

“MicroARNs como potenciales biomarcadores de placa vulnerable: estudio de cribado y selección de controles endógenos para la validación”

Laia Carballo-Perich, Saima Bashir, Mikel Terceño, Juan Rodríguez, Víctor Vera-Monge, Alan Murillo, Elisabet Ortiz, Xavier Xifró, Yolanda Silva, Joaquín Serena, Carme Gubern-Mérida.

Grupo de Investigación en Patología Cerebrovascular

Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta



UNITAT D'ICTUS
HOSPITAL UNIVERSITARI
Dr. JOSEP TRUETA
de GIRONA



RICORS-ICTUS



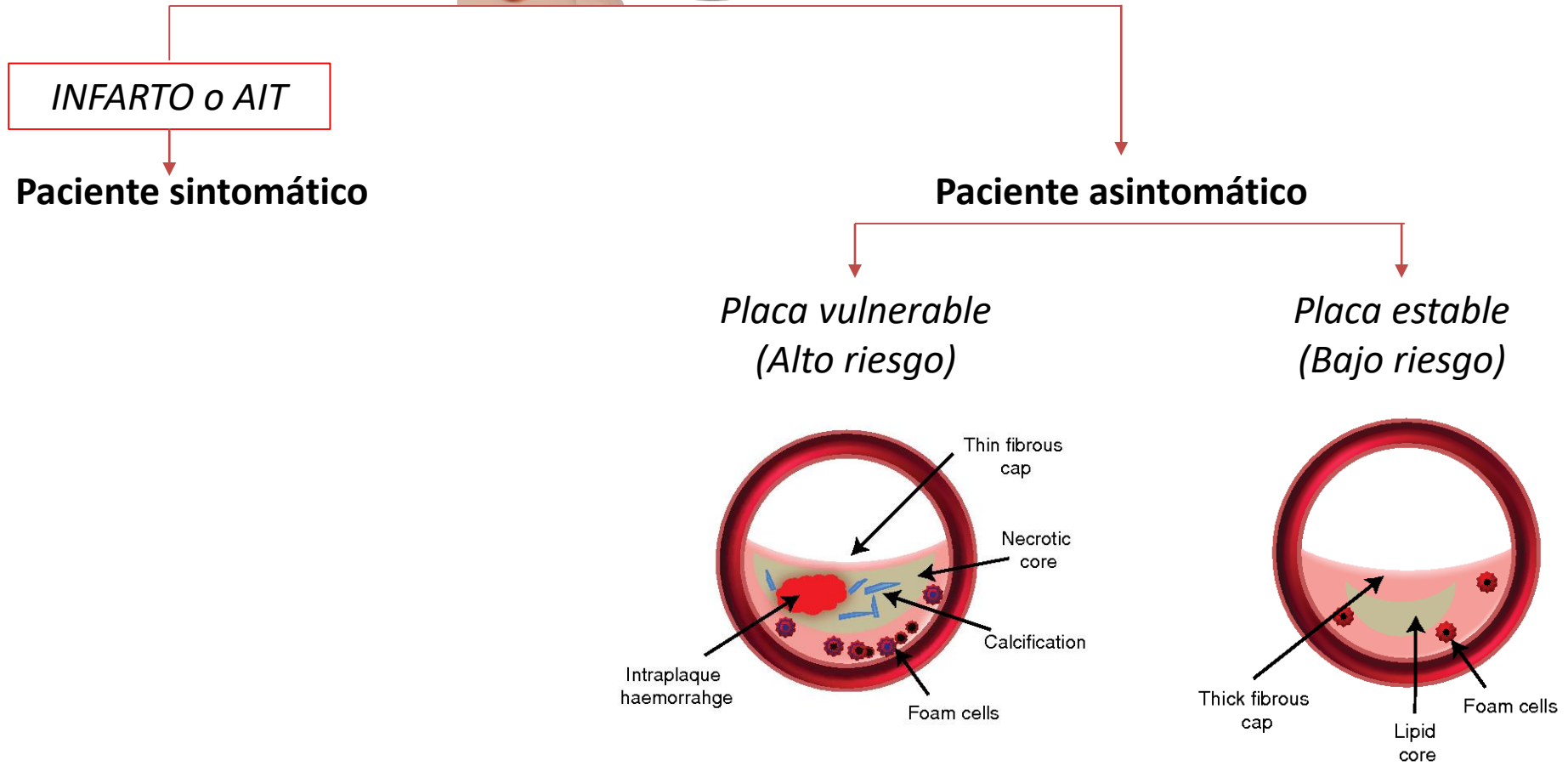
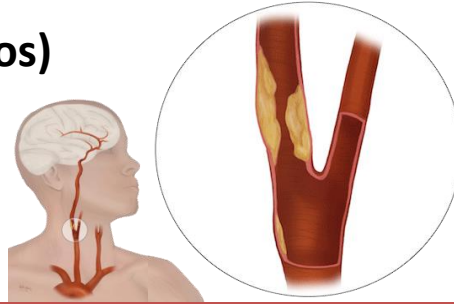
Instituto de Salud Carlos III





INTRODUCCIÓN

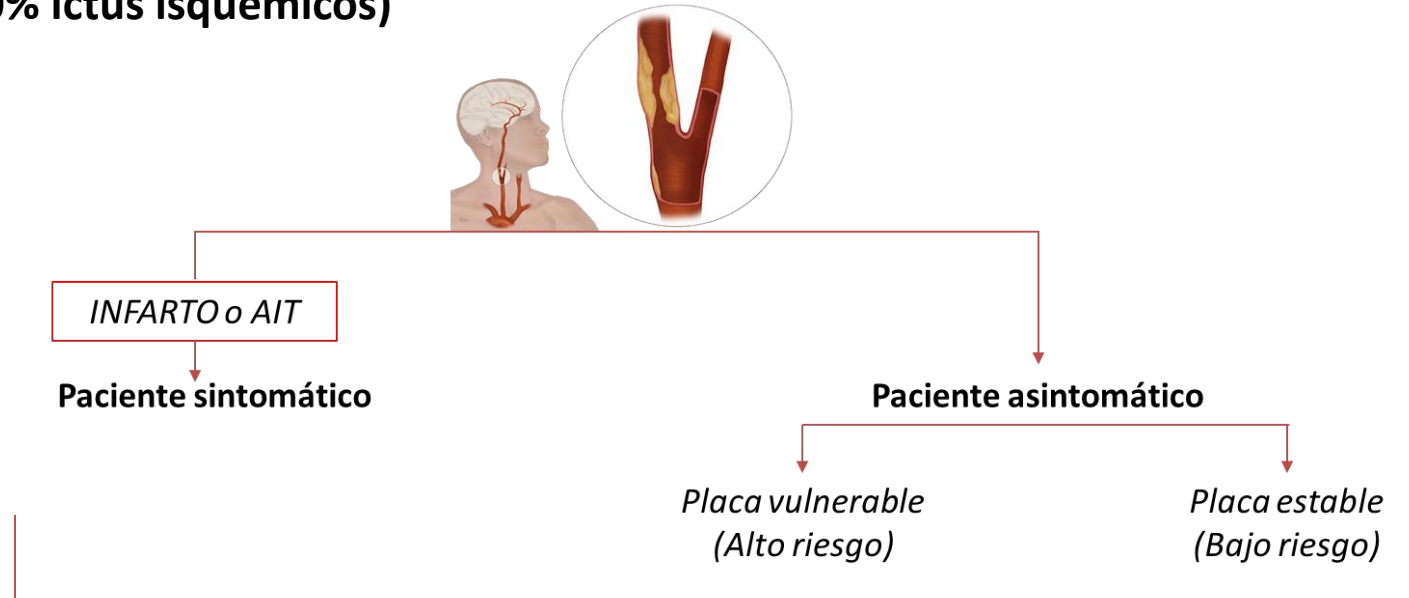
Estenosis carotídea (20-30% ictus isquémicos)



