

miRNAs circulantes como potenciales biomarcadores de crecimiento del hematoma en hemorragia intracerebral: estudio de cribado

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



Institut
d'Investigació
Biomèdica
de Girona
Dr. Josep Trueta

RICORS-ICTUS



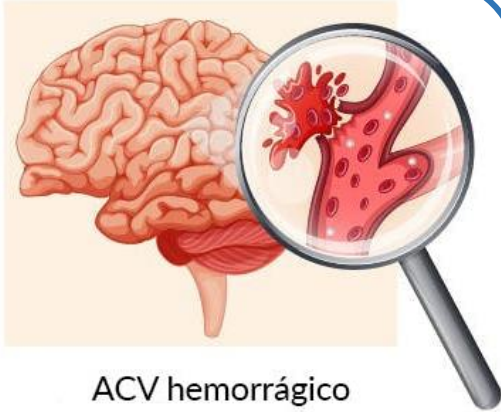
Instituto de Salud Carlos III





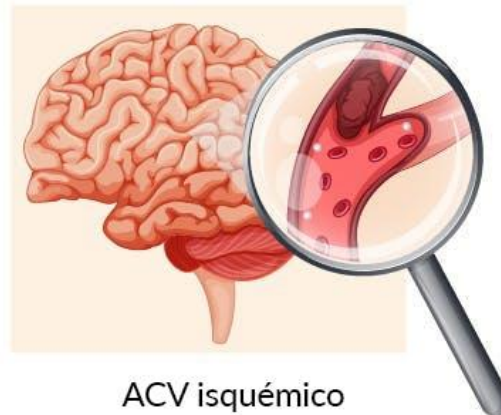
INTRODUCCIÓN

ICTUS HEMORRÁGICO



ACV hemorrágico

10-15%



ACV isquémico

85-90%

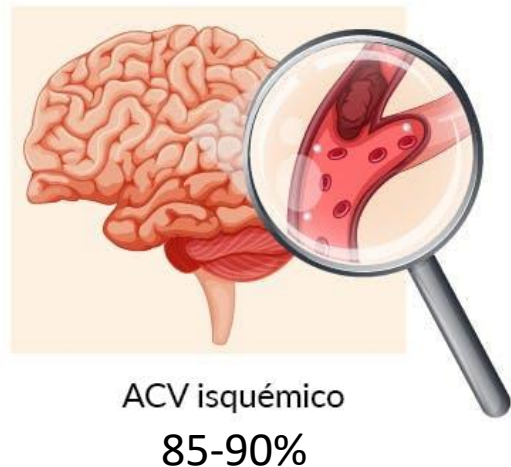
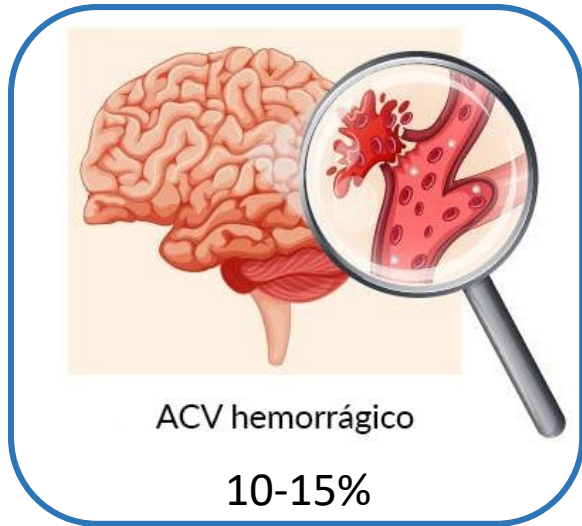
Representa la tasa más elevada de mortalidad y morbilidad:

- Mortalidad del **30-50%** de los pacientes en el **primer** mes.
- Solo **1/3** de los pacientes pueden vivir de manera **independiente** al **año**.



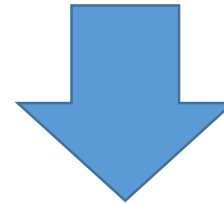
INTRODUCCIÓN

ICTUS HEMORRÁGICO



Representa la tasa más elevada de mortalidad y morbilidad:

- Mortalidad del **30-50%** de los pacientes en el **primer** mes.
- Solo **1/3** de los pacientes pueden vivir de manera **independiente** al **año**.



CRECIMIENTO DEL HEMATOMA

Principal causa de **deterioro neurológico precoz** y de **mal pronóstico**



INTRODUCCIÓN

CRECIMIENTO DEL HEMATOMA

- Ocurre en el **38%** de los pacientes.
- Inicio en las **primeras 24 horas** (ocasionalmente más allá de las 72h).
- Causa desconocida.



INTRODUCCIÓN

CRECIMIENTO DEL HEMATOMA

- Ocurre en el **38%** de los pacientes.
- Inicio en las **primeras 24 horas** (ocasionalmente más allá de las 72h).
- Causa desconocida.

BIOMARCADORES

De ayuda en la predicción del **pronóstico** del paciente y para la **optimización** del manejo en **fase aguda**

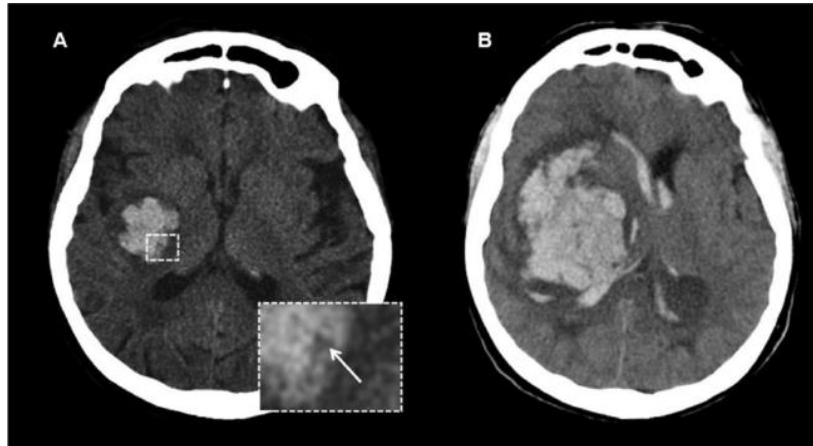


INTRODUCCIÓN

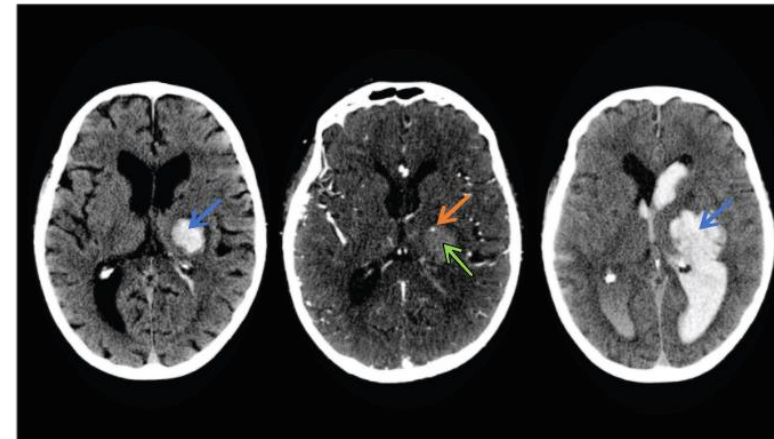
BIOMARCADORES de IMAGEN

- Radiomarcadores predictores de crecimiento del hematoma

TC basal simple



AngioTC (spot sign)



