

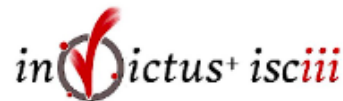
Análisis de miRNAs circulantes como biomarcadores pronóstico de placa vulnerable en pacientes con estenosis carotídea

Procesamiento de placa de ateroma para la extracción de RNA y proteína

Laia Carballo Perich

Grupo de Investigación en Patología Cerebrovascular

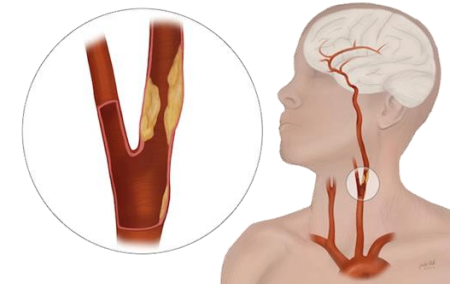
Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta





OBJETIVOS PRINCIPALES DEL PROYECTO

miRNAs circulantes como biomarcadores pronóstico de placa vulnerable en pacientes con estenosis carotídea



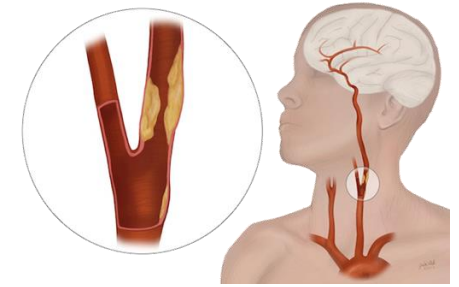
Objetivos:

1. **Caracterizar** un perfil de miRNAs específico de placa vulnerable analizando placas de ateroma extirpadas mediante endarterectomía y muestras de plasma de una cohorte de detección de pacientes con estenosis carotídea de >70% en pacientes sintomáticos, pacientes asintomáticos progresivos y asintomáticos estables y controles sanos.
2. **Validar** los miRNAs circulantes en plasma pronóstico de placa vulnerable en una cohorte independiente de pacientes con estenosis carotídea de >70% sintomáticos, asintomáticos progresivos y asintomáticos estables y controles sanos.
3. **Comparar** los patrones de expresión de miRNAs de las placas de ateroma obtenidas mediante endarterectomía con los miRNAs circulantes en plasma de los mismos pacientes para identificar **diferencias cualitativas y cuantitativas** en la expresión de miRNAs.
4. Determinar si la **inhibición/sobreexpresión** de miRNAs circulantes en plasma predictivos de placa vulnerable modula la **proliferación y respuesta inflamatoria** del modelo de aterosclerosis in vitro.



OBJETIVOS PRINCIPALES DEL PROYECTO

miRNAs circulantes como biomarcadores pronóstico de placa vulnerable en pacientes con estenosis carotídea



Objetivos:

1. Caracterizar un perfil de miRNAs específico de placa vulnerable analizando placas de ateroma extirpadas mediante endarterectomía y muestras de plasma de una cohorte de detección de pacientes con estenosis carotídea de >70% en pacientes sintomáticos, pacientes asintomáticos progresivos y asintomáticos estables y controles sanos.
2. Validar los miRNAs circulantes en plasma pronóstico de placa vulnerable en una cohorte independiente de pacientes con estenosis carotídea de >70% sintomáticos, asintomáticos progresivos y asintomáticos estables y controles sanos.
3. Comparar los patrones de expresión de miRNAs de las placas de ateroma obtenidas mediante endarterectomía con los miRNAs circulantes en plasma de los mismos pacientes para identificar diferencias cualitativas y cuantitativas en la expresión de miRNAs.
4. Determinar si la inhibición/sobreexpresión de miRNAs circulantes en plasma predictivos de placa vulnerable modula la proliferación y respuesta inflamatoria del modelo de aterosclerosis in vitro.