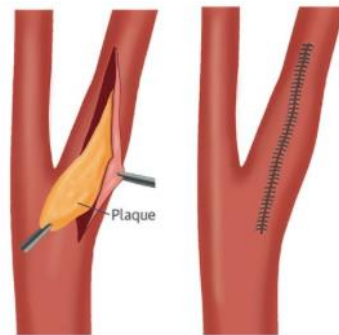


INTRODUCCIÓN

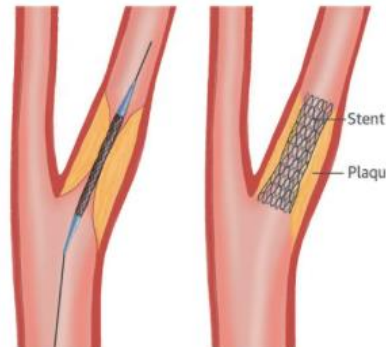
Estenosis carotídea (20-30% ictus isquémicos)



Endarterectomía



Stent

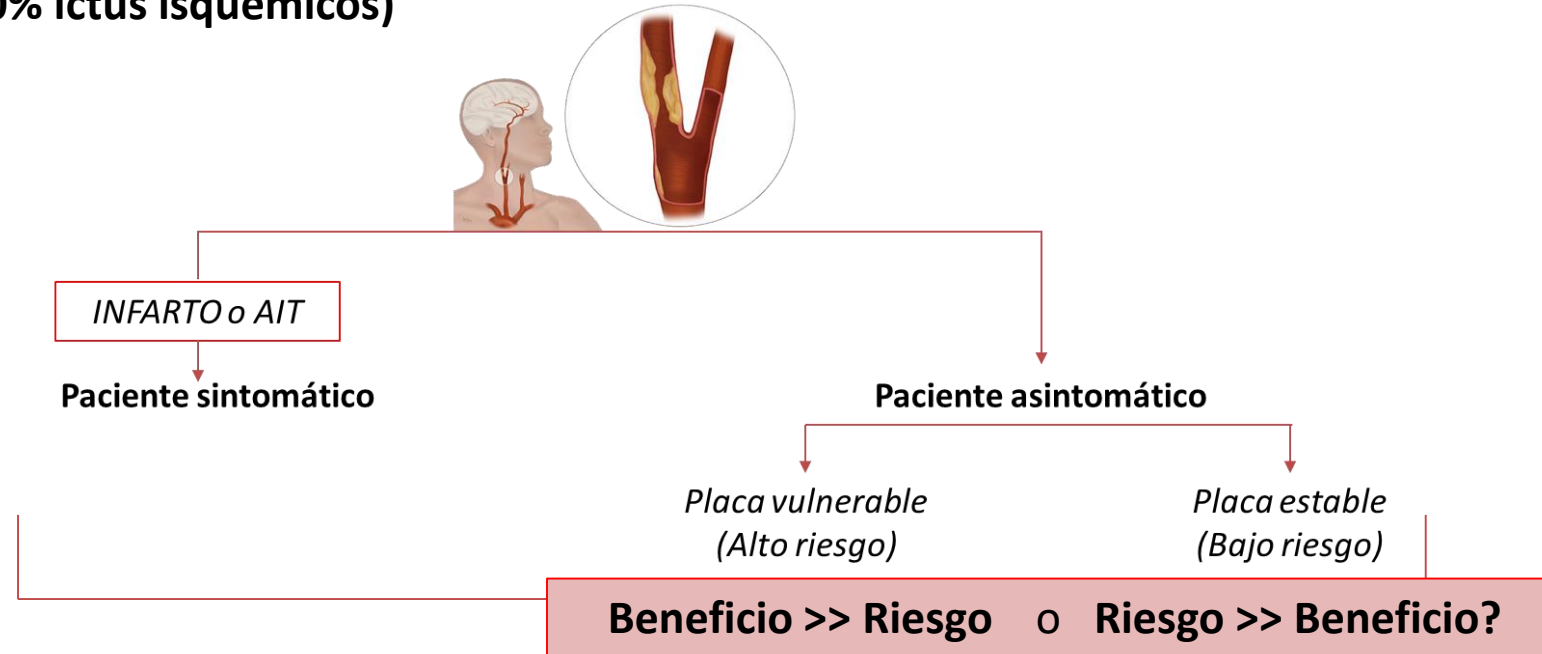


- ✓ Sintomáticos >70%
- ✓ Sintomáticos 50-69%
- ✓ Asintomáticos >70%
- ! Asintomáticos 50-69%

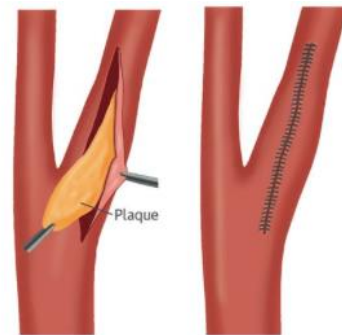


INTRODUCCIÓN

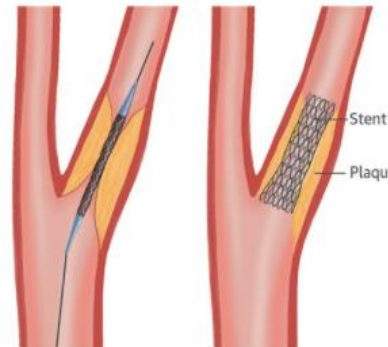
Estenosis carotídea (20-30% ictus isquémicos)