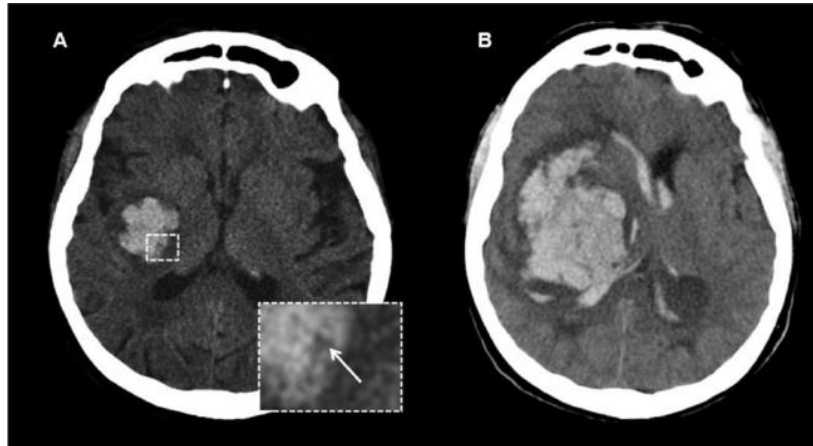


INTRODUCCIÓN

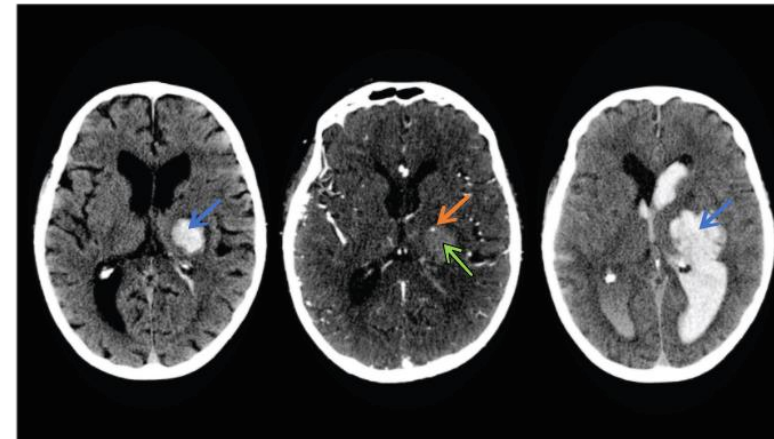
BIOMARCADORES de IMAGEN

- Radiomarcadores predictores de crecimiento del hematoma

TC basal simple



AngioTC (spot sign)



- Medida sujeta a **variabilidad humana**
- Sensibilidad y/o especificidad **limitada**
- AngioTC **no disponible** en todos los centros

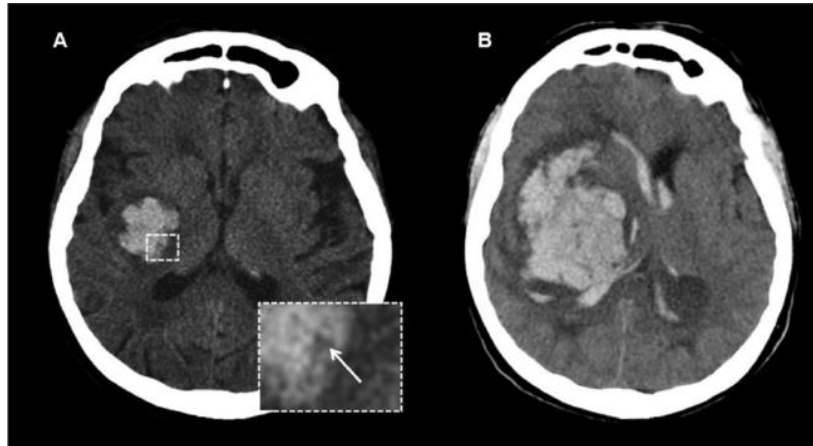


INTRODUCCIÓN

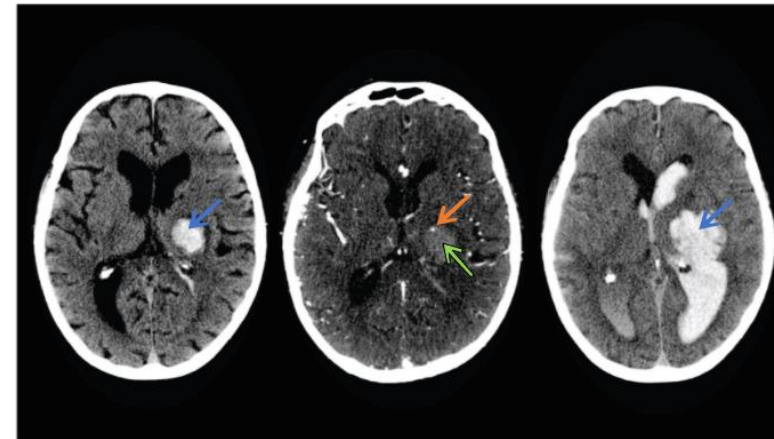
BIOMARCADORES de IMAGEN

- Radiomarcadores predictores de crecimiento del hematoma

TC basal simple



AngioTC (spot sign)



- Medida sujeta a **variabilidad humana**
- Sensibilidad y/o especificidad **limitada**
- AngioTC **no disponible** en todos los centros