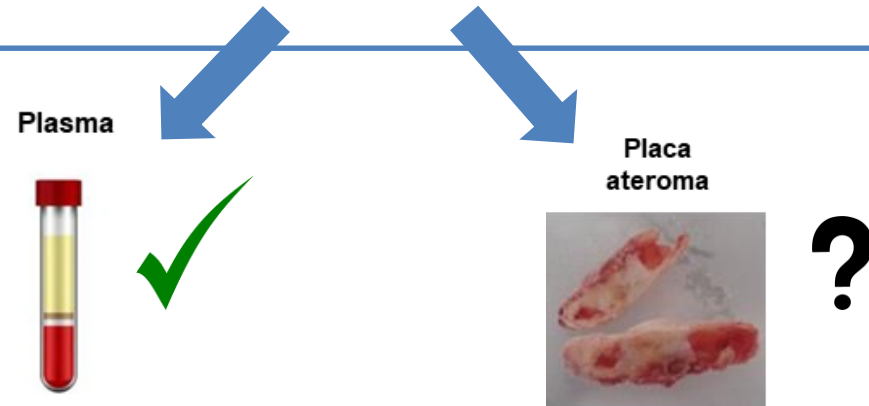
METODOLOGÍA DEL PRIMER OBJETIVO

- 1. Extracción conjunta de RNA y proteína** de muestras de plasma y placa con el kit *mirVana PARIS* (Ambion).
- 2. Retrotranscripción y preamplificación** del RNA extraído con el kit *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis* (Applied Biosynthesis).
- 3. Screening de miRNAs**, se buscará el perfil de miRNAs tanto en placa como en plasma con la tecnología *TaqMan OpenArray Human Advanced MicroRNA Panel* (Applied Biosystems), 754 miRNAs.



METODOLOGÍA DEL PRIMER OBJETIVO

1. **Extracción de RNA y proteína** de muestras de plasma y placa con el kit *mirVana PARIS (Ambion)*.