Endarterectomía



Stent

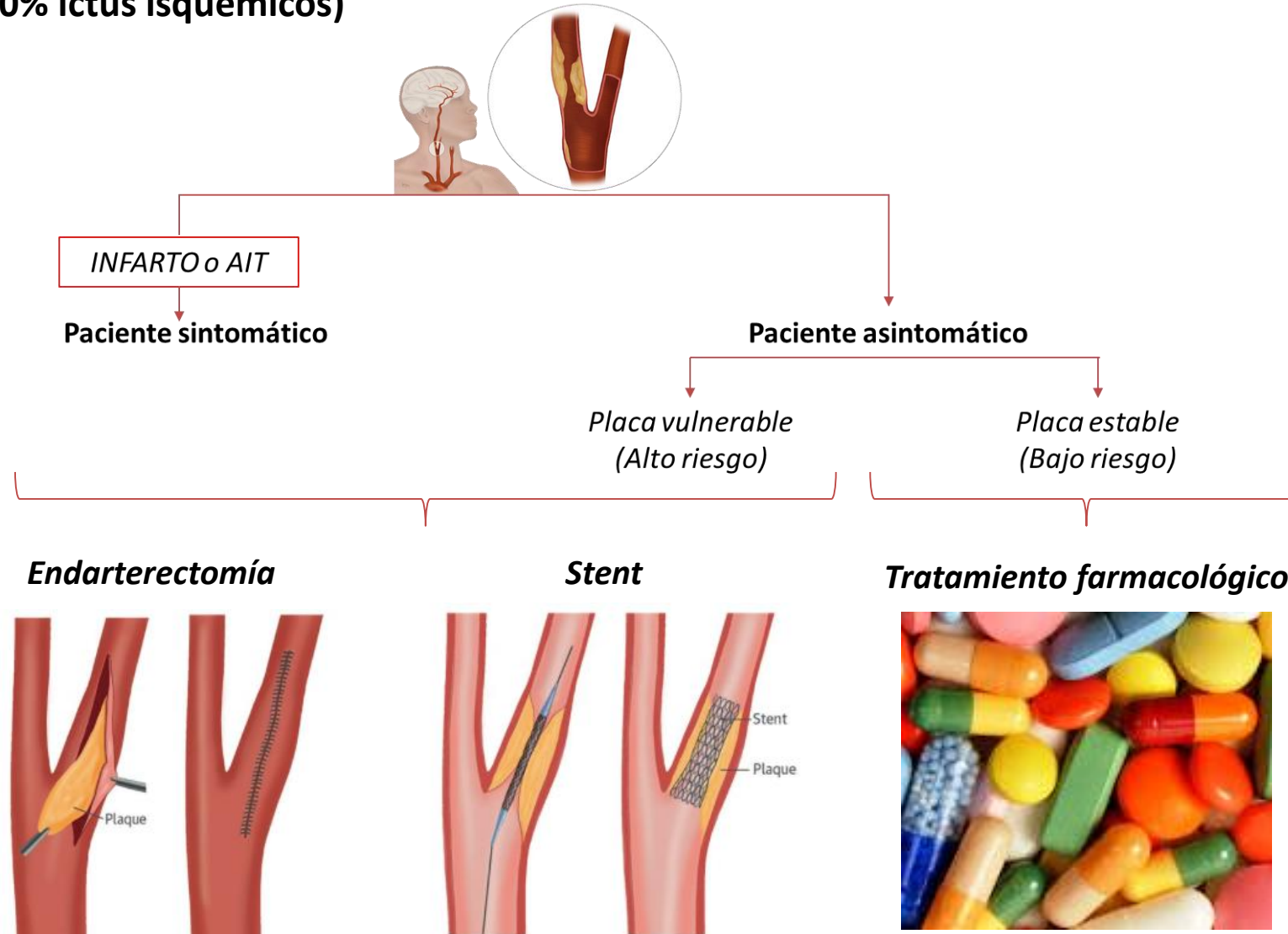


- ✓ Sintomáticos >70%
- ✓ Sintomáticos 50-69%
- ✓ Asintomáticos >70%
- ! Asintomáticos 50-69%



INTRODUCCIÓN

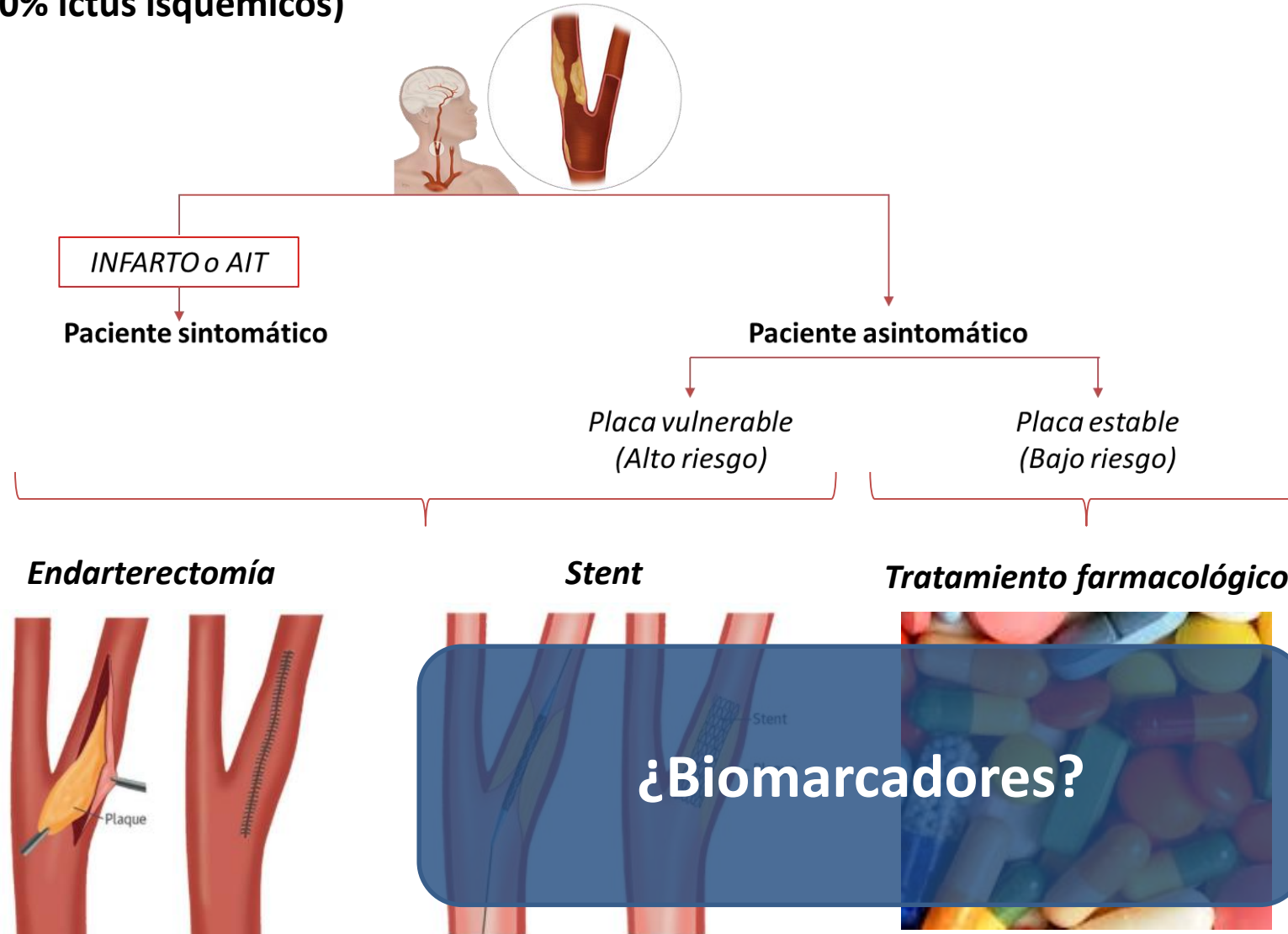
Estenosis carotídea (20-30% ictus isquémicos)





INTRODUCCIÓN

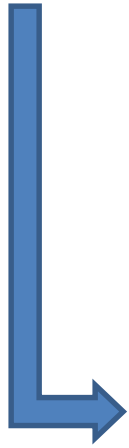
Estenosis carotídea (20-30% ictus isquémicos)





OBJETIVOS PRINCIPALES DEL PROYECTO

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



Subdirección General de
Evaluación y Fomento de la
Investigación



2019

Application No.:

TITLE: Circulating miRNAs as predictive biomarkers of vulnerable plaque in patients with carotid stenosis. Clinical and pre-clinical study.

PRINCIPAL INVESTIGATOR: Joaquin Serena Leal

CO-PRINCIPAL INVESTIGATOR:

TYPE OF PROJECT **INDIVIDUAL** **COORDINATED** **MULTICENTER**

NAME OF THE COORDINATING PI:
(Only in coordinated projects)

DURATION: **3 YEARS**



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 obtenidas 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. **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.
3. **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.
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 obtenidas 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. **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.
3. **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.
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 COHORTE DE CRIBADO

1. **Selección** de los pacientes para la **cohorte de cribado** apareados por sexo, edad y factores de riesgo vascular.
2. **Análisis histológico** de las placas de ateroma.
3. **Extracción** conjunta de **RNA y proteína** de muestras de plasma y placa con el kit mirVana PARIS (Ambion).
4. **Retrotranscripción y preamplificación** del RNA extraído con el kit TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis (Applied Biosynthesis).
5. **Cribado de miRNAs** con la tecnología TaqMan **OpenArray** Human Advanced MicroRNA Panel (Applied Biosystems), 754 miRNAs.
6. **Análisis y normalización** de los datos obtenidos mediante OpenArray.