INTRODUCCIÓN

BIOMARCADORES MOLECULARES: miRNAs

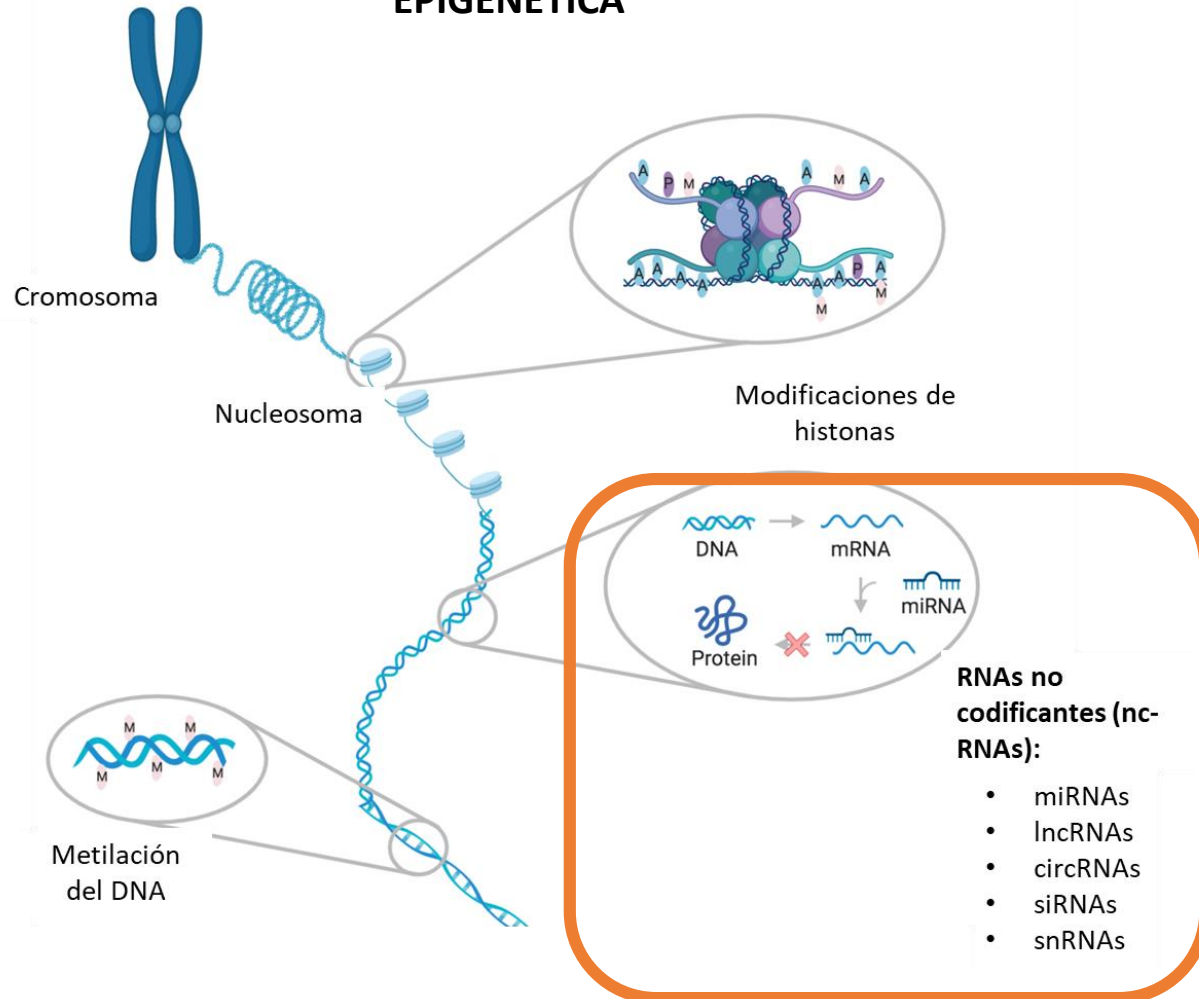




INTRODUCCIÓN

BIOMARCADORES MOLECULARES: miRNAs

EPIGENÉTICA

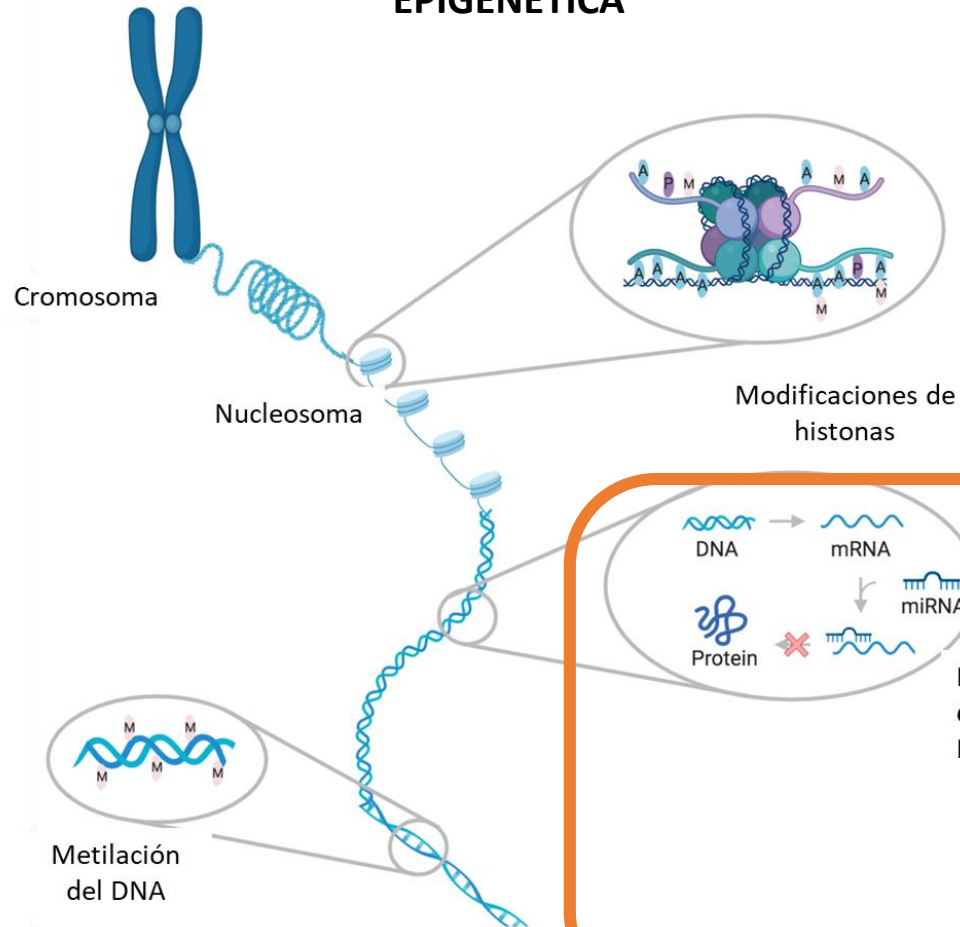




INTRODUCCIÓN

BIOMARCADORES MOLECULARES: miRNAs

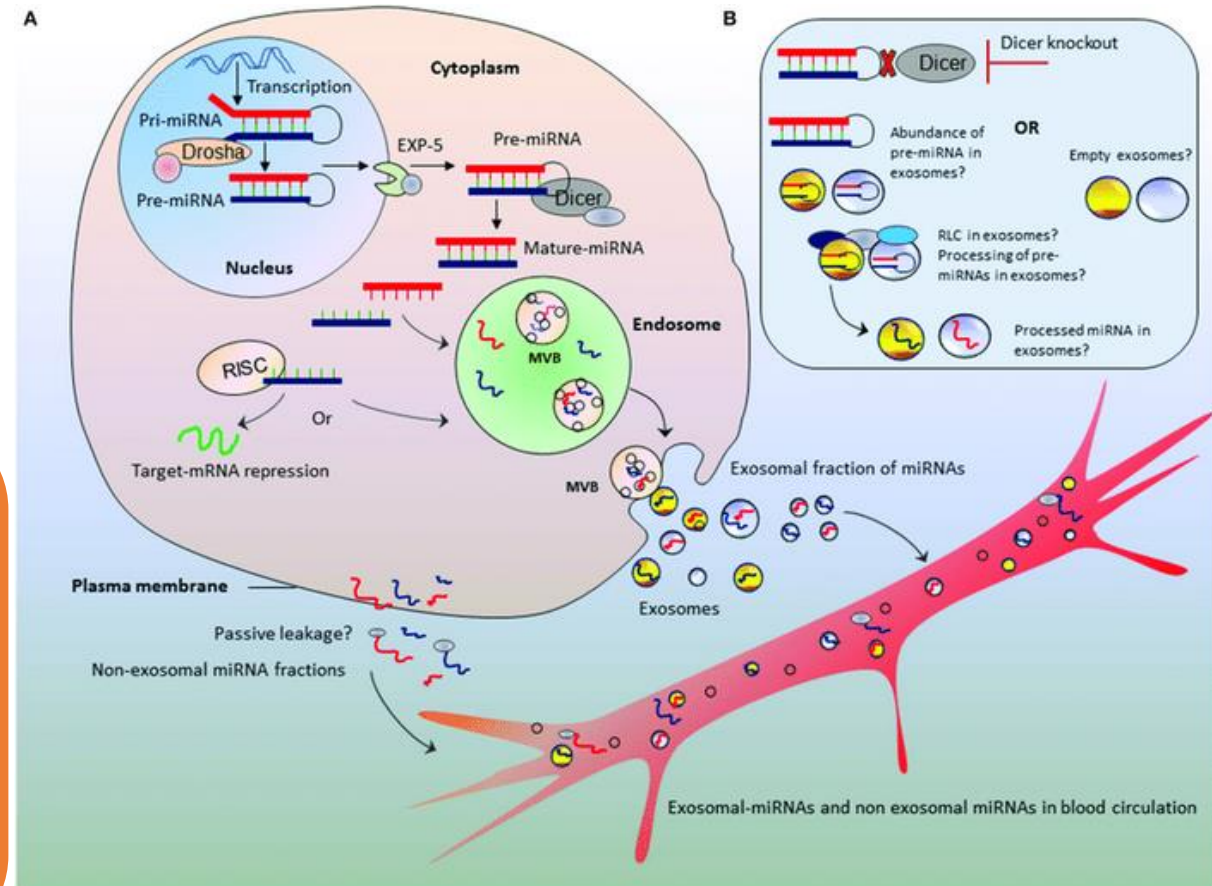
EPIGENÉTICA



RNAs no codificantes (nc-RNAs):

- miRNAs
- lncRNAs
