creatinina

Hemos utilizado el método estándar, optimizado en 1997 por Boehringer Mannheim (número de catálogo 1442376), de la Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie<sup>19-21</sup>.

### Determinación de troponina T

Hemos utilizado el método inmunoenzimático, basado en una técnica de ELISA de sándwich con streptavidina desarrollado en 1998 por Boehringer Mannheim (número de catálogo 1556428)<sup>22</sup>.

### Determinación de adenosina

Hemos utilizado una adaptación del método inmunológico descrito por Linden et al<sup>23</sup>.

## Estudios *post mortem*

Diez días después del protocolo isquémico se extrajo el corazón del animal, se lavó con solución salina isotónica y se canalizaron la aorta y la arteria coronaria descendente anterior justo por detrás de la ligadura. Posteriormente se perfundió el corazón durante un minuto con una solución saturada de azul de metileno (4%) a través de la cánula situada en la aorta y, simultáneamente y a la misma presión, con una solución salina isotónica, a través de la cánula situada en la arteria coronaria descendente anterior, justo detrás de la ligadura. A continuación se quitaron las cánulas, se lavó el corazón con solución salina isotónica y se procedió a disecar el ventrículo izquierdo; posteriormente se seccionó en rodajas de medio centímetro de espesor.

Para cuantificar la zona de riesgo se pesaron las distintas zonas de cada rodaja. El peso de las zonas coloreadas por el azul de metileno, que se correspondían con el área de riesgo (AR), más el peso de las zonas coloreadas constituirían el peso del ventrículo izquierdo (peso VI). El cociente AR/peso VI nos da un índice (expresado como porcentaje) que cuantifica el tamaño de la zona de riesgo del ventrículo izquierdo.

TABLA 1. Parámetros de función global

	FC (lat/min)			PVI (mmHg)			dP/dt (mmHg/s)		
	SI	SII	SIII	SI	SII	SIII	SI	SII	SIII
Basal	200 ± 17,3	238 ± 46,6	200 ± 23,5	172 ± 5,2	191,6 ± 24,6	183,6 ± 19,1	3.166,7 ± 520,4	3.350 ± 1.398,7	3.300 ± 410,8
Tras PI	170 ± 10	223 ± 55,4	175 ± 57	165 ± 23,6	168,8 ± 31,3	189 ± 18,7	2.666,7 ± 1.414,2	2.850 ± 858,8	3.400 ± 487,3
Día 10	253 ± 47,3	234 ± 37,1	208 ± 51,8	191 ± 7,8*	198,8 ± 18,7	179,2 ± 28,8	3.250 ± 1.414,2	3.500 ± 586,3	3.225 ± 575,5

\*p < 0,05, significación respecto a valor basal.

PI: protocolo isquémico (vigésima isquemia SI y SII; quinceava isquemia SIII); tras PI: vigésima reperusión SI y SII, quinceava reperusión SIII.

TABLA 2. Parámetros de función regional (zona isquémica)

	LTD (mm)			LTS (mm)			Fac (%)		
	SI	SII	SIII	SI	SII	SIII	SI	SII	SIII
Basal	12,3 ± 1,4	12,1 ± 0,7	13,9 ± 1,4	10,6 ± 1,3	10,7 ± 0,7	12,9 ± 1,4	13,5 ± 6,1	10,9 ± 1,7	7,4 ± 1,5
PI	12,5 ± 1,8	12,5 ± 1,3	13,7 ± 1,3	12,9 ± 1,7	12,7 ± 1,2	13,8 ± 0,7	-4 ± 2,2***	-2,1 ± 1,9***	-2,2 ± 3,8**
Tras PI	12,3 ± 1,6	12,4 ± 1,1	13,9 ± 0,9	11,1 ± 1,8	11,3 ± 1,3	13,1 ± 1	10,2 ± 5,8	9,1 ± 4,5	6,3 ± 1,3
24 h	11,9 ± 2,1	11,3 ± 1,2	13,5 ± 1,4	11,01 ± 2,3	10,1 ± 0,7	12,3 ± 1,4	8,5 ± 4,4	10,9 ± 3,3	8,5 ± 1,3
5 días	11,8 ± 2,6	11,9 ± 0,9	13,2 ± 1,1	11,1 ± 2,3	10,6 ± 1	12,4 ± 0,3	5,8 ± 3,9*	10,7 ± 1,8	6,1 ± 2
10 días	11,4 ± 1,3	13,9 ± 1,9	14 ± 1,01	10,2 ± 1,5	12 ± 1,8	11,6 ± 1,2	10,3 ± 4,2	9,8 ± 2,9	8,2 ± 2,3

PI: protocolo isquémico (vigésima isquemia SI y SII; quinceava isquemia SIII); tras PI: vigésima reperusión SI y SII, quinceava reperusión SIII.

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001, respecto a valor basal.

## Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se consideraron las medias de cada situación y parámetro y su desviación estándar. Se comprobó la proximidad a la normalidad de las distribuciones mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov; dependiendo de las distribuciones, la comparación de las medias se realizó utilizando como test no paramétrico el test de Wilcoxon para muestras relacionadas y como paramétrico el test de la t de Student y el análisis de la variancia (ANOVA) para comparaciones múltiples. Se realizaron correlaciones entre la fracción de acortamiento regional y los parámetros bioquímicos. Un valor de p < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Los valores de las tablas, figuras y texto se expresan como media ± desviación estándar. En el estudio de los parámetros de función cardíaca global y miocárdica regional se compararon los valores obtenidos en las distintas fases del estudio respecto a la situación basal (previo al protocolo isquémico); en el estudio de los parámetros bioquímicos se compararon los valores de las distintas fases con los previos a la apertura del tórax, así como con los previos al protocolo isquémico. También se compararon los valores de los parámetros bioquímicos de las distintas fases entre sangre venosa coronaria y periférica.