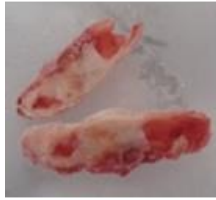


METODOLOGÍA COHORTE DE CRIBADO

1. **Selección** de los pacientes y controles para la **cohorte de cribado** apareados por sexo, edad y factores de riesgo vascular.

**Bio
Banc**

Placa



10 Sintomáticos (S)

10 Asintomáticos Progresivos (AP)

10 Asintomáticos Estables (AE)

Plasma



10 Sintomáticos (S)

10 Asintomáticos Progresivos (AP)

10 Asintomáticos Estables (AE)

10 Controles (Ctrl)

Colección ICT (BioBanc IDIBGI)

Colección IME (BioBanc IDIBGI)

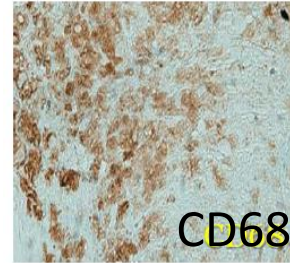


METODOLOGÍA COHORTE DE CRIBADO

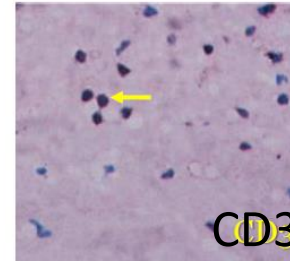
2. Análisis histológico de las placas de ateroma.