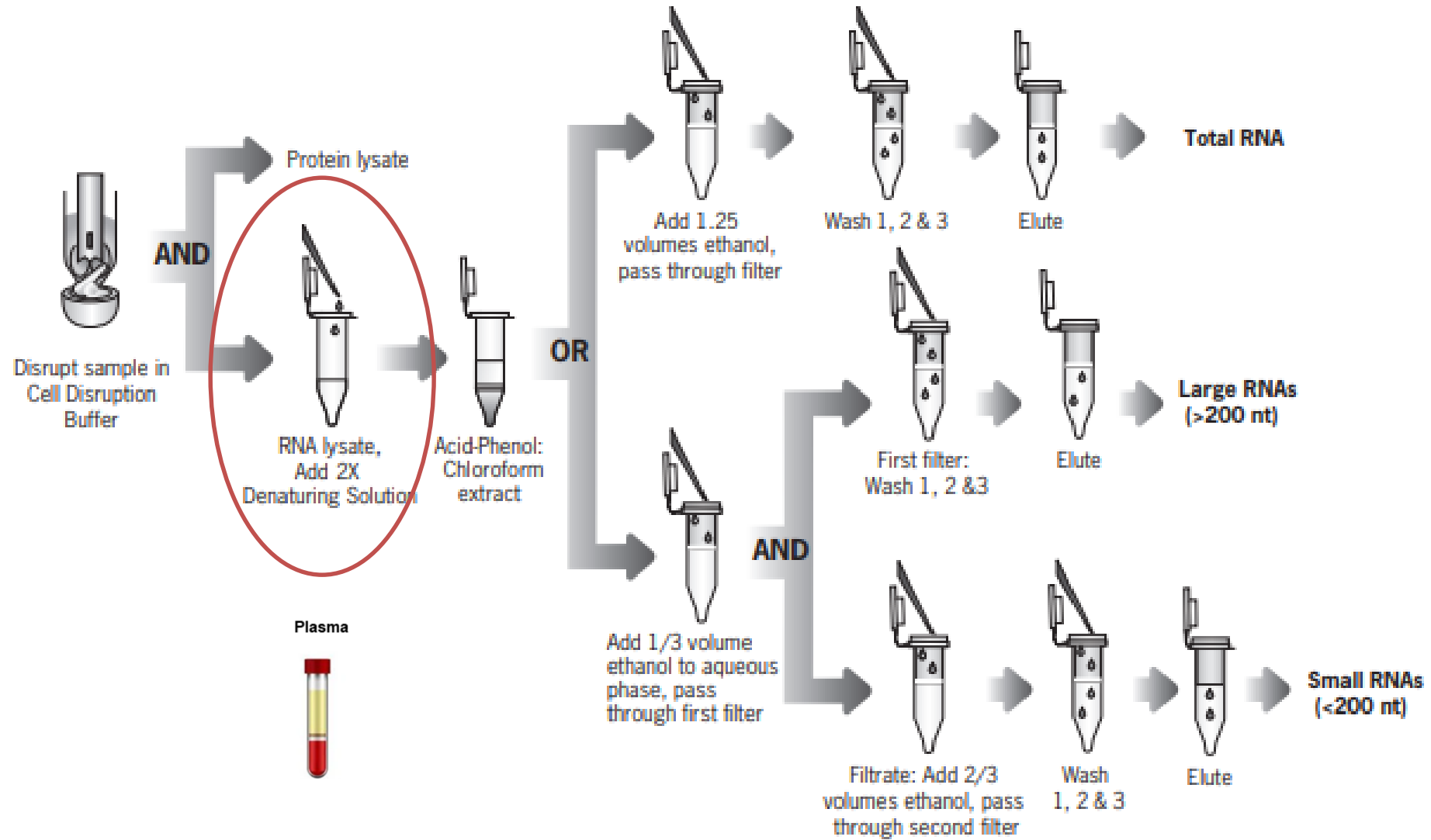


2. **Retrotranscripción y preamplificación** del RNA extraído con el kit *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis (Applied Biosynthesis)*.

3. **Screening de miRNAs**, se buscará el perfil de miRNAs tanto en placa como en plasma con la tecnología *TaqMan OpenArray Human Advanced MicroRNA Panel (Applied Biosystems)*, 754 *miRNAs*.