- circRNAs
- siRNAs
- snRNAs

miRNAs circulantes





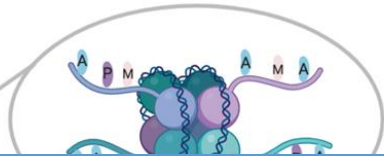
INTRODUCCIÓN

BIOMARCADORES MOLECULARES: miRNAs

EPIGENÉTICA

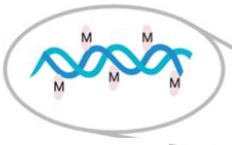


Cromosoma



Nucleosoma

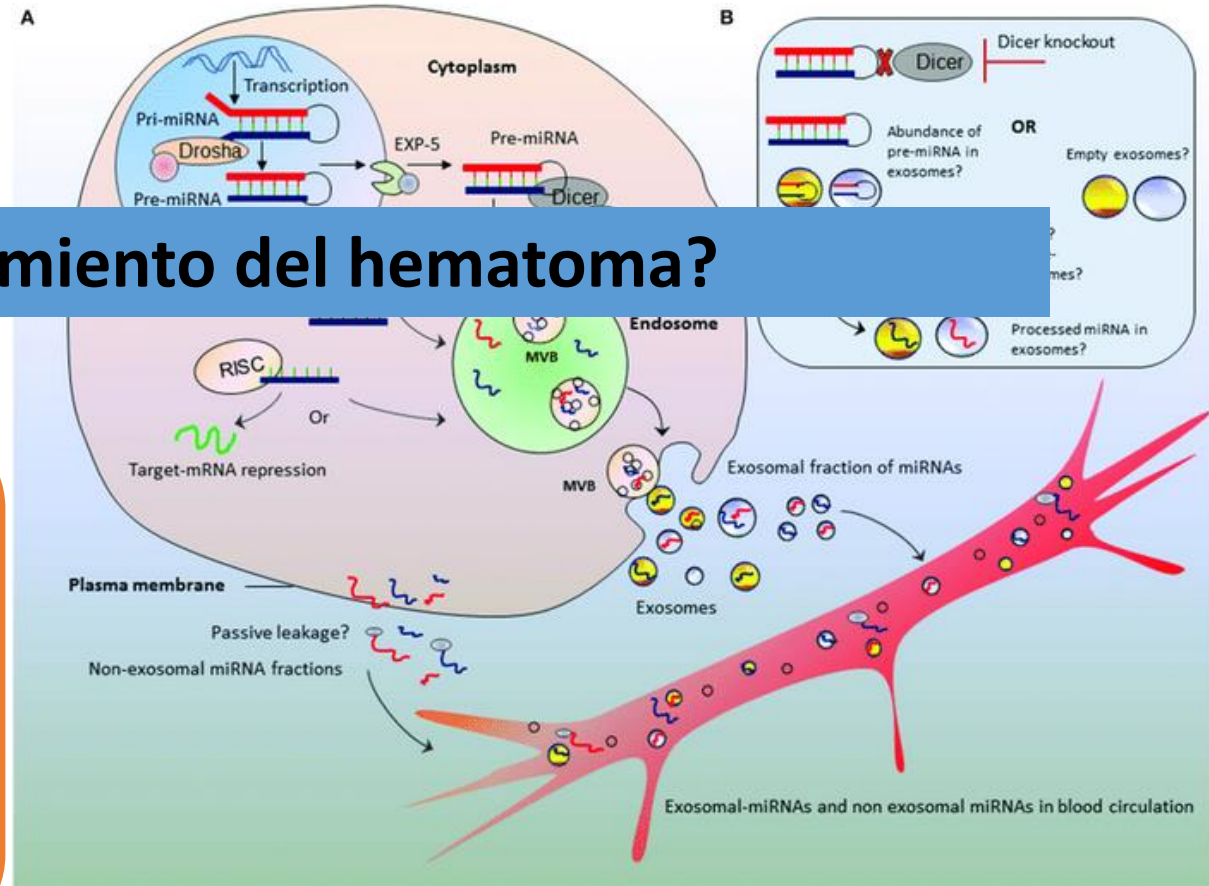
Modificaciones de histonas



Metilación del DNA

¿Biomarcadores de crecimiento del hematoma?