Immunohistoquímica

Macrófagos →

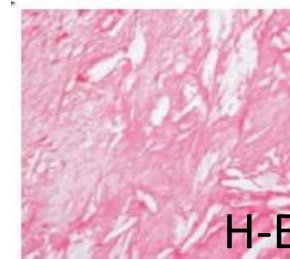


Linfocitos →



Estudio histológico

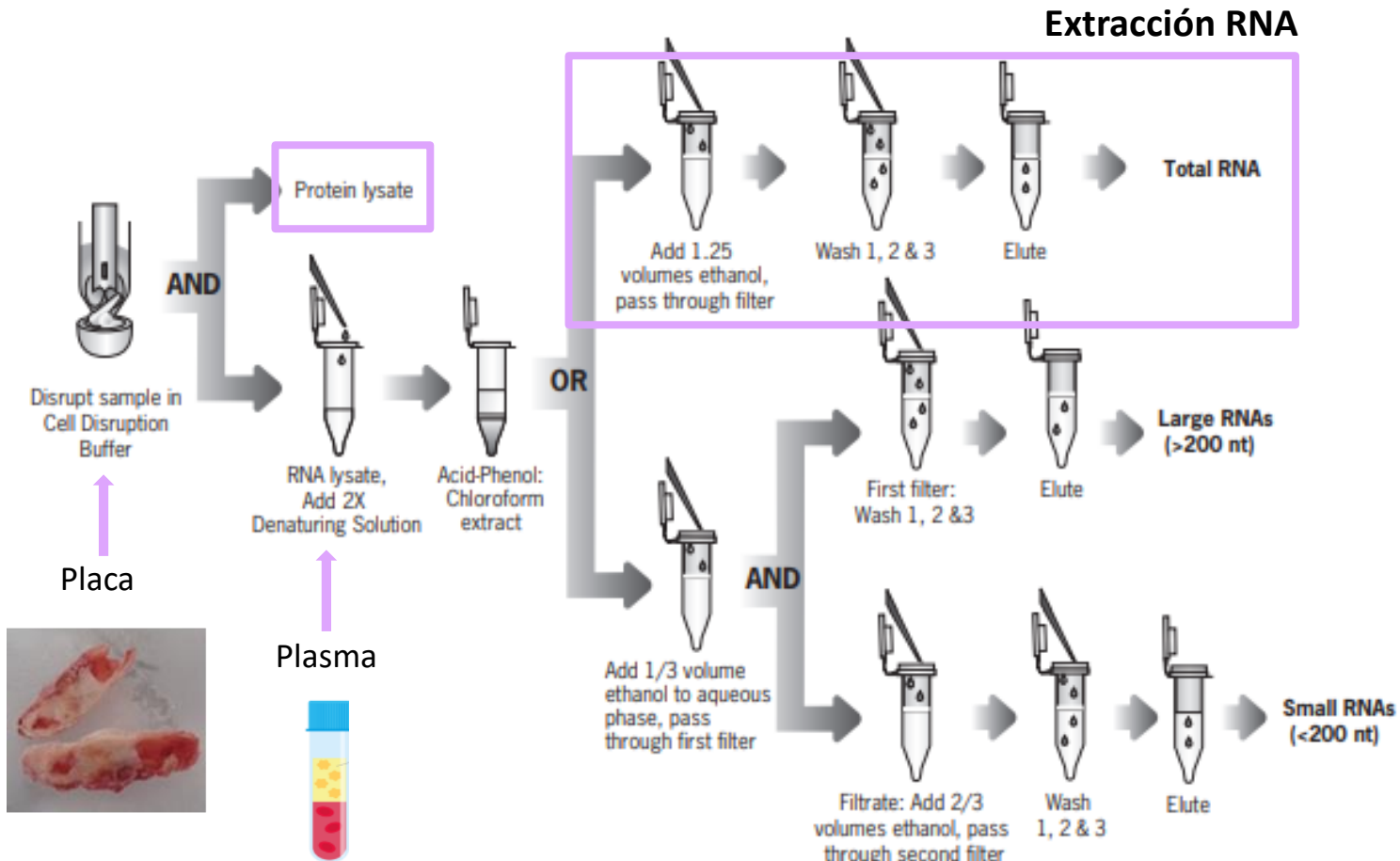
Núcleo lipídico →

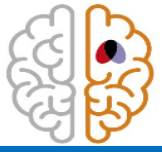




METODOLOGÍA COHORTE DE CRIBADO

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

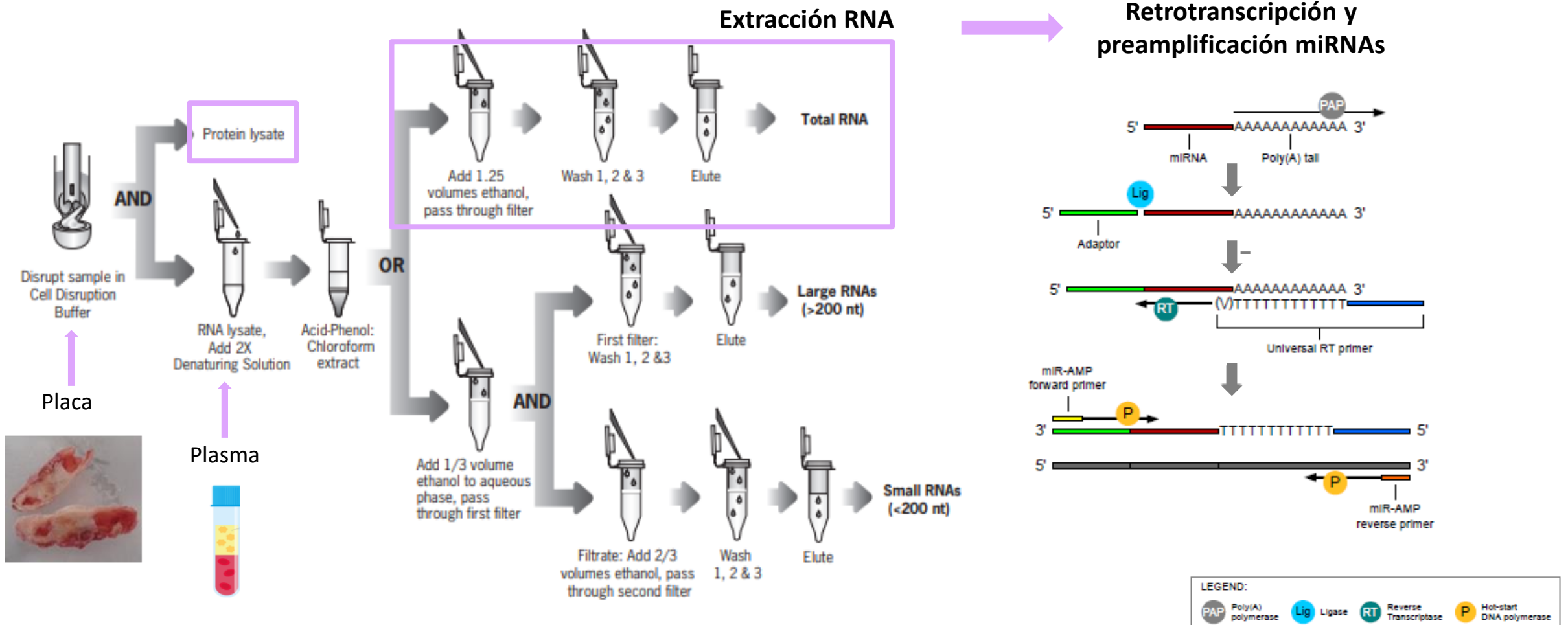




METODOLOGÍA COHORTE DE CRIBADO

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

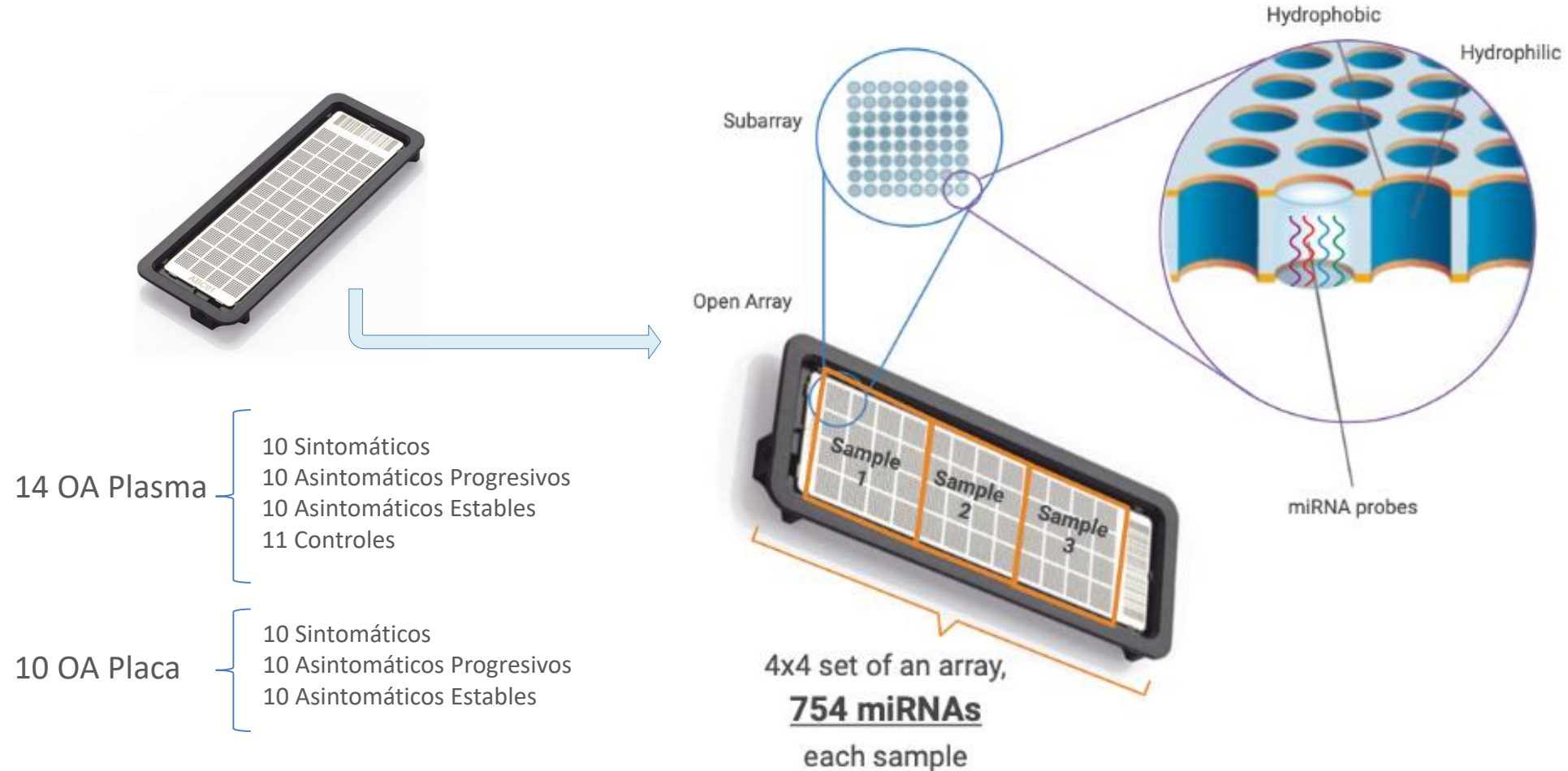
4. Retrotranscripción y preamplificación de miRNAs extraídos con el kit TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis (Applied Biosynthesis).





METODOLOGÍA COHORTE DE CRIBADO

5. Cribado de miRNAs con la tecnología TaqMan **OpenArray** Human Advanced MicroRNA Panel (Applied Biosystems), 754 miRNAs.





METODOLOGÍA COHORTE DE CRIBADO

6. Análisis y normalización de los datos obtenidos mediante OpenArray.

1. Calidad amplificaciones

Amplificaciones con Cq confidence **>0.8**, AMP score **>1.24** y Cq **<28**

2. Calidad muestras

Muestras con **>100** miRNAs

3. Calidad biogrupos

miRNAs con **>70%** de expresión en cada biogrupo



METODOLOGÍA COHORTE DE CRIBADO

6. Análisis y normalización de los datos obtenidos mediante OpenArray.

1. Calidad amplificaciones

Amplificaciones con Cq confidence **>0.8**, AMP score **>1.24** y Cq **<28**

2. Calidad muestras

Muestras con **>100** miRNAs

3. Calidad biogrupos

miRNAs con **>70%** de expresión en cada biogrupo

4. Normalización $2^{-\Delta\Delta C_t}$

- Normalización **GLOBAL** (mediana Cq global de cada muestra)
- Normalización por **ENDÓGENOS** (mediana Cq del miRNA endógeno)



BIBLIOGRAFIA +
PROPIOS RESULTADOS

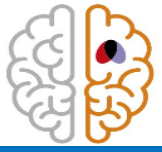
- Estabilidad candidatos: método $2^{-\Delta C_t}$
- Elección de la mejor combinación de endógenos: programas **NormFinder** y **geNorm**

A) Placa (AP+AE) vs Control

p-value <0,05
FC > 2

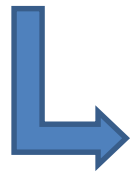
B) AP vs AE

p-value <0,1
FC > 1,5



RESULTADOS COHORTE DE CRIBADO

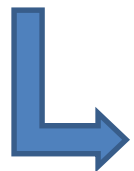
A. Identificación de miRNAs diagnóstico de presencia de placa en pacientes asintomáticos con estenosis carotídea >70%