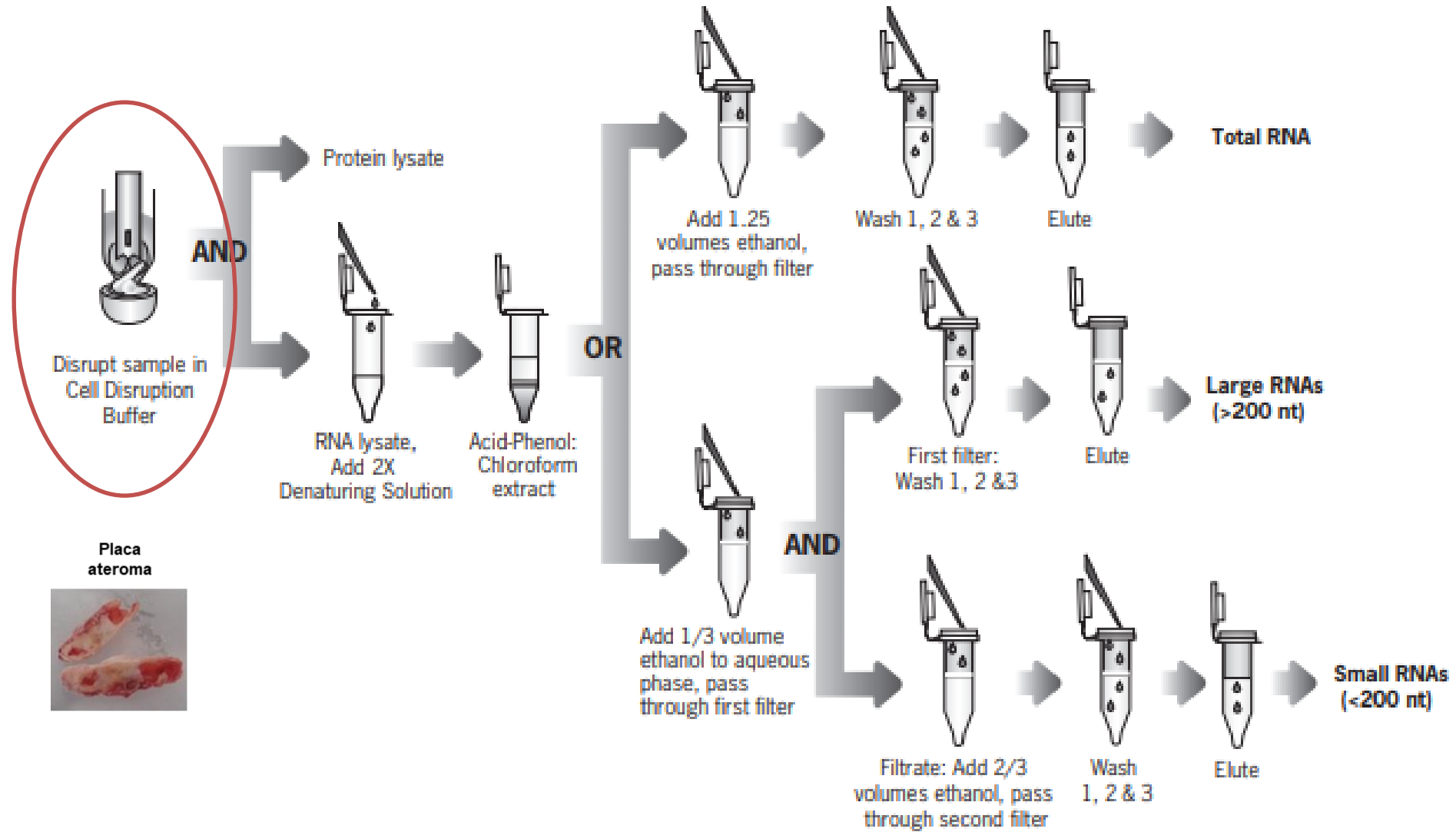


PROCESAMIENTO PLACA DE ATEROMA





PROCESAMIENTO PLACA DE ATEROMA





PROCESAMIENTO PLACA DE ATEROMA

1. Seleccionar el core de cada placa de ateroma y pesarla.

2. Preparación del Cell Disruption Buffer:

- 625ul por cada 100mg de tejido
 - + inhibidores proteasas
 - + inhibidores fosfatasas
 - + inhibidores RNAsas (RNaseOUT) → Testamos diferentes condiciones:



2 x 500U/ml RNaseOUT

2 x 250U/ml RNaseOUT

4 x 0U/ml RNaseOUT

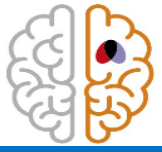


PROCESAMIENTO PLACA DE ATEROMA

3. Organizar el material:

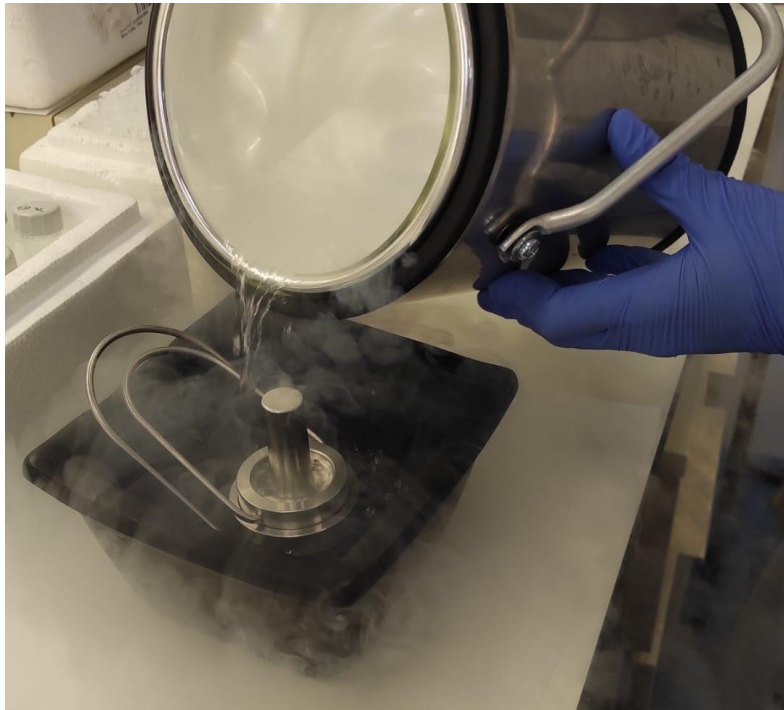
- Cell Disruption Buffer preparado en diferentes eppendorfs con el volumen específico para cada placa.
- Pinzas, espátula, mortero, maza y recipiente para el nitrógeno líquido.





PROCESAMIENTO PLACA DE ATEROMA

4. Enfriar el mortero con nitrógeno líquido:



5. Sacar el mortero de la cubeta e introducir la placa de ateroma dentro:





PROCESAMIENTO PLACA DE ATEROMA

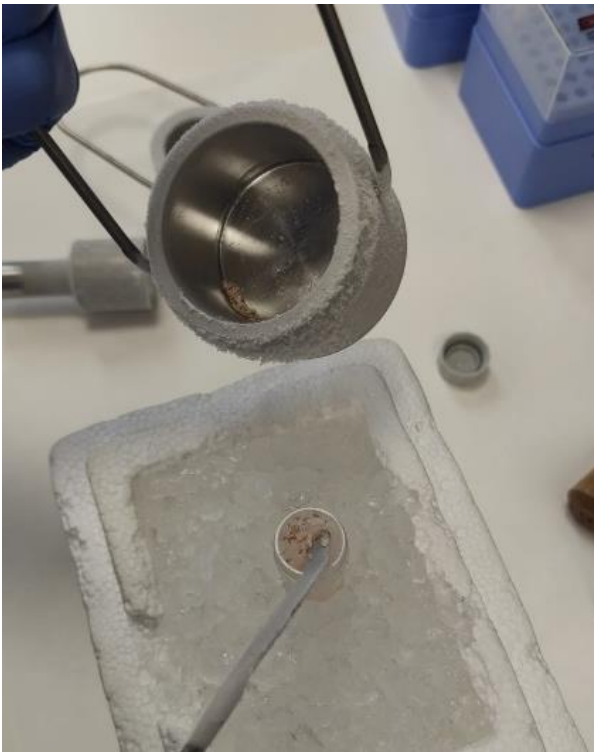
6. Dar golpes con la maza hasta convertir la placa en polvo:





PROCESAMIENTO PLACA DE ATEROMA

7. Traspasar el polvo de placa al eppendorf con Cell Disruption Buffer:



8. Acabar de homogeneizar la muestra con el homogeneizador UltraTurrax:



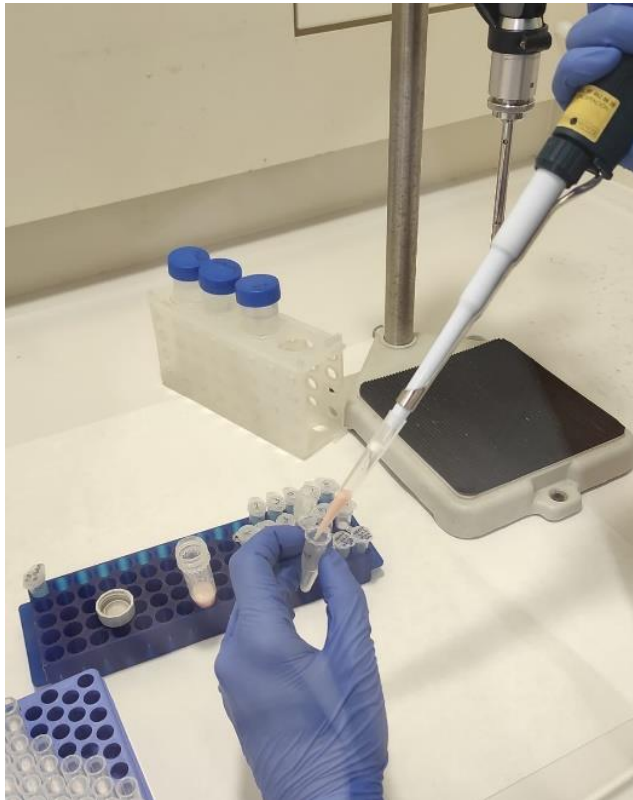
9. Resultado final después de la homogeneización:





PROCESAMIENTO PLACA DE ATEROMA

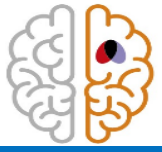
10. Separamos 300ul para extracción RNA y el resto para proteína.



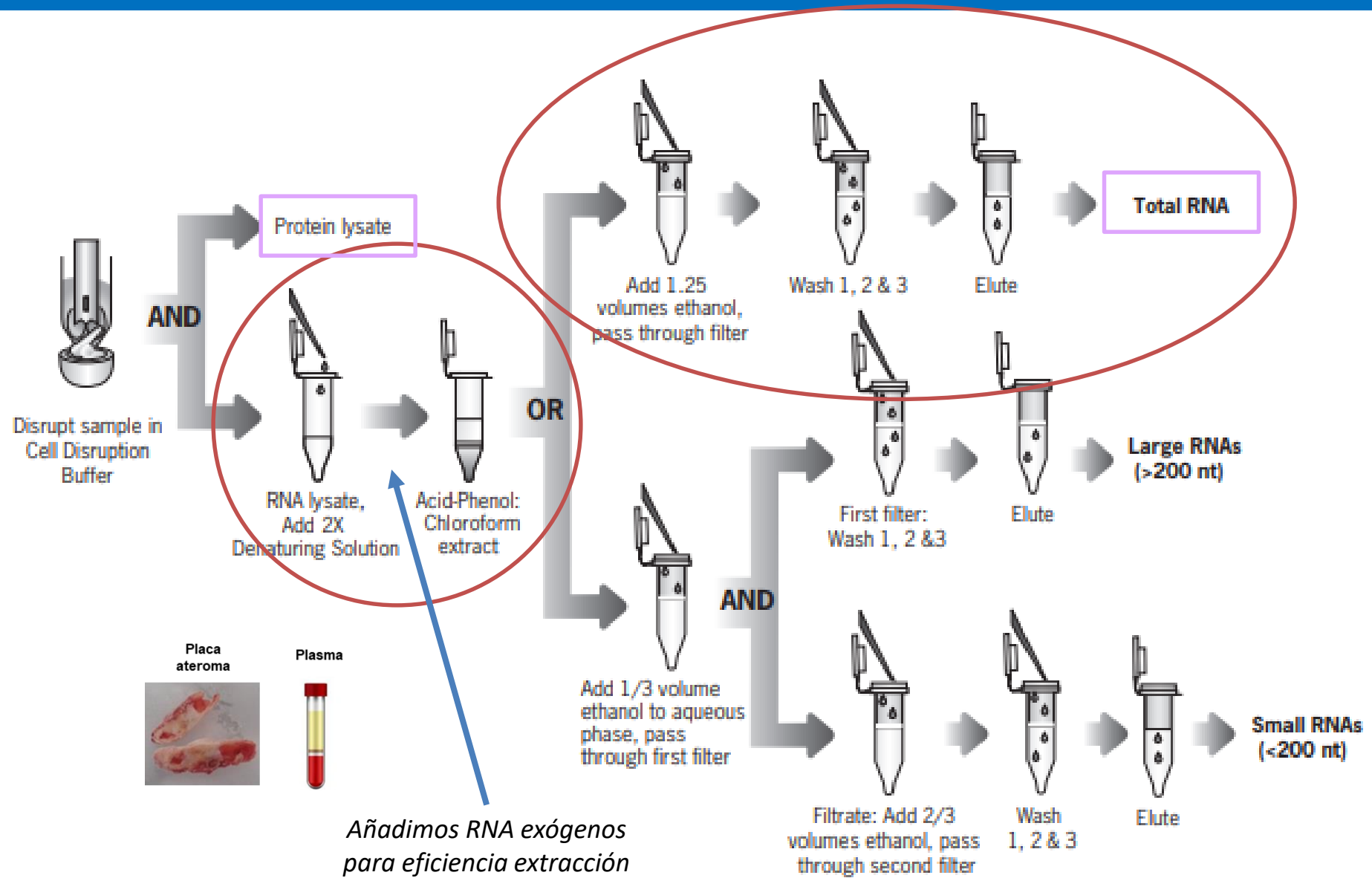
Con la **fracción de RNA** se sigue el protocolo del kit mirVana PARIS, añadiendo Denaturing Solution.