miRNAs circulantes



DNA → mRNA

mRNA → miRNA

miRNA → Protein (inhibited)

RNAs no codificantes (nc-RNAs):

- miRNAs
- lncRNAs
- circRNAs
- siRNAs
- snRNAs

INTRODUCCIÓN



PROYECTO



Subdirección General de
Evaluación y Fomento de la
Investigación



UNIÓN EUROPEA

2021

Application No.:
PI/00209

TITLE: Evaluation of predictive biomarkers of intracerebral hemorrhage growth: focus on non-coding RNAs and cell-free DNA

PRINCIPAL INVESTIGATOR: YOLANDA SILVA BLAS

CO-PRINCIPAL INVESTIGATOR:

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

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

DURATION: **3 YEARS**



OBJETIVOS

- 1. Evaluar la expresión de miRNAs y lncRNAs circulantes en plasma de pacientes con HIC para identificar un perfil de miRNAs/lncRNAs específico del crecimiento del hematoma, analizando muestras de plasma de pacientes de una cohorte de cribado.**
2. Validar los miRNAs y lncRNAs predictivos de crecimiento del hematoma en una cohorte de validación independiente.
3. Determinar la concentración de cf-DNA circulante en plasma de pacientes con HIC para identificar diferencias cuantitativas según la presencia o no de crecimiento del hematoma y su pronóstico funcional.
4. Determinar si la inhibición/sobreexpresión de miRNAs/lncRNAs modulan el daño y la permeabilidad endotelial, la proliferación celular, el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria, así como la expresión de sus dianas, en un modelo *in vitro* de HIC.



METODOLOGIA

VALORACIÓN DE LA HEMÓLISIS DE LAS MUESTRAS

Rotura de la membrana de los eritrocitos y liberación de su contenido.



Métodos de análisis:

A. Ratio absorbancia 414 nm/375nm > 1,4 indica contaminación por hemólisis (*Mensah M. et al., 2017*)

B. $\Delta Cq = Cq \text{ hsa-miR-23a} - Cq \text{ hsa-miR-451}$ (*Dypås, L. Et al., 2020*)

- $\Delta Cq < 5$: baja contaminación de miRNAs por hemólisis
- $5 < \Delta Cq < 7$: moderada contaminación de miRNAs per hemólisis
- $\Delta Cq > 7$: severa contaminación de miRNAs per hemólisis



METODOLOGIA

SELECCIÓN DE LA COHORTE DE CRIBADO

Diagnóstico de hemorragia intracerebral espontánea (<12 horas inicio síntomas): pacientes con y sin crecimiento del hematoma pareados por sexo, edad y factores de riesgo vascular.

Crecimiento relevante precoz del hematoma: crecimiento absoluto en 6 mL y/o el 33% respecto al volumen inicial durante las primeras 24 horas.