Placa (AP+AE) vs Controles



B. Identificación de miRNAs pronóstico de placa vulnerable en pacientes asintomáticos con estenosis carotídea >70%



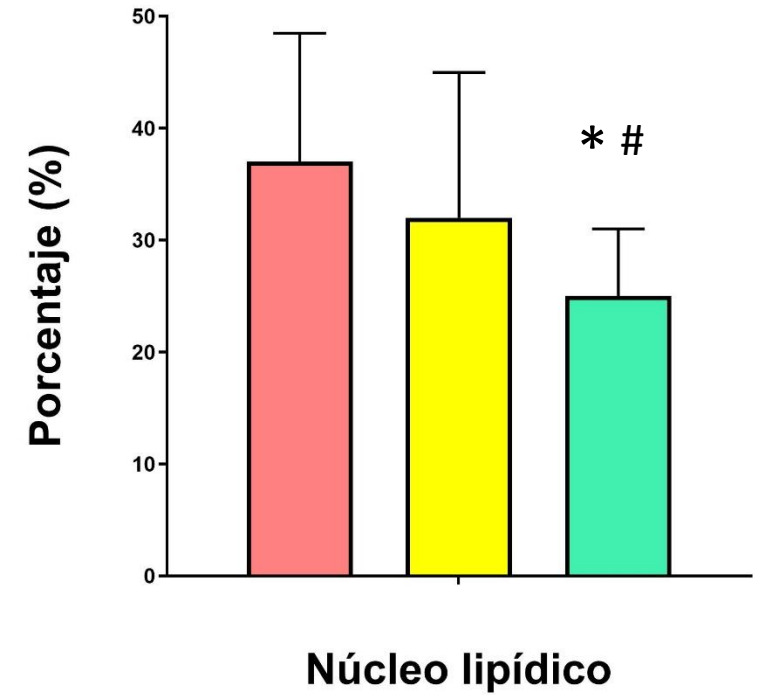
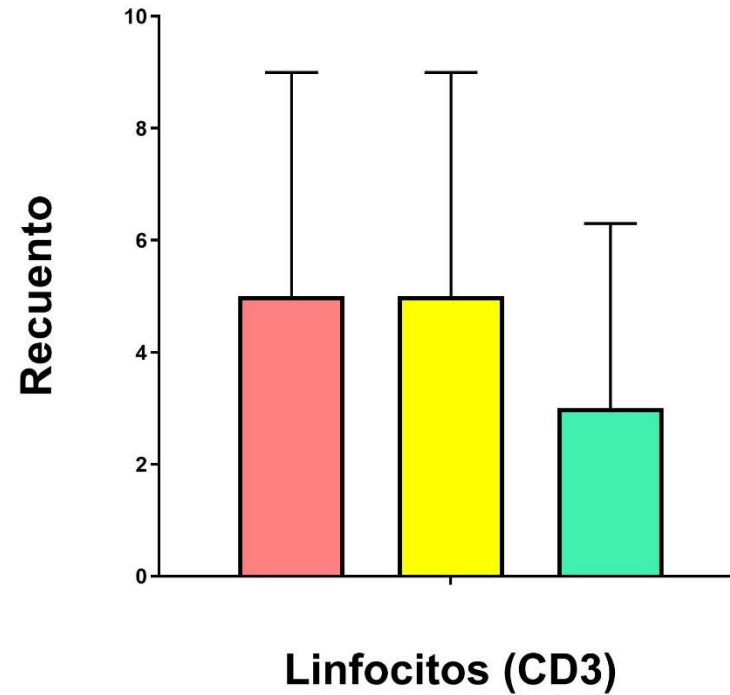
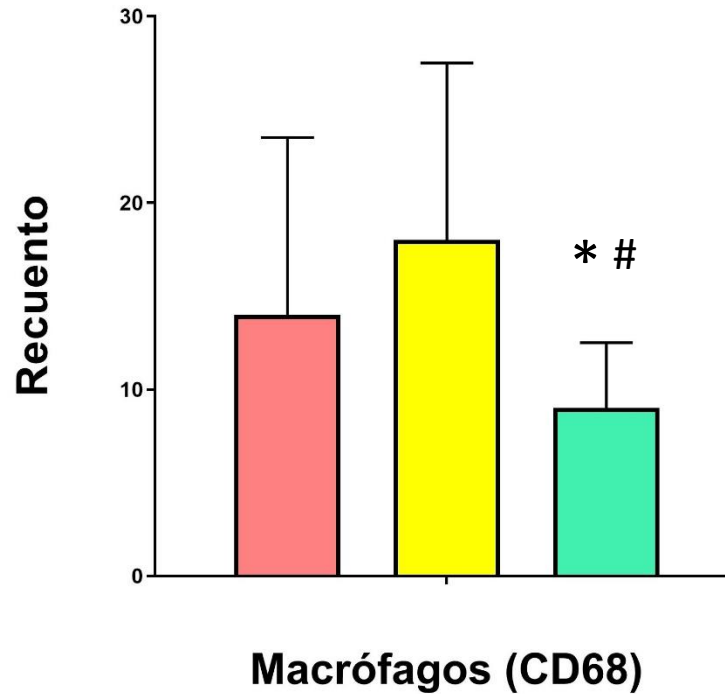
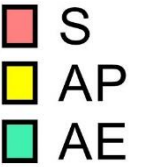
AP vs AE





RESULTADOS COHORTE DE CRIBADO

ANATOMÍA PATOLÓGICA





RESULTADOS COHORTE DE CRIBADO

754
miRNAs



A) Placa (AP+AE) vs Controles
B) AP vs AE



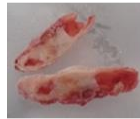
B) AP vs AE



1. Calidad ampliaciones



372
miRNAs
(49,3%)



393
miRNAs
(52,1%)

2. Calidad muestras



30
muestras
(100%)



41
Muestras
(100%)

3. Calidad biogrupos



A) 114 miRNAs
(15,1%)
B) 167 miRNAs
(22,1%)



B) 111 miRNAs
(14,7%)



RESULTADOS COHORTE DE CRIBADO

754
miRNAs



A) Placa (AP+AE) vs Controles
B) AP vs AE

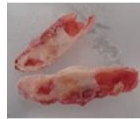


B) AP vs AE

1. Calidad ampliificaciones



372
miRNAs
(49,3%)



393
miRNAs
(52,1%)

2. Calidad muestras



30
muestras
(100%)



41
Muestras
(100%)

3. Calidad biogrupos



A) 114 miRNAs
(15,1%)
B) 167 miRNAs
(22,1%)



B) 111 miRNAs
(14,7%)



>70% Placa y <20% Controles



A) 15 miRNAs cualitativos (2%)

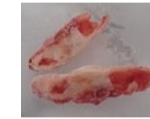


RESULTADOS COHORTE DE CRIBADO

754 miRNAs

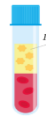


A) Placa (AP+AE) vs Controles
B) AP vs AE

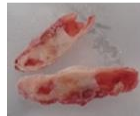


B) AP vs AE

1. Calidad ampliaciones



372 miRNAs
(49,3%)



393 miRNAs
(52,1%)

2. Calidad muestras



30 muestras
(100%)



41 Muestras
(100%)

3. Calidad biogrupos



A) 114 miRNAs
(15,1%)
B) 167 miRNAs
(22,1%)

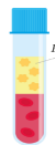


B) 111 miRNAs
(14,7%)

4. Normalización

GLOBAL y ENDÓGENOS

miRNAs candidatos endógenos ($2^{-\Delta C^t}$; $p > 0.05$):