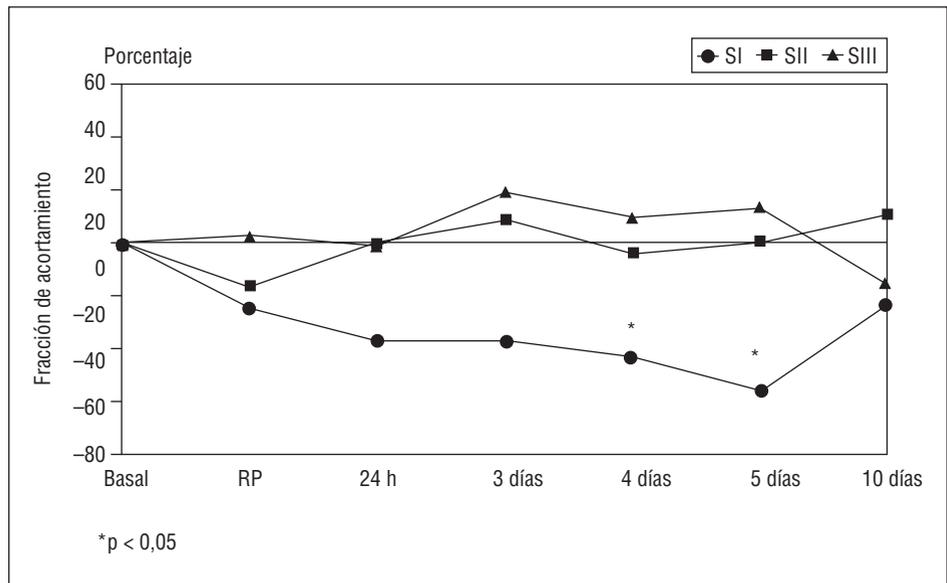
## RESULTADOS

### Parámetros de función

En la tabla 1 se exponen los valores para las tres series de los distintos parámetros de función global en

situación basal, tras la realización del protocolo isquémico y a los 10 días del mismo. Tan sólo en la SI algunos valores de presión ventricular izquierda (PVI) resultan significativamente más elevados al compararlos con los valores basales (191 ± 7,8 mmHg al décimo día frente a 172 ± 5,2 mmHg, basal; p < 0,05). Los valores de frecuencia cardíaca (FC) y dP/dt de PVI no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las tres series.

En la tabla 2 se exponen los valores de los parámetros de contractilidad regional (LTD, LTS y FAC) correspondientes a las tres series en situación basal, durante y a las 24 h, 5 y 10 días de haber aplicado el protocolo isquémico. Los valores de LTD y LTS no demostraron diferencias significativas respecto al valor basal en ninguna de las series. La fracción de acortamiento miocárdico segmentario en la SI sufrió un descenso durante las oclusiones hasta valores de discinesia, normalizándose durante las reperfusiones. A medida que aumentaba el número de oclusiones, los valores de la fracción de acortamiento descendían. Al finalizar el protocolo isquémico, la FAC presenta una afectación de un 24,4% con respecto a la basal (13,5 ± 6,1 frente a 10,2 ± 5,8%). En los días siguientes, correspondientes al período de aturdimiento miocárdico, se produce un deterioro progresivo que alcanza su máximo el quinto día (5,82 ± 3,9%; p < 0,05); a partir de ese día comienza a recuperarse la FAC hasta el día 10 (fig. 1). Sin embargo, en las series II y III la fracción de acortamiento sólo alcanza valores de discinesia durante las oclusiones coronarias (serie II: 10,9 ± 1,7% frente a -2,1 ± 1,9%; p < 0,001; serie III: 7,4 ± 1,5



**Fig. 1.** Fracción de acortamiento miocárdico segmentario de la zona isquémica en las tres series, en situación basal, tras el protocolo isquémico (RP) y en los días de seguimiento (24 h, días 3, 4, 5 y 10). Comparación respecto a situación basal.

frente a  $-2,2 \pm 3,8\%$ ;  $p < 0,001$ ), y no existen diferencias significativas ni tras el protocolo isquémico ni en la etapa de seguimiento (tabla 2).

### Determinaciones enzimáticas

#### Creatincinasa

La CK se elevó de un modo significativo tras la apertura de tórax, antes de inducir isquemia miocárdica, en las tres series (SI:  $100 \pm 24$  frente a  $267 \pm 37$  U/l;  $p < 0,05$ ; SII:  $140 \pm 36$  frente a  $381 \pm 154$  U/l;  $p < 0,05$ ; SIII:  $203 \pm 91$  frente a  $755 \pm 513$  U/l;  $p < 0,05$ ). La elevación fue de similar rango en la sangre venosa periférica que en la coronaria (fig. 2). La CK permaneció elevada durante la aplicación de los distintos protocolos de isquemia, en las tres series y a las 24 h de la inducción de la isquemia se alcanzaron las concentraciones más altas (SI:  $788 \pm 95$  U/l; SII:  $1.103 \pm 507$  U/l,  $p < 0,05$ ; SIII:  $2.205 \pm 804$  U/l,  $p < 0,05$ ). A los 5 días la CK permanecía significativamente elevada en las tres series (SI:  $302 \pm 62$  U/l,  $p < 0,05$ ; SII:  $360 \pm 170$  U/l,  $p < 0,05$ ; SIII:  $568 \pm 287$  U/l,  $p < 0,05$ ). No existieron diferencias al comparar las concentraciones de CK en las distintas fases del estudio entre las muestras de sangre venosa periférica y coronaria.

#### CK-MB

El comportamiento de la fracción MB es parecido a la CK. Tras la apertura del tórax y antes de la inducción de la isquemia miocárdica hay una elevación significativa en sangre venosa periférica (SI:  $6,8 \pm 2,7$  frente a  $14,1 \pm 4,6$  U/l,  $p < 0,05$ ; SII:  $8,9 \pm 1,9$  frente a  $17,01 \pm 8,6$  U/l,  $p < 0,05$ ; SIII:  $9,5 \pm 2,7$  frente a  $25,3 \pm 17,6$ ,  $p < 0,05$ ) que se mantiene durante 5 días para