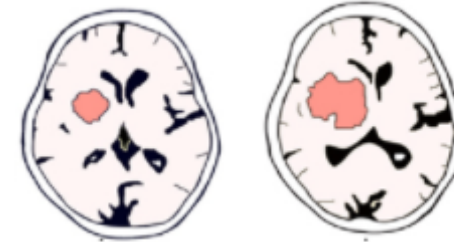
Colección ICT
Biobanc IDIBGI

**Bio
Banc**

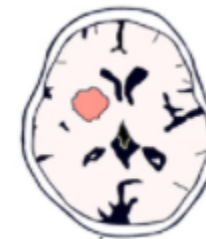


Plasma

Crecimiento
del hematoma



NO crecimiento
del hematoma

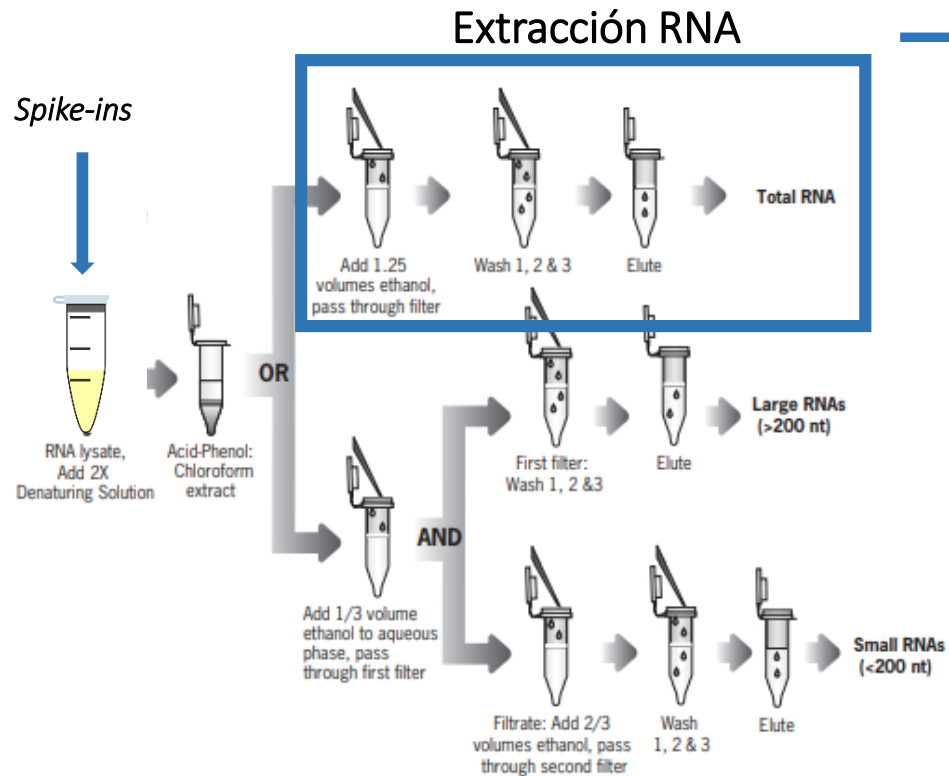




METODOLOGIA

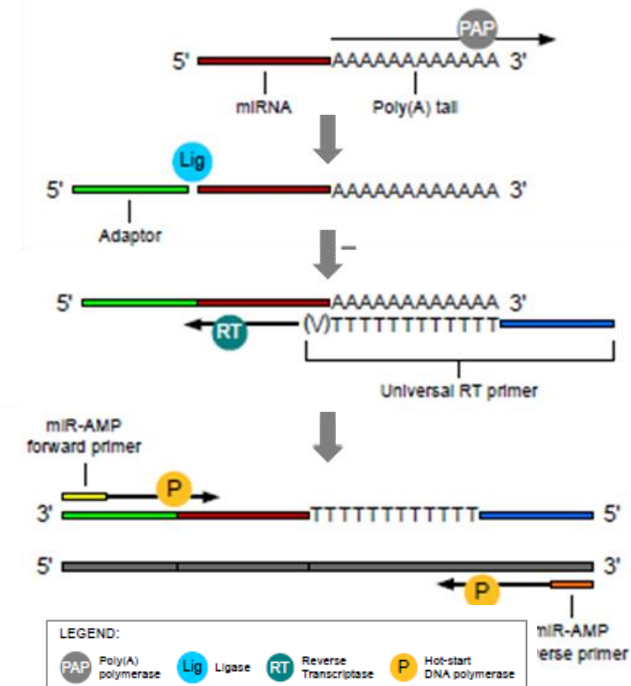
EXTRACCIÓN DE RNA, RETROTRANSCRIPCIÓN Y PREAMPLIFICACIÓN

Extracción de RNA de muestras de plasma con el kit *mirVana PARIS* (Ambion) con la adición de spike-ins.
Retrotranscripción y preamplificación de los miRNAs extraídos con el kit *TaqMan Advanced microRNA cDNA Synthesis* (Applied Biosystems).



mirVana PARIS (Ambion)

Retrotranscripción y preamplificación miRNAs



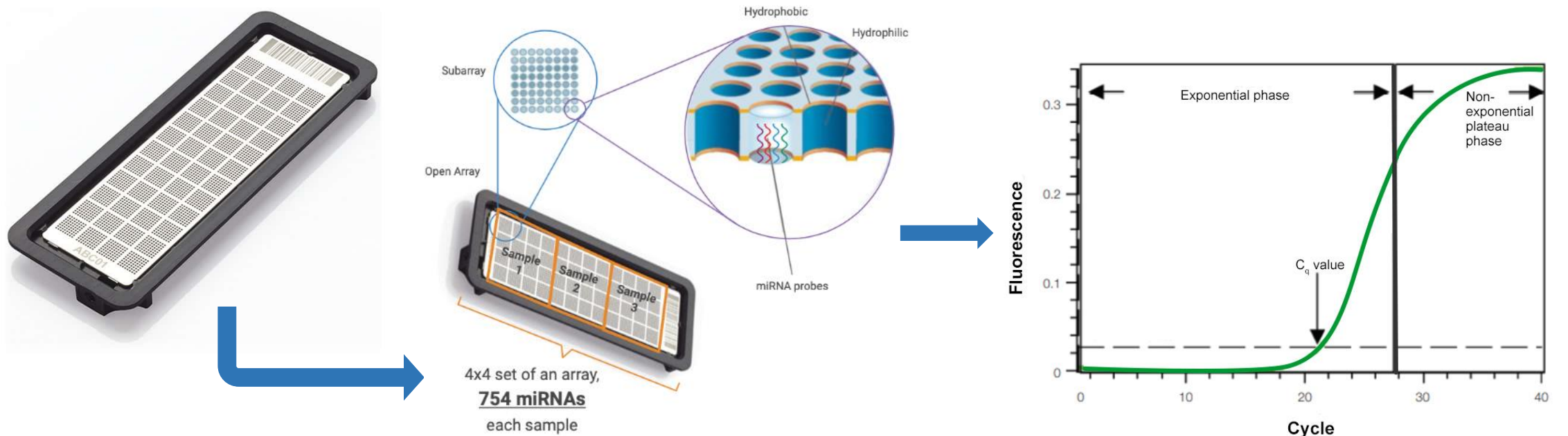
TaqMan Advanced microRNA cDNA Synthesis (Applied Biosystems)



METODOLOGIA

CRIBADO DE miRNAs

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





METODOLOGIA

5. Análisis y normalización de los datos obtenidos del OpenArray

1. Calidad amplificaciones

Cq confidence **>0.6**, AMP score **>1.1** y Cq **<28**

2. Calidad muestras

Muestras **>100** miRNAs

3. Calidad biogrupos

miRNAs expresados **>70%** en cada biogrupo

4. Corrección técnica

$Cq \text{ normalizado} = \text{Valor Cq} - (\text{Valor promedio Cq de los spike-ins} - \text{Mediana total spike-ins})$

 Normalización



METODOLOGIA

5. Análisis y normalización de los datos obtenidos del OpenArray

5. Normalización GLOBAL

Crecimiento del hematoma vs. No crecimiento del hematoma $p\text{-value} < 0,1$ y $FC \pm 1,5$



METODOLOGIA

5. Análisis y normalización de los datos obtenidos del OpenArray

5. Normalización GLOBAL

Crecimiento del hematoma vs. No crecimiento del hematoma $p\text{-value} < 0,1$ y $FC \pm 1,5$

6. Selección endógenos

A) Sin diferencias significativas Global **B)** Expresión 100% muestras **C)** Estabilidad método $2^{-\Delta C't}$ **D)** Cálculo SSS

$$SSS = \sqrt{(Score_{geNorm})^2 + (Score_{NormFinder})^2 + (Score_{CV})^2}$$



METODOLOGIA

5. Análisis y normalización de los datos obtenidos del OpenArray

5. Normalización GLOBAL

Crecimiento del hematoma vs. No crecimiento del hematoma $p\text{-value} < 0,1$ y $FC \pm 1,5$

6. Selección endógenos

A) Sin diferencias significativas Global B) Expresión 100% muestras C) Estabilidad método $2\text{-}\Delta C't$ D) Cálculo SSS

$$SSS = \sqrt{(Score_{geNorm})^2 + (Score_{NormFinder})^2 + (Score_{CV})^2}$$

7. Normalización ENDÓGENOS

Crecimiento del hematoma vs. No crecimiento del hematoma $p\text{-value} < 0,1$ y $FC \pm 1,5$



Selección de miRNAs que cumplen criterio de $p\text{-value}$ y FC tanto en la normalización global como por endógenos