A) Placa (AP+AE) vs Controles

hsa-miR-125a-5p hsa-miR-185-5p
hsa-miR-17-5p hsa-miR-22-5p

B) AP vs AE

hsa-miR-125a-5p hsa-miR-99b-5p hsa-miR-26b-5p
hsa-miR-17-5p hsa-miR-16-5p hsa-miR-484
hsa-miR-185-5p hsa-miR-24-3p hsa-miR-27a-3p
hsa-miR-22-5p hsa-miR-191-5p



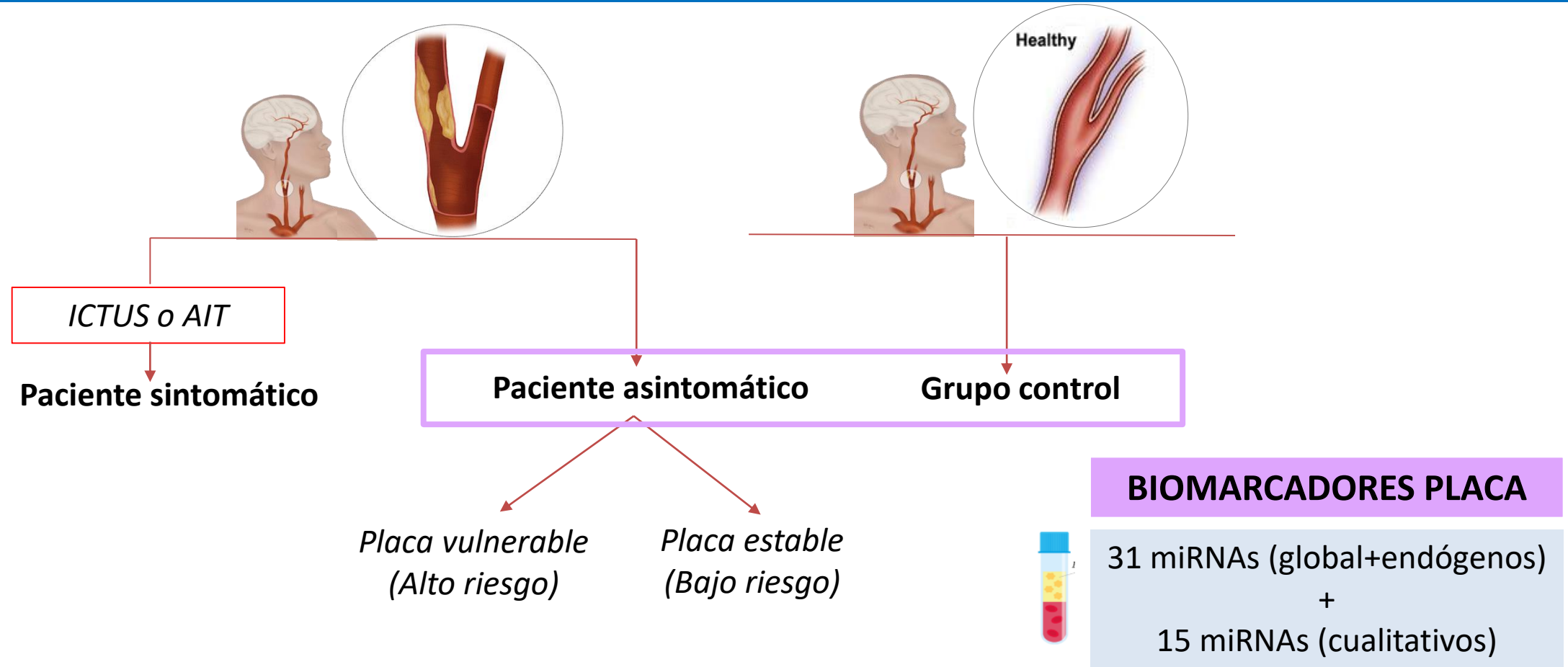
B) AP vs AE

hsa-miR-125b-5p hsa-miR-199a-3p hsa-miR-326
hsa-miR-144-3p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-423-5p
hsa-miR-145-5p hsa-miR-210-3p hsa-miR-425-5p
hsa-miR-146a-5p hsa-miR-21-3p hsa-miR-451a
hsa-miR-148a-3p hsa-miR-21-5p hsa-miR-93-5p
hsa-miR-16-5p hsa-miR-22-5p hsa-miR-99b-5p
hsa-miR-181a-5p hsa-miR-29b-3p hsa-miR-652-3p
hsa-miR-181c-5p hsa-miR-324-5p