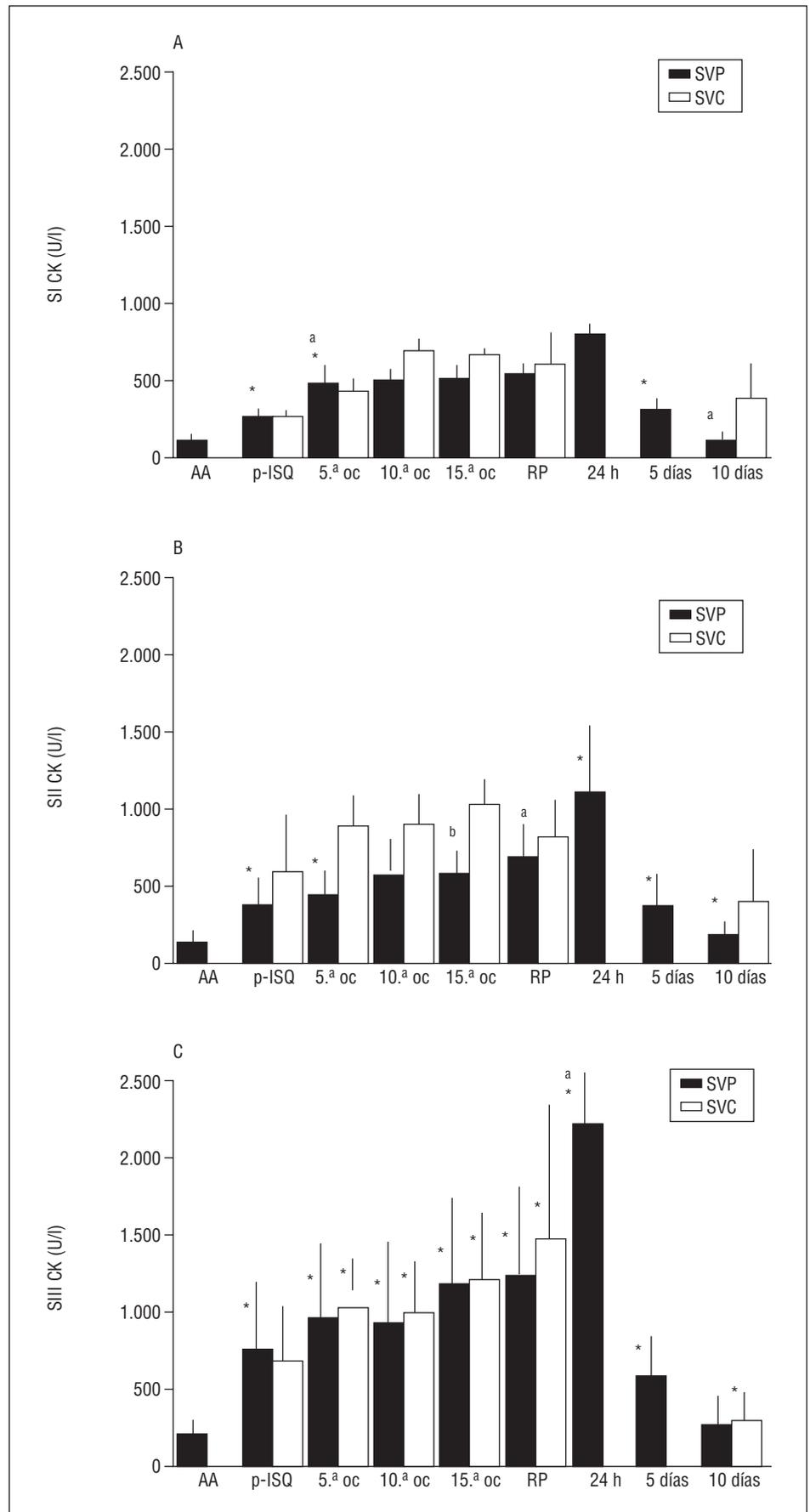
normalizarse en las muestras del día 10 (fig. 3). Las concentraciones más altas se suelen dar a las 24 h en las tres series (SI:  $57,8 \pm 14,3$  U/l,  $p < 0,05$ ; SII:  $43,7 \pm 18,3$  U/l,  $p < 0,05$ ; SIII:  $46,9 \pm 23,3$  U/l,  $p < 0,05$ ). En las muestras de sangre venosa coronaria se observó una elevación durante las isquemias (SI:  $12,4 \pm 3,3$  frente a  $35,2 \pm 10$  U/l,  $p = NS$ ; SII:  $25,2 \pm 14,6$  frente a  $59,1 \pm 30,8$  U/l,  $p = NS$ ; SIII:  $28,4 \pm 12,8$  frente a  $38,3 \pm 14,7$  U/l,  $p < 0,05$ ) correspondiendo a los valores previos a isquemias frente a las quinceavas isquemias en las series I y II y los 12 min de isquemia en la serie III. La SIII mantuvo los concentraciones elevadas significativamente a los 60 min de reperusión ( $43,1 \pm 16,3$  U/l;  $p < 0,01$ ) (fig. 3).