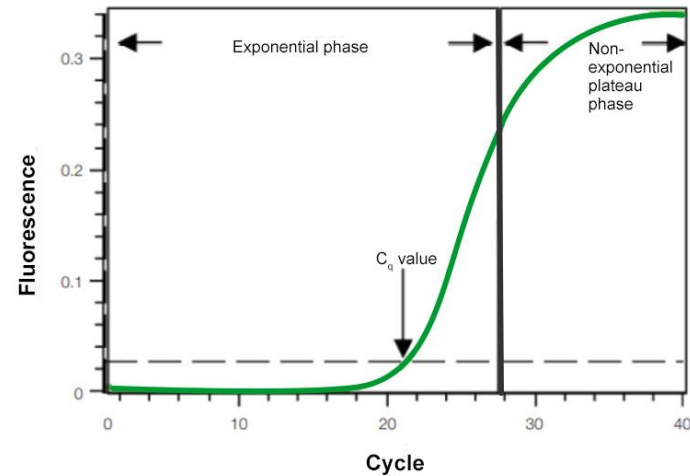


METODOLOGIA

qPCR Y CÁLCULO DE ΔC_q (VALORACIÓN DE LA HEMÓLISIS)

Análisis de 15 muestras divididas en 3 grupos según ratio de absorbancias:

- **Abs 414nm/375nm < 1,4 (N=5)**
- **1,4 < Abs 414nm/375nm < 2 (N=5)**
- **Abs 414nm/375nm > 2 (N=5)**



$$\Delta C_q = C_q \text{ hsa-miR-23a} - C_q \text{ hsa-miR-451}$$

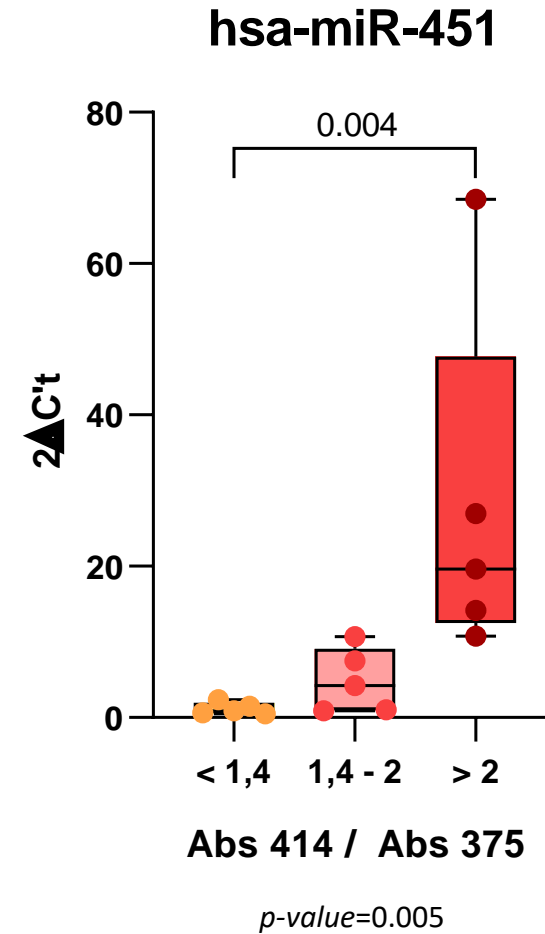
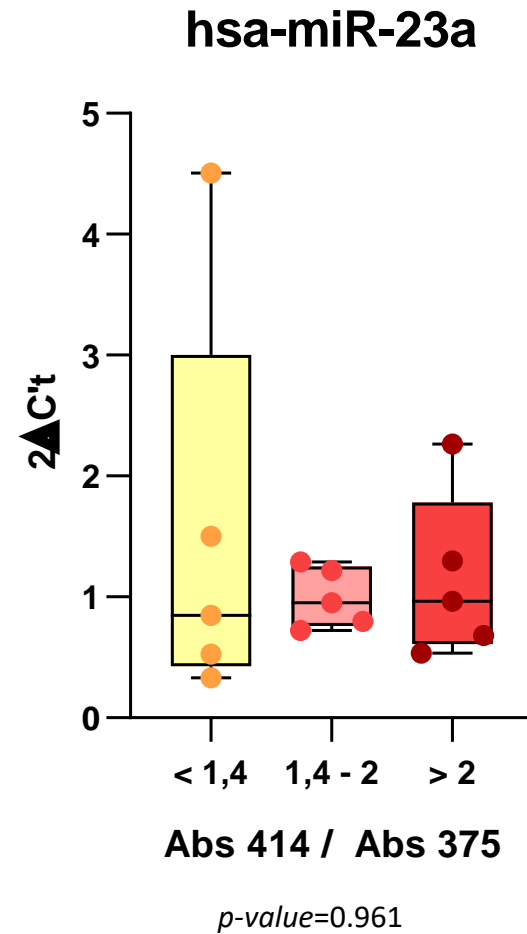
qPCR: análisis de hsa-miR-23a y hsa-miR-451





RESULTADOS

AFECTACIÓN DE LOS RESULTADOS POR HEMÓLISIS





RESULTADOS

AFECTACIÓN DE LOS RESULTADOS POR HEMÓLISIS

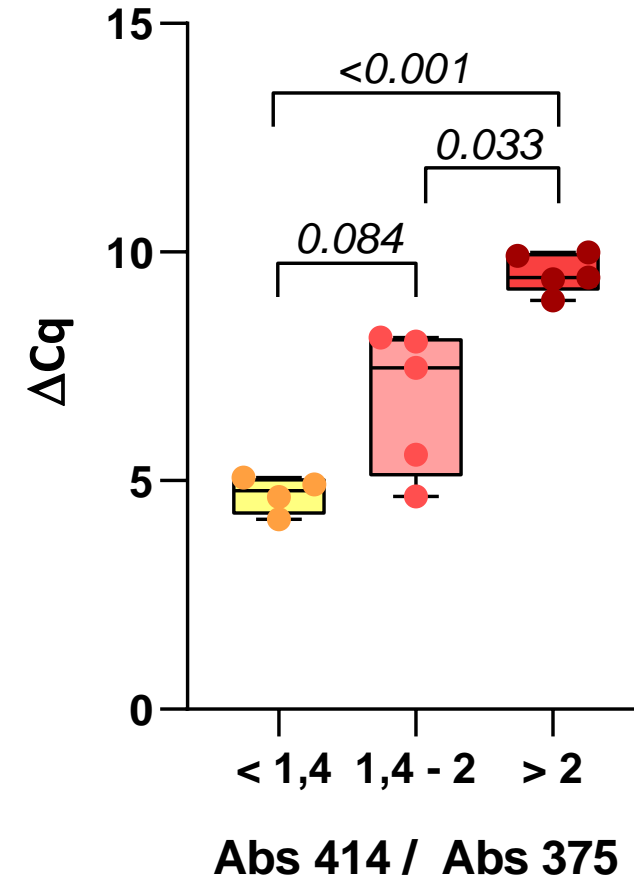
$$\Delta Cq = Cq \text{ hsa-miR-23a} - Cq \text{ hsa-miR-451}$$

- $\Delta Cq < 5$: baja contaminación de miRNAs por hemólisis
- $5 < \Delta Cq < 7$: moderada contaminación de miRNAs per hemólisis
- $\Delta Cq > 7$: severa contaminación de miRNAs per hemólisis

Únicamente las muestras con Abs 414nm/375nm $< 1,4$ presentan $\Delta Cq < 5$.