La **fracción para proteína**:

- *Dejar en hielo 5 minutos para asegurar disrupción células*
- *Centrifugar 1-2' a 4°C a máxima velocidad*
- *Recoger sobrenadante y guardarlo a -80°C*



EXTRACCIÓN RNA PLACA DE ATEROMA



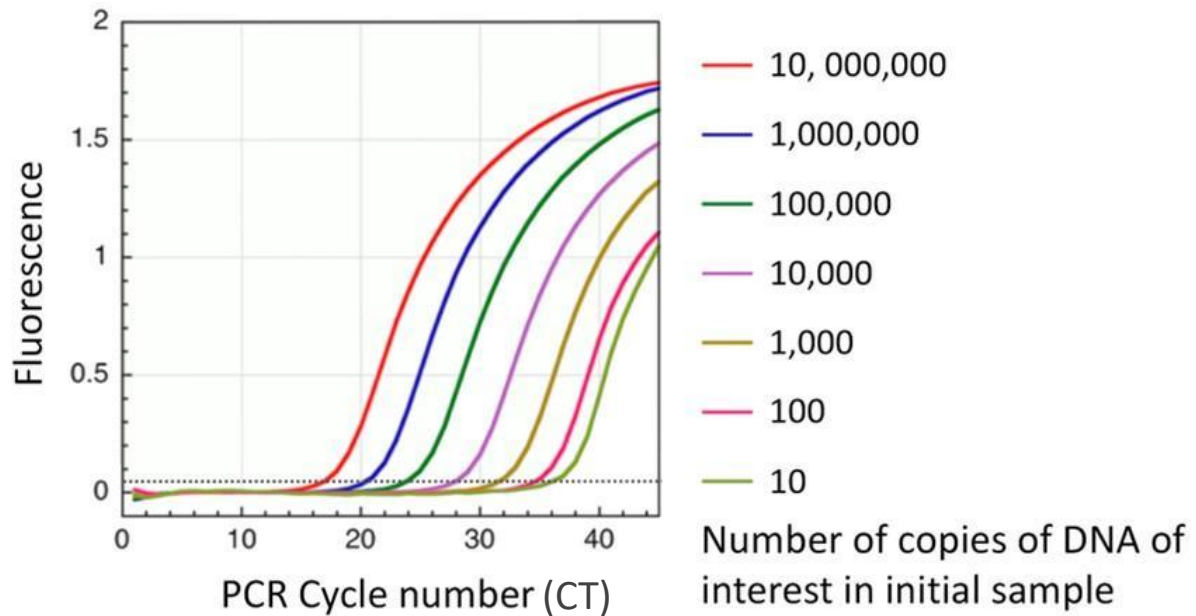


PUESTA A PUNTO PROTOCOLO PLACA

Tratamiento	RIN (integridad)	Ratio 260/280 (pureza)
500U/ml RNaseOUT	2.10	2,06
500U/ml RNaseOUT	2.30	1,96
250U/ml RNaseOUT	1.90	1,64
250U/ml RNaseOUT	1.30	1,94
0U/ml RNaseOUT	2.20	1,94
0U/ml RNaseOUT	N/A	2,01
0U/ml RNaseOUT	N/A	1,91
0U/ml RNaseOUT	N/A	1,51