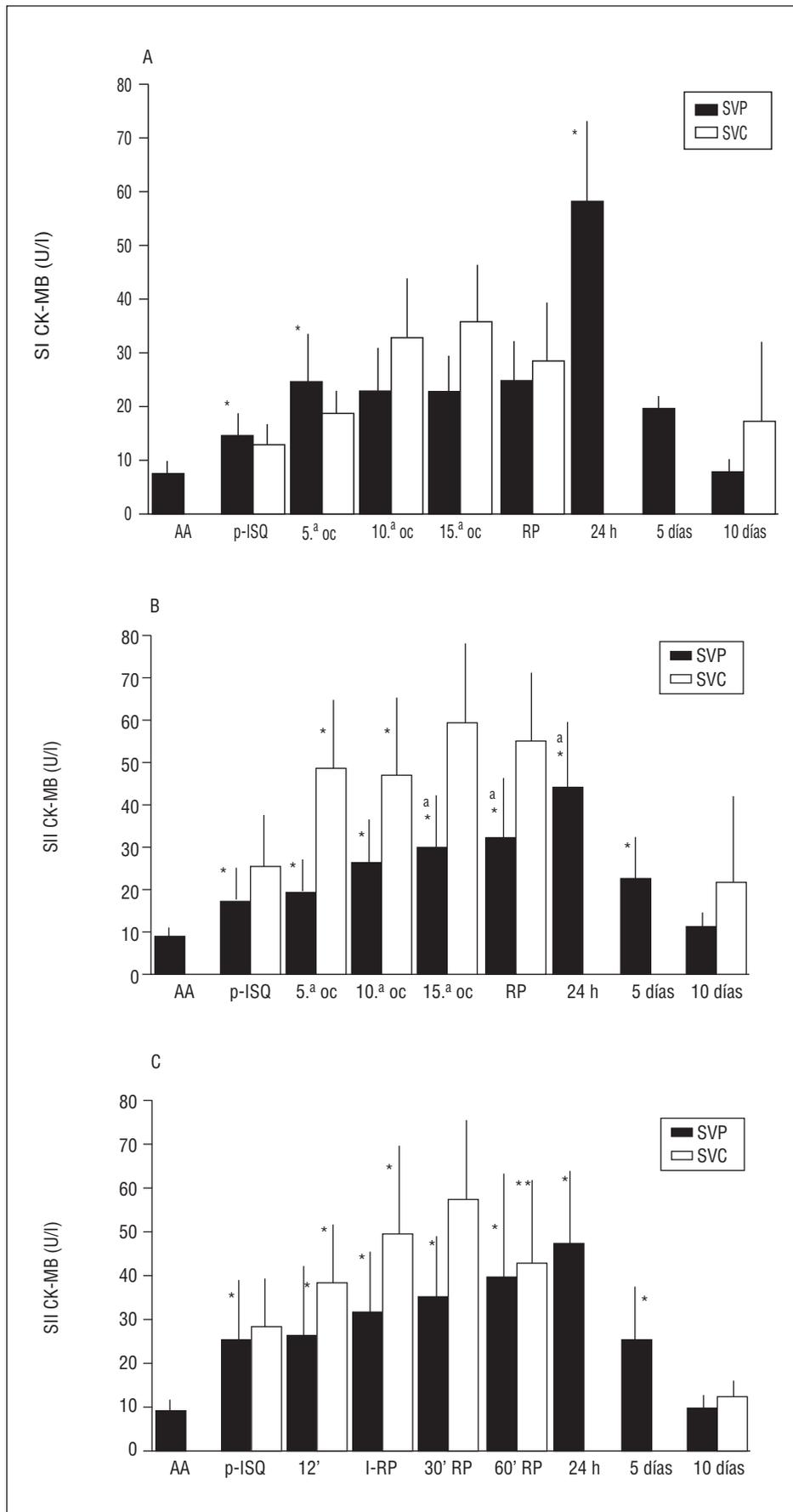
#### Adenosina

En las series I y II (oclusiones cortas y múltiples) no se produjo ningún movimiento significativo de las concentraciones de adenosina. En la serie III (oclusión única de 15 min) se produjo una elevación significativa y muy marcada ( $0,30$  frente a  $1,10$   $\mu\text{mol/l}$ ) durante la reperusión con vuelta a la normalidad en controles posteriores.

#### Troponina T

La apertura del tórax no produjo ninguna elevación en las concentraciones venosas de troponina T, tanto si se medía en sangre periférica como coronaria. En sangre periférica los valores basales de troponina T fueron: SI:  $0,05 \pm 0,02$  ng/ml, SII:  $0,06 \pm 0,1$  ng/ml y SIII:  $0,07 \pm 0,05$  ng/ml. Se elevaron desde la quinta oclusión en las series II ( $0,16 \pm 0,1$  ng/ml,  $p = NS$ ) y III ( $0,1 \pm 0,1$  ng/ml,  $p = NS$ ) y el minuto doceavo de isquemia en la serie III ( $0,4 \pm 0,2$  ng/ml,  $p < 0,05$ ), a





**Fig. 3.** Concentraciones de CK-MB en plasma (media ± DE) de sangre venosa periférica (SVP) y de la vena coronaria segmentaria (SVC) tomadas en los siguientes tiempos: AA (antes de la anestesia); p-ISQ (previo al protocolo isquémico); 5.<sup>a</sup> oc, 10.<sup>a</sup> oc, 15.<sup>a</sup> oc (quinta, décima y quinceava oclusión, respectivamente); RP (tras la vigésima reperusión); 24 h (a las 24 horas) y a los 10 días. A) serie I; B) serie II; C) serie III. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 (concentraciones plasmáticas en las diferentes fases frente a AA en SVP; frente a p-ISQ en SVC), y <sup>a</sup>p < 0,05 (concentraciones plasmáticas en las diferentes fases frente a p-ISQ en SVP).

las 24 h (SI:  $0,1 \pm 0,01$ ,  $p < 0,05$ ; SII:  $0,2 \pm 0,2$  ng/ml,  $p < 0,05$ ; y SIII:  $0,2 \pm 0,2$  ng/ml,  $p < 0,05$ ) y hasta los 5 días (SI:  $0,2 \pm 0,1$ ,  $p = \text{NS}$ ; SII:  $0,2 \pm 0,1$ ,  $p = \text{NS}$ ; SIII:  $0,4 \pm 0,2$ ,  $p = \text{NS}$ ) todavía permanecían elevadas (fig. 4).

Las muestras de sangre coronaria evidenciaron en las series I y II una elevación significativa de troponina T más precozmente. A partir de la quinta oclusión en la serie II ( $1,3 \pm 1,9$  frente a  $3,2 \pm 4,2$  ng/ml,  $p < 0,05$ ) y desde la décima oclusión en la serie I ( $0,04 \pm 0,02$  frente a  $1,6 \pm 1,6$  ng/ml,  $p < 0,05$ ). En la serie III la elevación se produjo a partir del minuto 12 ( $0,2 \pm 0,1$  frente a  $4,8 \pm 8,7$  ng/ml,  $p < 0,05$ ). En todas las series las concentraciones de troponina T fueron mayores en las muestras de sangre venosa coronaria (fig. 4).

### Determinación del área isquémica

El área de riesgo (AR/peso VI) obtenida en los casos en que la ligadura se realizó en el tercio superior de la DA ha sido del  $25 \pm 7\%$  del ventrículo izquierdo. En el caso en que la ligadura se practicaba en la zona distal el área de riesgo ha sido del  $8 \pm 1,1\%$  del mismo ventrículo.

### DISCUSIÓN

Desde las descripciones iniciales de los métodos de medida de la concentración de troponina T, numerosos trabajos han evaluado su eficacia diagnóstica en el infarto agudo de miocardio<sup>9,24,25</sup>. Sin embargo, no hay estudios referidos a situaciones de isquemia transitoria sin presencia de necrosis. La finalidad del presente trabajo ha sido conocer la utilidad de las determinaciones de troponina para detectar procesos isquémicos transitorios repetidos o aislados, silentes o evidentes, en ausencia de necrosis miocárdica.