Se establece el punto de corte para incluir muestras para el cribado de miRNAs en **Abs 414nm/375nm $< 1,4$** .

Afectación por hemólisis





RESULTADOS

COHORTE DE CRIBADO

| | Crecimiento del hematoma | | No crecimiento del hematoma | | <i>p-value</i> |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------|
| | n | Estadísticos descriptivos | n | Estadísticos descriptivos | |
| Edad (Años) | 7 | 76,14 +/- 13,17 | 13 | 67,23 +/- 13,06 | 0,164 |
| NIHSS basal | 7 | 13 (7 - 22) | 13 | 8 (5 - 21,5) | 0,536 |
| Sexo | 7 | | 13 | | 1,000 |
| Mujer | | 3 (42,9) | | 7 (53,8) | |
| Hombre | | 4 (57,1) | | 6 (46,2) | |
| Sangre intraventricular | 7 | | 13 | | 1,000 |
| Sí | | 1 (14,3) | | 3 (23,1) | |
| No | | 6 (85,7) | | 10 (76,9) | |
| Hipertensión basal | 7 | | 13 | | 1,000 |
| Sí | | 6 (85,7) | | 11 (84,6) | |
| No | | 1 (14,3) | | 2 (15,4) | |
| Volumen de hemorragia basal | 7 | 43,21 (8,89 - 51,05) | 13 | 8,78 (4,59 - 17,39) | 0,046 |



RESULTADOS

CALIDAD DE LAS AMPLIFICACIONES, MUESTRAS Y BIOGRUPOS

Análisis de 754 miRNAs en 20 muestras de plasma no hemolizadas.





RESULTADOS

SELECCIÓN DE miRNAs ENDÓGENOS

A. Sin diferencias significativas en la normalización global

└───> 148 miRNAs

B. Expresión en el 100% de las muestras.

└───> 97 miRNAs

C. Estabilidad método $2^{-\Delta C't}$

└───> 83 miRNAs

D. Más estables cálculo SSS

hsa-miR-425-5p

hsa-miR-484



RESULTADOS

POTENCIALES miRNAs BIOMARCADORES DE CRECIMIENTO DEL HEMATOMA

Normalización GLOBAL

Crecimiento del hematoma vs. No crecimiento del hematoma

p-value<0,1 y FC±1,5

18 miRNAs

Normalización ENDÓGENOS

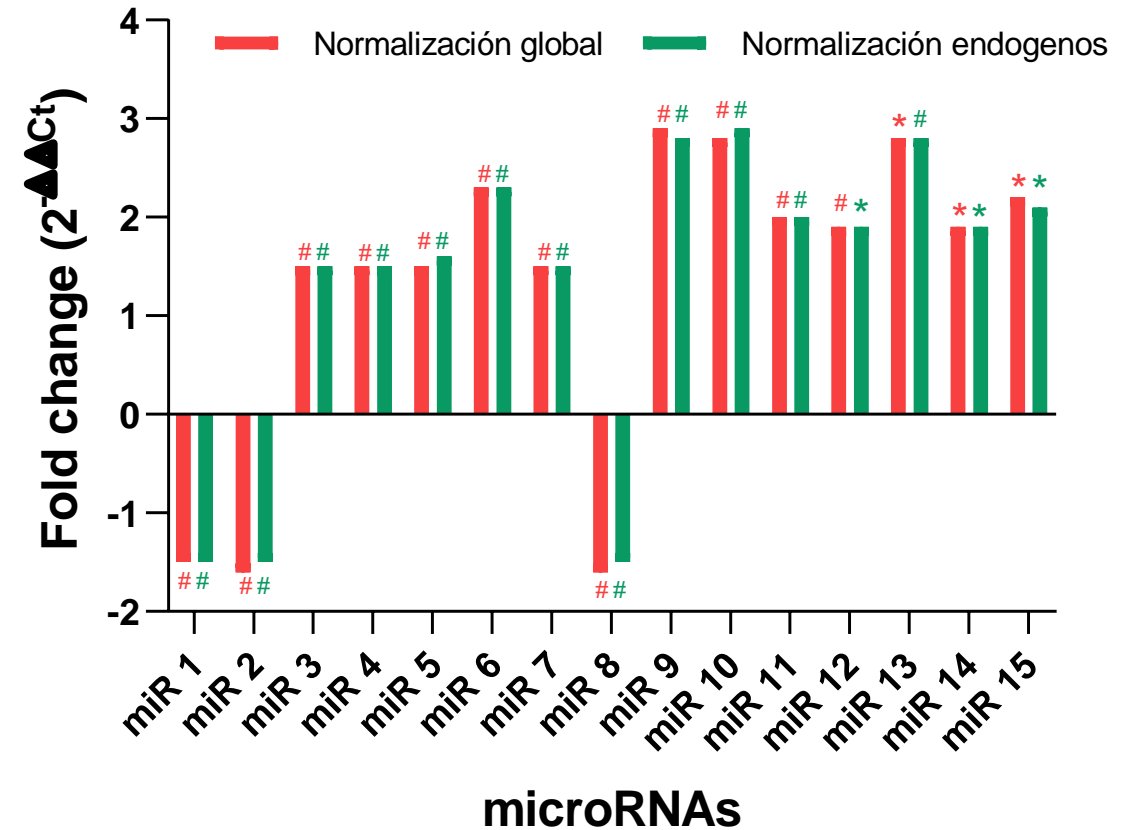
Crecimiento del hematoma vs. No crecimiento del hematoma

p-value<0,1 y FC±1,5

18 miRNAs

15 miRNAs

miRNAs seleccionados para validación



#p-value<0,05, *p-value<0,1



CONCLUSIONES

- Hemos comprobado que el **punto de corte** de Abs414nm/375nm **<1,4** es adecuado para la selección de muestras **no hemolizadas**.
- Hemos identificado **15 miRNAs** como potenciales **biomarcadores** de **crecimiento del hematoma**, los cuales serán validados en una cohorte independiente de pacientes con HIC con y sin crecimiento del hematoma.
- Hemos identificado los miRNAs **hsa-miR-425-5p** y **hsa-miR-484** como los miRNAs **endógenos óptimos** para la normalización de resultados, que serán validados en una cohorte independiente.

miRNAs circulantes como potenciales biomarcadores de crecimiento del hematoma en hemorragia intracerebral: estudio de cribado

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



IDIB
GI Institut
d'Investigació
Biomèdica
de Girona
Dr. Josep Trueta

RICORS-ICTUS



Instituto de Salud Carlos III