NormFinder
geNorm
Ambos

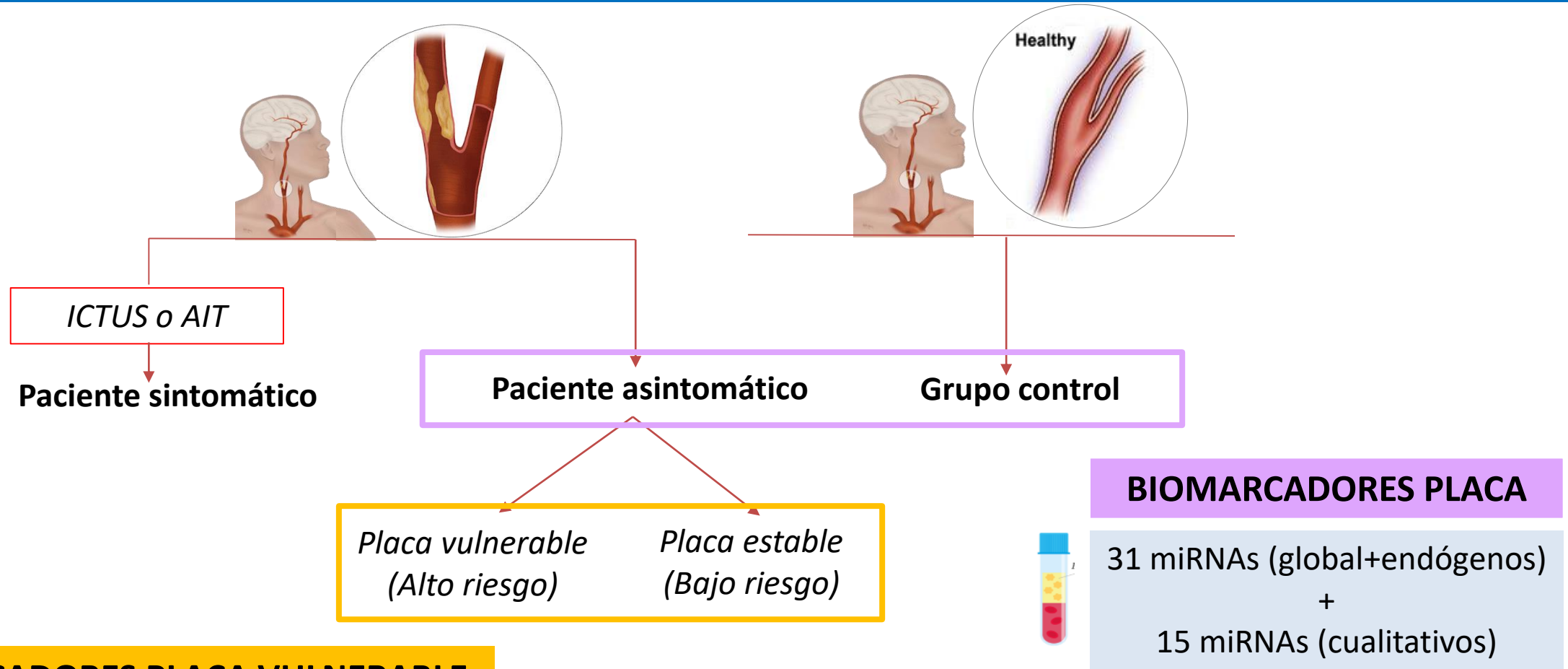


RESULTADOS COHORTE DE CRIBADO

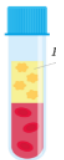




RESULTADOS COHORTE DE CRIBADO



BIOMARCADORES PLACA VULNERABLE



6 miRNAs

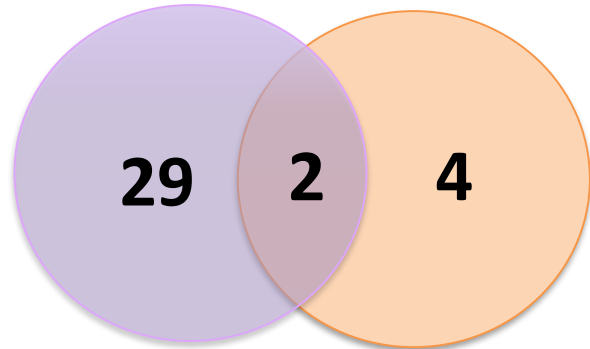


7 miRNAs

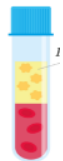


RESULTADOS COHORTE DE CRIBADO

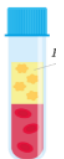
Placa vs Ctrl



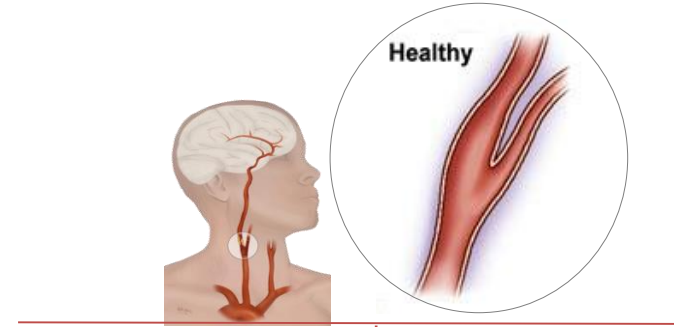
AP vs AE



BIOMARCADORES PLACA VULNERABLE



6 miRNAs



*Placa vulnerable
(Alto riesgo)*

*Placa estable
(Bajo riesgo)*

BIOMARCADORES PLACA

31 miRNAs (global+endógenos)
+
15 miRNAs (cualitativos)

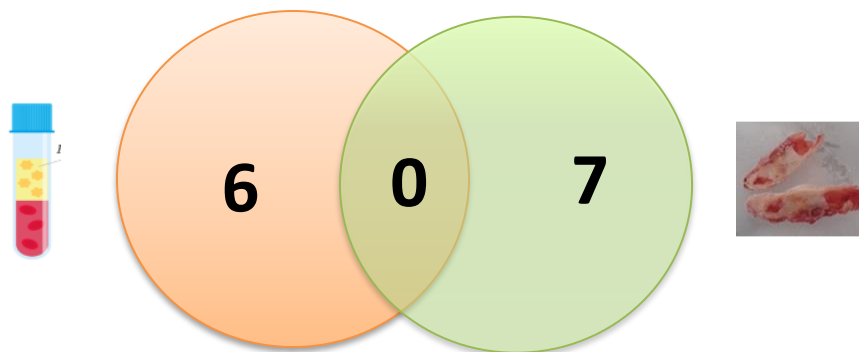




RESULTADOS COHORTE DE CRIBADO

CORRELACIÓN PLACA-PLASMA

AP vs AE

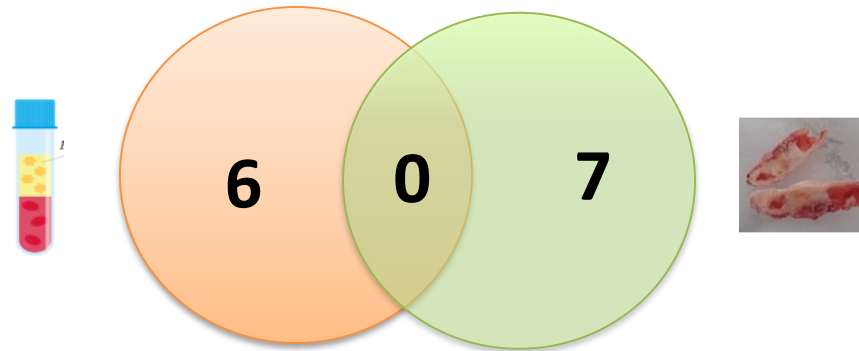




RESULTADOS COHORTE DE CRIBADO

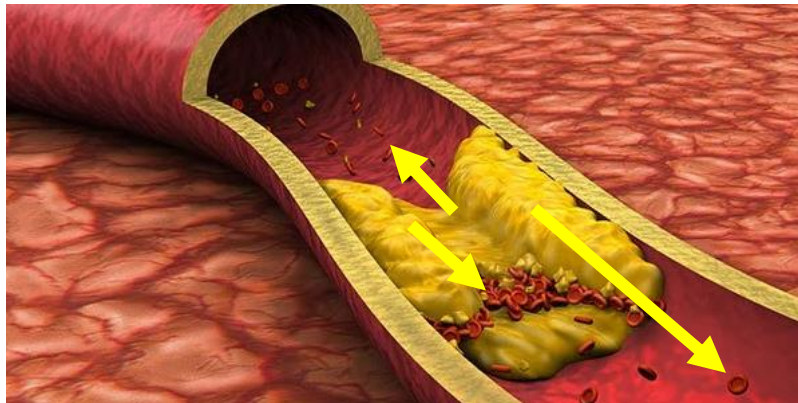
CORRELACIÓN PLACA-PLASMA

AP vs AE



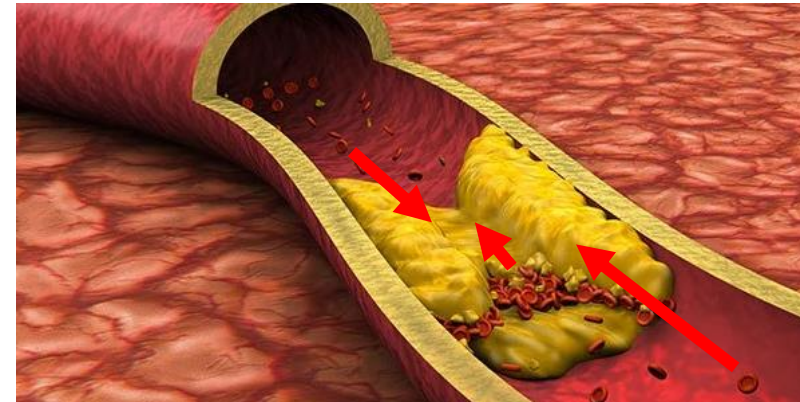
Hipótesis 1

La placa es vulnerable y libera biomarcadores a circulación



Hipótesis 2

La sangre es "vulnerable" y promueve la rotura de la placa





PRÓXIMO OBJETIVO

1. **Caracterizar** un perfil de miRNAs específico de placa vulnerable analizando placas de ateroma obtenidas 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. **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.
3. **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.
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.

“MicroARNs como potenciales biomarcadores de placa vulnerable: estudio de cribado y selección de controles endógenos para la validación”

Laia Carballo-Perich, Saima Bashir, Mikel Terceño, Juan Rodríguez, Víctor Vera-Monge, Alan Murillo, Elisabet Ortiz, Xavier Xifró, Yolanda Silva, Joaquín Serena, Carme Gubern-Mérida.

Grupo de Investigación en Patología Cerebrovascular

Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta



UNITAT D'ICTUS
HOSPITAL UNIVERSITARI
Dr. JOSEP TRUETA
de GIRONA



RICORS-ICTUS



Instituto de Salud Carlos III