En estudios previos realizados por nuestro grupo<sup>16,17</sup> hemos observado cómo episodios de isquemias muy breves (2 min), seguidos de reperfusiones de muy corta duración (3 min) y que podrían ser equivalentes a episodios de isquemia silente, son capaces de ocasionar aturdimiento miocárdico cuando éstos son repetidos. El análisis de la ultraestructura de este tejido, en ausencia de necrosis, demostró una mayor presencia de mitocondrias dañadas con un incremento de los procesos de fusión mitocondrial, entre mitocondrias de sarcómeros contiguos, que pronostican la presencia de alteraciones en el citosqueleto del cardiomiocito, y más concretamente en las bandas Z<sup>16</sup>.

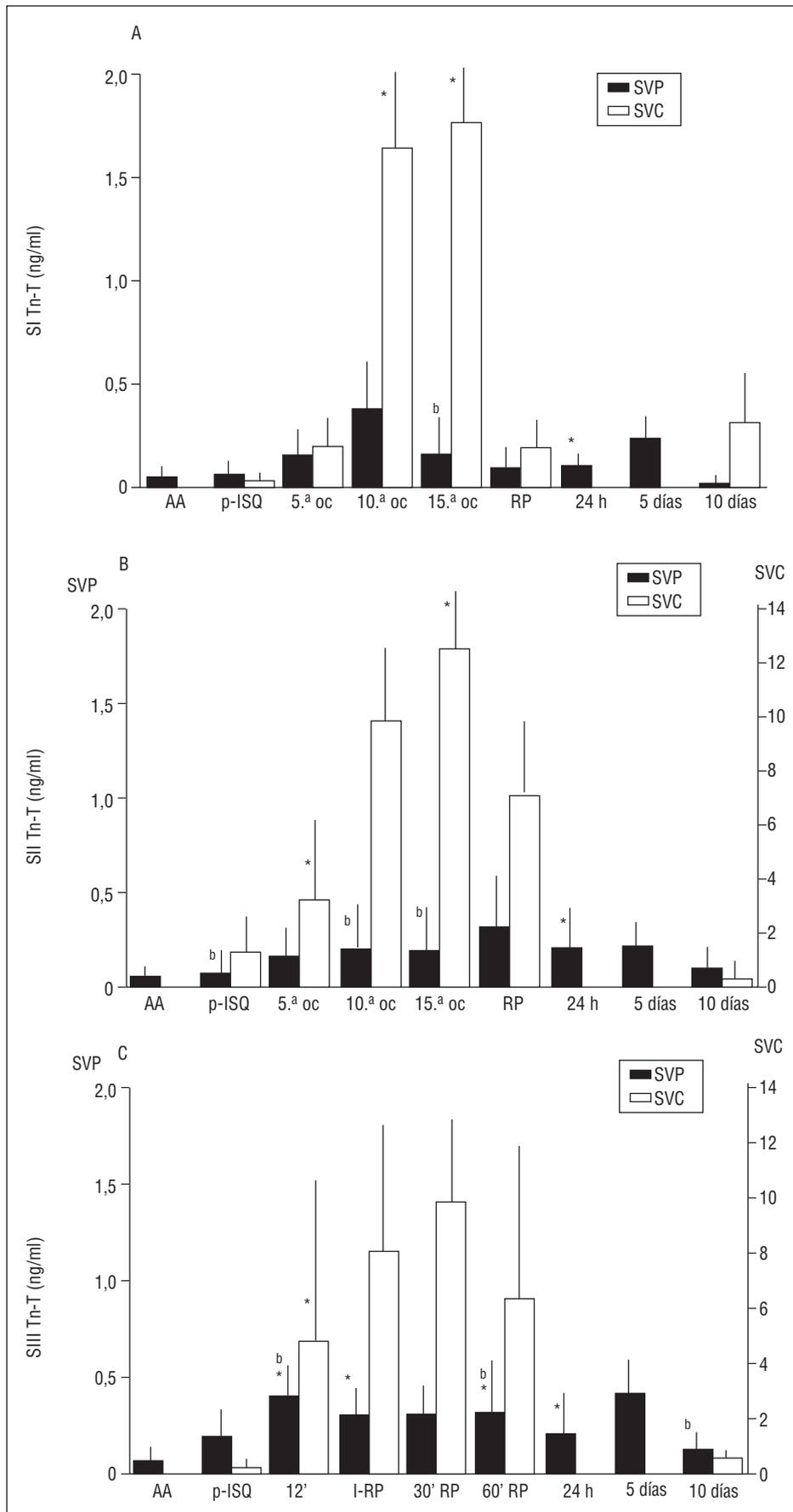
Debido a la importancia que las bandas Z tienen en la contractilidad, por su estrecha relación con los miofilamentos, consideramos interesante valorar las concentraciones de troponina T como marcador de la disfunción celular durante el aturdimiento miocárdico, comparando los resultados con otros marcadores de lesión, como la adenosina<sup>26</sup> y la CK-MB. Tenemos que

indicar que, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, no hemos observado variaciones estadísticamente significativas en las concentraciones plasmáticas de CK-MB de animales sometidos a nuestro protocolo isquémico<sup>17</sup>. Este dato resalta la importancia que podría tener la detección de troponina T en el diagnóstico de procesos de isquemia de muy corta duración, posiblemente dentro del rango que en la clínica humana originan episodios de isquemia silente.