PUESTA A PUNTO PROTOCOLO PLACA



Tratamiento	CT ath-miR159 (exógeno)	CT cel-miR39 (exógeno)	CT hsa-16 (endógeno)
500U/ml RNaseOUT	22	22	24
500U/ml RNaseOUT	16	17	17
250U/ml RNaseOUT	20	21	22
250U/ml RNaseOUT	18	19	20
0U/ml RNaseOUT	16	17	19
0U/ml RNaseOUT	23	24	26
0U/ml RNaseOUT	20	22	24
0U/ml RNaseOUT	17	18	18



PUESTA A PUNTO PROTOCOLO PLACA

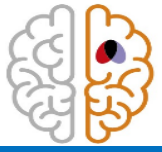
Tratamiento	RIN (integridad)	Ratio 260/280 (pureza)	CT ath-miR159 (exógeno)	CT cel-miR39 (exógeno)	CT hsa-16 (endógeno)
500U/ml RNaseOUT	2.10	2,06	22	22	24
500U/ml RNaseOUT	2.30	1,96	16	17	17
250U/ml RNaseOUT	1.90	1,64	20	21	22
250U/ml RNaseOUT	1.30	1,94	18	19	20
0U/ml RNaseOUT	2.20	1,94	16	17	19
0U/ml RNaseOUT	N/A	2,01	23	24	26
0U/ml RNaseOUT	N/A	1,91	20	22	24
0U/ml RNaseOUT	N/A	1,51	17	18	18



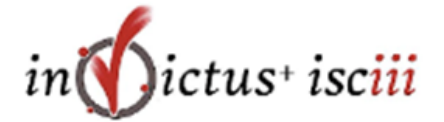
PUESTA A PUNTO PROTOCOLO PLACA

Tratamiento	RIN (integridad)	Ratio 260/280 (pureza)	CT ath-miR159 (exógeno)	CT cel-miR39 (exógeno)	CT hsa-16 (endógeno)
500U/ml RNaseOUT					
50U/ml RNaseOUT					
25U/ml RNaseOUT					
2500U/ml RNaseOUT	1.30	1,94	18	19	20
0U/ml RNaseOUT	2.20	1,94	16	17	19
0U/ml RNaseOUT	N/A	2,01	23	24	26
0U/ml RNaseOUT	N/A	1,91	20	22	24
0U/ml RNaseOUT	N/A	1,51	17	18	18

Seleccionamos opción de RAPIDEZ + FRÍO, sin inhibidores de RNAsas

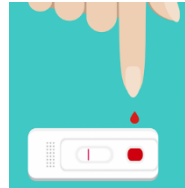


RECORDATORIO GRUPO TRABAJO CARÓTIDAS



ESTUDIO MULTICÉNTRICO PROSPECTIVO

Validación resultados cohorte Girona +



Pacientes estenosis carotídea $\geq 70\%$
(Sx, ASxP y ASxE)



Stent/endarterectomía

No cirugía (ASx)



Pre-intervención/basal

3 meses / 12 meses



Evento isquémico
Reestenosis / Progresión

FRV

Tratamiento

[Biomarcadores] 3/12 meses

cgubern@idibgi.org

jserena.girona.ics@gencat.cat

Análisis de miRNAs circulantes como biomarcadores pronóstico de placa vulnerable en pacientes con estenosis carotídea

Procesamiento de placa de ateroma para la extracción de miRNAs

Laia Carballo Perich

Grupo de Investigación en Patología Cerebrovascular

Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta