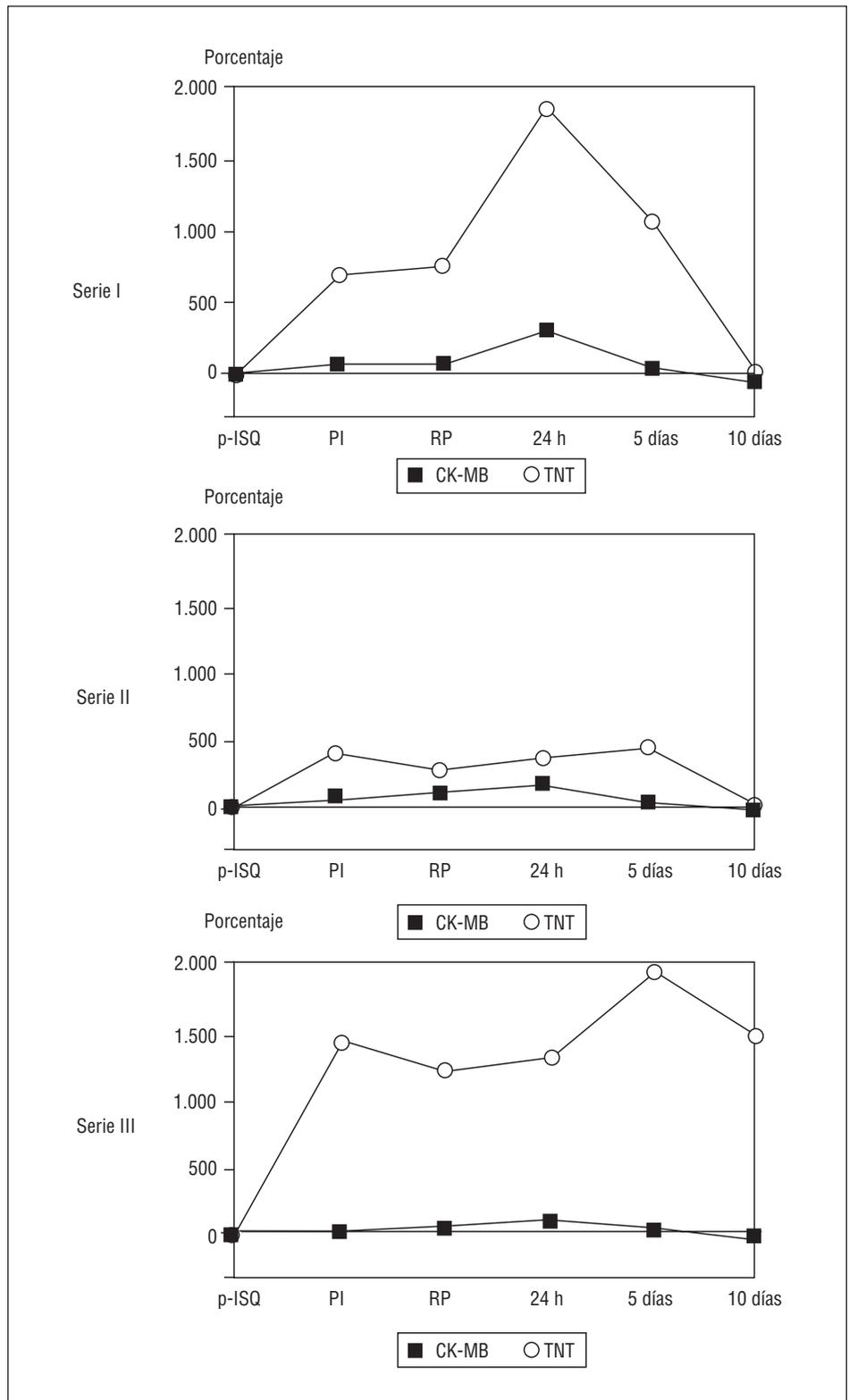
El primer aspecto que consideramos de interés diagnóstico con respecto a diversos marcadores bioquímicos liberados desde los cardiomiocitos es que la troponina T es mucho más específica que la CK-MB, ya que los valores de esta última podrían verse enmascarados por la liberación de la CK-MB procedente del músculo esquelético lesionado por la apertura del tórax. De este modo, se puede observar en nuestro estudio un aumento significativo en la concentración de CK-MB antes de inducir ningún tipo de isquemia miocárdica, mientras que en la troponina T no hay incremento hasta que se produce isquemia miocárdica. La razón se debe a que la troponina T cardíaca está codificada por genes diferentes de la troponina presente en el músculo esquelético y ambas poseen estructuras moleculares suficientemente diferenciadas como para poder ser identificadas adecuadamente por inmunoanálisis específicos<sup>27</sup>. La adenosina resultó ser un marcador poco sensible de daño miocárdico menor, elevándose sólo en la serie III de isquemia más prolongada, seguramente debido a que en esta serie se produce más degradación de ATP en adenosina, tanta como para ser detectada en plasma, hecho que no ocurre en las otras series.

La troponina T se elevó de modo significativo en las tres series, con características diferentes. En uno de los dos modelos experimentales utilizados en este estudio (series I y II) se inducen isquemias miocárdicas repetidas de muy breve duración imitando la isquemia silente. En este modelo no se observa necrosis<sup>16</sup>, ni tampoco alteraciones permanentes en la contractilidad, como ocurre cuando existe necrosis<sup>28,29</sup> o puede ocurrir en caso de hibernación<sup>30,31</sup>. Se produce un máximo de alteración de la función coincidiendo en el quinto día de seguimiento<sup>16</sup>, siempre que las oclusiones se realicen proximales en la coronaria descendente anterior (serie I). Cuando la oclusión coronaria (múltiple o única) es proximal, el área de miocardio afectado es mayor (25%). Sin embargo, cuando la oclusión se practica en la zona distal el área de miocardio afectado es menor (8%) y la función está recuperada en 24 h.

Todos los cambios en la motilidad regional se recuperan espontáneamente en las tres series, existiendo cierto grado de aturdimiento hasta los 10 días en la serie I. En estudios previos<sup>32</sup> en una serie de perros sometidos a una isquemia parcial (reducción del flujo coronario entre un 30-60% del basal) y transitoria (15 min de duración) de la arteria descendente anterior, a



**Fig. 4.** Concentraciones de troponina T en plasma (media  $\pm$  DE) de sangre venosa periférica (SVP) y de la vena coronaria segmentaria (SVC) tomadas en los siguientes tiempos: AA (antes de la anestesia); p-ISQ (previo al protocolo isquémico); 5.<sup>a</sup> oc, 10.<sup>a</sup> oc, 15.<sup>a</sup> oc (quinta, décima, quinceava oclusión, respectivamente); RP (tras la reperusión); 24 h (a las 24 horas) a los 5 y a los 10 días. A) serie I; B) serie II; C) serie III. \* $p < 0,05$  (concentraciones plasmáticas en las diferentes fases frente a AA en SVP; frente a p-ISQ en SVC); <sup>b</sup> $p < 0,05$  (SVP frente a SVC).



**Fig. 5.** Comparación del incremento de las concentraciones de TnT frente a CK-MB, en plasma de sangre venosa periférica.

nivel proximal, se observó que a los 5 días se mantenía una afectación de la contractilidad miocárdica (71,5% de descenso de la fracción de acortamiento). Esto, unido a los resultados que estamos comentando, nos indica que es el área miocárdica sometida a isquemia un

determinante importante de la duración del aturdimiento miocárdico.

La troponina T en sangre periférica aumenta en las tres series desde el momento de inducción de la isquemia: 320% en la serie I (quinta isquemia); 166% en la

serie II (quinta isquemia) y 571% en la serie III (doceava isquemia). En la serie I se alcanzó el valor máximo durante la isquemia (décima oclusión) y seguía elevado hasta 5 días. En la serie III, de isquemia única, la máxima elevación se produjo también durante la isquemia y se mantuvo hasta el quinto día. En la serie II (oclusiones distales múltiples y de breve duración) el incremento en la concentración sérica en sangre venosa periférica de troponina T se elevó durante la isquemia y alcanzó significación estadística a las 24 h (fig. 4). En la serie I, las 20 oclusiones de 2 min suponen un tiempo total de 40 min de isquemia, frente a los 15 min de la serie III; sin embargo, es en esta serie donde se liberó la mayor cantidad de troponina, desde la inducción de la isquemia hasta los 10 días, a pesar de que la oclusión fue distal y comprometió a una menor masa miocárdica. A la luz de estos resultados parece ser que la prolongación del proceso de isquemia es un importante determinante para la liberación de troponina T, mientras que la fragmentación de dicho proceso minimiza su liberación<sup>33</sup>. La presencia de numerosos procesos de reperfusión, con el aporte de radicales libres que ello supone, resulta de menor importancia para la liberación de troponina. Parece ser que los miofilamentos son más sensibles a la isquemia y está claro que, si ésta se fracciona en episodios breves, los daños no son aditivos.

En contra de lo que cabe esperar, no existe relación directa entre la elevación de las concentraciones de troponina y la presencia de un área de miocardio aturrido. La serie I presentó un aturdimiento miocárdico máximo en el quinto día, la serie III presentó las concentraciones más altas de troponina durante la isquemia y en el día quinto sin que se pudiera objetivar ninguna alteración en la función contráctil. Pueden, por tanto, permanecer elevadas las concentraciones de troponina en sangre sin que exista aturdimiento miocárdico; no sabemos si lo contrario es cierto.

Finalmente, en las tres series la elevación de la troponina se producía de un modo muy precoz y siempre durante la aplicación del proceso de isquemia: cuando eran oclusiones de 2 min se necesitaban entre 5 y 10 oclusiones y cuando la isquemia inducida era continua se necesitaban más de 10 min para alcanzar cifras de elevación con valor estadístico.

En las tres series, la CK-MB aumentó significativamente tras la apertura del tórax y se mantuvo elevada hasta el quinto día tras las isquemias. Esta menor sensibilidad de la CK-MB frente a la troponina puede deberse a que, a consecuencia del recambio celular normal de las células musculoesqueléticas, la concentración de CK-MB se encuentra entre 6 y 10 U/l<sup>34</sup>, mientras que las concentraciones de troponina T son muy inferiores, no alcanzando ni superando una gran parte de las muestras, en condiciones basales, el nivel de sensibilidad del test empleado<sup>35</sup>. Por ello, en el caso de la CK-MB, hasta que la lesión miocárdica provoque

la liberación masiva de moléculas, como ocurre en las necrosis que sobrepasan el rango de estas concentraciones, no será detectada. Esto nos indica que la troponina T es un marcador mucho más sensible que la CK-MB, al ser su presencia en sangre casi nula, por lo que lesiones leves (reversibles) de los cardiomiocitos favorecen la rápida liberación de la fracción de esta molécula disuelta en el citoplasma celular y permiten diagnosticar alteraciones mínimas equivalentes en la clínica a isquemia silente o asintomática, sobre todo si son repetitivas, hechos que no se producen con la CK-MB. En la figura 5 comparamos el comportamiento de la troponina y la CK-MB en las tres series.

En consecuencia, puede decirse que la troponina T es un buen marcador de isquemia sin que exista necrosis, y en estas situaciones sus concentraciones en sangre se presentan elevadas ya en la isquemia y se mantienen durante días. Esta situación podría corresponder a mecanismos de lesión por isquemias prolongadas e inferiores a 20-30 min, o frecuentes procesos breves de isquemia/reperfusión, pudiendo coincidir o no su elevación con alteraciones transitorias de la contractilidad (aturdimiento)<sup>17</sup>.

La determinación de las concentraciones de troponina T puede ayudar a resolver un problema muy frecuente en la clínica ambulatoria y de urgencias, como es la identificación diagnóstica de los dolores torácicos<sup>36</sup>; aunque el resultado negativo no garantizaría que el origen no fuera isquémico (aislados y de corta duración). La troponina T frecuentemente elevada puede identificar a pacientes con cardiopatía isquémica silente y frecuentes procesos isquémicos. Se conoce que es útil para establecer el pronóstico, identificando a pacientes con angina inestable de alto riesgo cuando tienen concentraciones de troponina T elevadas<sup>37</sup>. Así mismo, la angina inestable con poca o nula elevación de troponina no suele desembocar en infarto de miocardio<sup>36,38</sup>.

Por otra parte, la troponina también se eleva en presencia de necrosis, por lo que necesitamos de otros marcadores de necrosis (CK-MB) para establecer el diagnóstico diferencial.

En resumen, podemos concluir que la troponina T es un marcador muy sensible y específico de lesiones reversibles de las células miocárdicas después de isquemias transitorias y, por tanto, de daño miocárdico menor. En los modelos utilizados es un marcador de lesión muy precoz.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Turi ZG, Rutherford JD, Roberts R, Muller JE, Jaffe AS, Rude RR et al. Electrocardiographic, enzymatic and scintigraphic criteria of acute myocardial infarction as determined from study of 726 patients (a MILIS study) *Am J Cardiol* 1985; 55: 1463-1468.

2. Lee TH, Goldman L. Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction: recommendations based on a quantitative analysis. *Ann Intern Med* 1986; 105: 221-233.
3. Hamm CW, Katus HA. New biochemical markers for myocardial cell injury. *Curr Opin Cardiol* 1995; 10: 355-360.
4. Adams JE, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine Kinase the choice for the 1990? *Circulation* 1993; 88: 750-763.
5. Keffer JH. Myocardial markers of injury. Evolution and insights. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 305-320.
6. Siegel AJ, Silverman LM, Holman BL. Normal results of post-race Thallium-201 myocardial perfusion imaging in marathon runners with elevated serum MB creatine kinase levels. *Am J Med* 1985; 79: 431-434.
7. Carrió I, Serra-Grima JR, Berná L, Estorch M, Martínez-Duncker C, Ordóñez J. Transient alterations in cardiac performance after a six-hour race. *Am J Cardiol* 1990; 65: 1471-1474.
8. Apple PS, Rogers MA, Sherman WM. Creatine kinase-MB isoenzyme adaptations in stressed human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1985; 59: 149-153.
9. Katus HA, Remppis A, Neumann FJ, Scheffold T, Diederich KW, Vinar G. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation* 1991; 83: 902-912.
10. Bodor GS, Porter S, Landt Y, Ladenson JH. The development of monoclonal antibodies and an assay for cardiac troponin-I with preliminary results in suspected myocardial infarction. *Clin Chem* 1992; 11: 2203-2214.
11. Mair J, Wagner I, Morass B, Fridrich L, Lechleitner P, Dienstl F et al. Cardiac troponin I release correlates with myocardial infarction size. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 869-872.
12. Voss EM, Sharkey SW, Gernert AE, Murakami MM, Johnston RB, Hsieh CC et al. Human and canine cardiac troponin T and creatine kinase-MB distribution in normal and diseased myocardium. Infarct sizing using serum profiles. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119: 799-806.
13. Tobaceman LS. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu Rev Physiol* 1996; 58: 447-481.
14. Bucher EA, Maisonpierre PC, Konieczny SF, Emerson CP. Expression of the troponin complex genes: transcriptional coactivation during myoblast differentiation and independent control in heart and skeletal muscles. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 4234-4242.
15. Voss EV, Sharkey SW, Gernert AE, Murakami MM, Johnston RB, Hsieh CC. Human and canine cardiac troponin T and creatine Kinase-MB distribution in normal and disease myocardium. Infarct sizing using serum profiles. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119: 799-806.
16. Pomar F, Cosín J, Portolés M, Faura M, Renau-Piqueras J, Hernández A et al. Functional and ultrastructural alterations of canine myocardium subjected to very brief coronary occlusions. *Eur Heart J* 1995; 16: 1482-1490.
17. Pallarés V, Hernández A, Cosín J, Portolés M, Capdevila C, Pomar F et al. Evolución a lo largo de diez días de un modelo de miocardio aturdido mediante isquemias muy breves y repetidas. *Rev Esp Cardiol* 1997; 50: 254-259.
18. Wurzburg U, Hennrich N, Lang H, Prellwitz W, Neumeier D, Knedel M. Determination of creatine kinase-MB in serum using inhibiting antibodies. *Klin Wochenschr* 1976; 54: 357-360.
19. Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. Standard method for the determination of creatine kinase activity. *J Clin Chem Clin Biochem* 1977; 15: 249-260.
20. Szasz G, Gruber W, Bernt E. Creatine kinase in serum. Determination of optimum reaction conditions. *Clin Chem* 1976; 22: 650-656.
21. Gruber W. Inhibition of creatine kinase activity by Ca<sup>2+</sup> and reversing effect of ethylenediaminetetraacetate. *Clin Chem* 1978; 24: 177-178.
22. Katus HA, Looser S, Hallermayer K, Remppis A, Scheffold T, Borgya A et al. Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin Chem* 1992; 38: 386-393.
23. Linden J, Taylor HE, Feldman MD, Woodward EB, Ayers CR, Ripley ML et al. The precise radioimmunoassay of adenosine: minimization of sample collection artifacts and immunocross-reactivity. *Anal Biochem* 1992; 201: 246-254.
24. Rottbauer W, Gretten M, Müller-Bardorff A, Remppis A, Zehelein J, Grünig E et al. Troponin T: a diagnostic marker for myocardial infarction and minor cardiac cell damage. *Eur Heart J* 1996; 17: 3-8.
25. Roberts R. Rapid MB CK subform assay and the early diagnosis of myocardial infarction. *Clin Lab Med* 1997; 17: 669-683.
26. Ramani K, Lust WB, Whittingham TS, Lesnepky EJ. ATP catabolism and adenosine generation during ischemia in the aging heart. *Mech Ageing Dev* 1996; 89: 113-124.
27. Katus HA, Looser S, Hallermayer K, Kempis A, Scheffold T, Borgya A et al. Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin Chem* 1992; 38: 386-393.
28. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wave front phenomenon of ischemic cell death. I. Myocardial infarct size vs duration coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977; 56: 786-794.
29. Reimer KA, Jennings RB. The "wave front phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979; 13: 229-239.
30. Rahimtoola SH. A prospective on the three large multicenter clinical trials of coronary by-pass surgery for chronic stable angina. *Circulation* 1985; 72: 123-135.
31. Rahimtoola SH. The hibernating myocardium. *Am Heart J* 1989; 117: 211-221.
32. Martí S, Pallarés V, Capdevila C, Hernández A, Portolés M, Cosín J. Precondicionamiento isquémico. ¿Es siempre un fenómeno beneficioso? *Rev Esp Cardiol* 1999; 52: 429-436.
33. Solaro RJ, Rarick HM. Troponin and tropomyosin proteins that switch on and turn in the activity of cardiac myofilaments. *Cir Res* 1998; 471-480.
34. Wolfson A, Lindberg E, Su L, Forber S, Dubin SB. Three rapid immunoassay for the determination of creatine Kinase MB: An analytical, clinical and interpretive evaluation. *Am Heart J* 1991; 122: 958-964.
35. Wu AHB, Valdes JRR, Apple FS, Gornet T, Stone MA, Mayfield-Stokes S et al. Cardiac troponin-T immunoassay for diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1994; 40: 900-907.
36. Bertinchant JP, Laperche T, Polge A, Raczka F, Beyne P, Ledermann B et al. Prognostic significance of early raised cardiac troponin I in unstable angina to the identification of a high-risk sub-group. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1998; 90: 1615-1622.
37. Heeschen C, Goldmann BU, Terres W, Hamm CW. Cardiovascular risk and therapeutic benefit of coronary interventions for patients with unstable angina according to the troponin T status. *Eur Heart J* 2000; 21: 1159-1166.
38. Martínez V, Carcasés MJ, Zuazola P. Valor de la troponina sérica en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con daño miocárdico. *Clínica Cardiovascular* 1998; 16: 35-42.