

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 297**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2017** **E 20169652 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2023** **EP 3712280**

54 Título: **Biomarcadores de lesión cerebral traumática**

30 Prioridad:

30.01.2017 WO PCT/GB2017/050231

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:

12.04.2024

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF BIRMINGHAM (100.0%)
Edgbaston
Birmingham B15 2TT, GB

72 Inventor/es:

BELLI, ANTONIO y
DI PIETRO, VALENTINA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 965 297 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores de lesión cerebral traumática

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones, kits, sistemas y métodos para el diagnóstico y/o monitoreo de la lesión cerebral traumática (TBI). Más particularmente, la presente invención se refiere al diagnóstico y monitoreo de TBI usando biomarcadores miARN.

10

Antecedentes de la invención

La lesión cerebral traumática (TBI) es la principal causa de muerte y discapacidad en personas menores de 45 años en los países occidentales. Se espera que su carga sanitaria y sus costos sociales sigan aumentando y, para 2020, la Organización Mundial de la Salud proyecta que la TBI se convierta en la tercera causa principal de discapacidad en todo el mundo.

A pesar de muchos estudios, no se ha encontrado ningún biomarcador fiable que evalúe la gravedad de la TBI y prediga la recuperación. Esto es especialmente cierto para el TBI leve (mTBI), que actualmente sigue siendo difícil de evaluar en la práctica clínica. Aunque los pacientes con TBI son evaluados inicialmente por la Escala de coma de Glasgow (GCS) y las técnicas de neuroimágenes, las herramientas diagnósticas actuales carecen de la capacidad de definir y cuantificar con precisión la gravedad real de la lesión cerebral, lo que conduce a una fácil detección de TBI grave, pero no de mTBI, que representa la gran mayoría de los casos (75-90 %).

El diagnóstico correcto de la mTBI es particularmente importante en pacientes, tales como atletas, soldados y niños, quienes corren un mayor riesgo de mTBI repetitiva y una forma catastrófica de lesión cerebral conocida como síndrome de segundo impacto (SIS), en donde los efectos sinérgicos de la TBI repetida causan un daño profundo e incluso la muerte. El diagnóstico temprano y la evaluación de la gravedad de la TBI se convierten, por lo tanto, en cruciales para el bienestar de los pacientes y, en última instancia, para salvar su vida.

30

La búsqueda de biomarcadores de TBI ha recibido un impulso significativo por el aumento del perfil de la conmoción cerebral deportiva en los medios de comunicación. En los últimos años, muchos estudios se han centrado en biomarcadores que pueden apoyar la toma de decisiones clínicas a pie de campo o en una clínica deportiva. Sin embargo, los biomarcadores proteicos reportados en la literatura carecen de especificidad o sensibilidad, o no son detectables durante algún tiempo después de la lesión. Esto puede deberse al hecho de que después de la conmoción cerebral, que es una forma de TBI, los compuestos derivados del cerebro sólo se liberan en cantidades muy pequeñas y la barrera hematoencefálica permanece en su mayoría cerrada.

35

Los microARN (miARN) son una clase abundante de moléculas de ARN altamente conservadas y no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud que inducen la degradación del ARNm, la represión traslacional o ambos mediante el emparejamiento con sitios parcialmente complementarios en la UTR 3 de los genes objetivo. El genoma humano codifica más de 2000 miARN, que pueden dirigirse a aproximadamente el 60 % de todos los genes. Sin embargo, a pesar de la abundancia de miARN, sus funciones biomoleculares y su participación en la patología aún no están completamente esclarecidas. Desempeñan un papel central en muchos procesos biológicos, incluyendo el ciclo celular, el metabolismo celular, la apoptosis y las respuestas inmunitarias, y están atrayendo un creciente interés en la investigación clínica como biomarcadores potenciales para la detección, identificación y clasificación de cánceres y otros estados de la enfermedad, incluyendo enfermedades neurodegenerativas.

40

45

WO 2015/134551 divulga métodos para diagnosticar y/o monitorear la TBI o lesión de múltiples órganos mediante la detección de miARN circulantes liberados después de una lesión cerebral traumática o una enfermedad.

50

WO 2015/196191 divulga un método para diagnosticar lesiones cerebrales traumáticas leves (mTBI) en un sujeto, en donde el método comprende determinar un nivel o niveles de uno o más microARN (miARN) en una muestra biológica tomada del sujeto.

55

NAGARAJA BALAKATHIRESAN ET AL (2012-05-01) indica que let-7i-5p es un biomarcador prometedor para blast-TBI.

El presente invento fue ideado teniendo en cuenta estas cuestiones.

60 Breve descripción de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Esta invención se refiere a los métodos y sistemas de detección relacionados con el diagnóstico y monitoreo de la lesión cerebral traumática leve (mTBI) en un sujeto humano que ha sufrido una lesión en la cabeza al detectar una o más moléculas de miARN en una muestra biológica del sujeto. En el contexto de la siguiente divulgación, los términos "nivel"

65

y "cantidad" en referencia al nivel o cantidad de una molécula o moléculas de miARN en una muestra biológica se utilizan indistintamente.

5 En un primer aspecto, la invención proporciona un método de diagnóstico y/o monitoreo de lesión cerebral traumática leve (mTBI) en un sujeto, en donde el método comprende la determinación de un nivel de al menos un miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto, en donde al menos un miARN comprende let-7i-5p.

En este aspecto de la invención, un nivel regulado al alza de al menos un miARN puede ser indicativo de mTBI.

10 En este aspecto de la invención, el sujeto puede ser diagnosticado con mTBI si el nivel de al menos un miARN está por encima de un umbral predeterminado o aumentado en relación con un control, preferiblemente, en donde el umbral predeterminado es equivalente a un cambio en número de veces de 2 o más en el método 2-delta delta CT (2- $\Delta\Delta$ CT).

15 En este aspecto de la invención, el método puede comprender determinar un nivel de al menos dos miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto, preferiblemente en donde al menos dos miARN se seleccionan de:

- a. let-7i-5p y miR-142-3p;
- b. let-7i-5p y miR-107;
- c. let-7i-5p y miR-135b-5p; o
- d. let-7i-5p y miR-27b-3p.

20 En este aspecto de la invención, un nivel regulado al alza de al menos dos miARN puede ser indicativo de mTBI.

En este aspecto de la invención, el sujeto puede ser diagnosticado con mTBI si el nivel de al menos dos miARN está por encima de un umbral predeterminado o aumentado en relación con un control.

25 En este aspecto de la invención, el umbral predeterminado puede ser equivalente a un cambio en número de veces de 1,5 o más en el método 2-delta delta (2- $\Delta\Delta$ CT).

En este aspecto de la invención, se puede obtener la muestra de saliva:

- 30 a. hasta 20, 18, 15, 12, 10, 8, 5 o 2 días desde la lesión;
- b. no más de 72, 48, 36, 24, 12, 6, 4, 2 o 1 horas después de la lesión;
- c. al menos 24 horas de la lesión;
- d. hasta 15 días después de la lesión;
- e. 24 horas a 15 días después de la lesión;
- 35 f. 24 horas a 10 días después de la lesión;
- g. 24 horas a 7 días después de la lesión; o
- h. 2 a 5 días después de la lesión.

40 En este aspecto de la invención, el método puede comprender la determinación de un nivel de miARN let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p.

45 En este aspecto de la invención, el método además puede comprender determinar un nivel de uno o más miARN seleccionados de let-7c-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, y miR-424-5p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, o miR-652-3p.

En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de un sistema de detección en un método para el diagnóstico y/o monitoreo de mTBI, en donde el sistema de detección comprende

- 50 - un elemento sensor que comprende un sustrato funcionalizado con una sonda específica para let-7i-5p, en donde la sonda comprende un ácido nucleico que tiene al menos 70 % de identidad con una secuencia que es el complemento de la secuencia de let-7i-5p, preferiblemente, en donde la sonda comprende un ácido nucleico que tiene al menos 70 % de identidad con una secuencia que es el complemento de SEQ ID NO: 25, y
- un dispositivo de detección capaz de detectar la unión de un miARN objetivo a la sonda. En este aspecto de la invención, el uso del sistema de detección, puede comprender además los medios para determinar si el miARN objetivo está regulado al alza.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un fármaco neuroprotector o un sedante para su uso en un método de tratamiento de mTBI en un sujeto, en donde se ha identificado que dicho sujeto tiene una mTBI mediante la determinación del nivel de let-7i-5p en una muestra de saliva obtenida del sujeto.

60 Se divulga, pero no es parte de la invención, que el miARN también se puede seleccionar del grupo que consiste en miR-27b-3p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p, o cualquier combinación de los mismos. En las realizaciones, un nivel elevado de al menos un miARN es indicativo de mTBI. En las realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene mTBI si el nivel de al menos un miARN está por encima de un umbral predeterminado o aumentado en relación con un control. En las realizaciones, el umbral predeterminado es equivalente a un cambio en número de veces de 2 o más en el método 2-delta delta CT (2- $\Delta\Delta$ CT). Al menos un miARN también puede ser miR-27b-3p. En las realizaciones, al menos un miARN

comprende let-7i-5p. Al menos un miARN también puede ser miR-142-3p. Al menos un miARN también puede ser miR-107. Al menos un miARN también puede ser miR-135b-5p.

En las realizaciones, el método comprende determinar un nivel de al menos dos miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto. En las realizaciones, al menos dos miARN se seleccionan de let-7i-5p y miR-27b-3p, miR-142-3p, miR-107 o miR-135b-5p. En las realizaciones, un nivel elevado de al menos dos miARN es indicativo de mTBI. En las realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene mTBI si el nivel de al menos dos miARN está por encima de un umbral predeterminado o aumentado en relación con un control. En las realizaciones, el umbral predeterminado es equivalente a un cambio en número de veces de 1,5 o más en el método 2-delta delta CT (2- $\Delta\Delta$ CT).

En las realizaciones, la muestra de saliva se obtiene de 24 horas a 15 días después de la lesión. En las realizaciones, la muestra de saliva se obtiene de 24 horas a 7 días después de la lesión, o de 2 a 5 días después de la lesión. En otras realizaciones, se puede obtener más de una muestra de saliva. Las muestras de saliva se pueden obtener en diferentes puntos de tiempo para permitir el monitoreo del sujeto, o el monitoreo de la TBI, o el monitoreo de la recuperación del sujeto.

En las realizaciones, el método incluye determinar un nivel de los miARN miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p.

Los métodos además pueden comprender determinar un nivel de uno o más miARN adicionales seleccionados de let-7c-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, y miR-424-5p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, o miR-652-3p.

Otro aspecto de la invención es el uso de un sistema de detección en un método de diagnóstico y/o monitoreo de la mTBI. Este aspecto de la invención proporciona un elemento sensor para un sistema de detección para el diagnóstico y/o monitoreo de mTBI, en donde el elemento sensor comprende un sustrato funcionalizado con una sonda específica para al menos let-7i-5p. En las realizaciones, la sonda comprende un ácido nucleico capaz de unirse a al menos un miARN. En las realizaciones, la sonda comprende un ácido nucleico que tiene al menos 70 % de identidad con una secuencia que es el complemento de la secuencia del miARN objetivo. En las realizaciones, la sonda comprende un ácido nucleico que tiene al menos 70 % de identidad con una secuencia que es el complemento de SEQ ID NO: 25. También puede ser la SEQ ID NO: 26, 35, 39 o 40

Este aspecto de la invención también proporciona el uso de un sistema de detección para el diagnóstico y/o monitoreo de mTBI, que comprende un elemento sensor como se describe en la presente, y un dispositivo de detección capaz de detectar la unión de un miARN objetivo a la sonda. En las realizaciones, el sistema de detección comprende además un medio para determinar si el miARN objetivo se regula al alza.

Se divulga, pero no es parte de la invención, un método previsto para determinar un curso de acción para un sujeto con sospecha de tener mTBI, que comprende la aplicación de una muestra de saliva obtenida del sujeto a un sistema de detección como se describe en la presente, si se detecta un nivel regulado al alza de al menos un miARN proporcionando un tratamiento para mTBI.

Se divulga, pero no es parte de la invención, un método que comprende determinar un nivel de al menos dos miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto, preferiblemente en donde al menos dos miARN se seleccionan de:

- let-7i-5p y miR-142-3p;
- let-7i-5p y miR-107;
- let-7i-5p y miR-135b-5p; o
- let-7i-5p y miR-27b-3p.

Se divulga, pero no es parte de la invención, un método para tratar a un sujeto con sospecha de mTBI, en donde el método comprende

- determinar si un nivel regulado al alza de al menos un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p es detectable en una muestra de saliva obtenida del sujeto, y
- si se detecta un nivel regulado al alza de al menos un miARN que proporciona tratamiento para mTBI al sujeto.

Figuras

Figura 1: expresión de miR-425-5p y miR-502 en 3 categorías diferentes de trauma, y expresión de HVMiR-425-5p y miR-502 en 10 HV, 10 mTBI+EC (1 día), 10 mTBI+EC (15 días), 10 EC (1 día), 10 EC (15 días), 10 sTBI+EC (1 día) y 10 sTBI+EC (15 días) pacientes, detectado mediante análisis qRT-PCR. Se observó una disminución notable de la expresión de miR-425-5p en mTBI+EC (1 día) en comparación con HV ($p<0,01$), mTBI+EC (15 días) ($p<0,001$) y sTBI+EC (1 día) ($p<0,01$) (Figura 1A). Se observó una disminución notable de la expresión de miR-502 en mTBI+EC (1 día) en comparación con HV ($p<0,05$), mTBI+EC (15 días) ($p<0,01$) y sTBI+EC (1 día) ($p<0,05$) (Figura 1B).

Figura 2: expresión de miR-21 y miR-335 en 3 categorías diferentes de trauma, y expresión de HV miR-21 y miR-335 en 10 HV, 10 mTBI+EC (1 día), 10 mTBI+EC (15 días), 10 EC (1 día), 10 EC (15 días), 10 sTBI+EC (1 día) y 10 sTBI+EC (15 días) pacientes, detectado mediante análisis qRT-PCR. Se observó una disminución notable de la expresión de miR-21 en mTBI+EC (1 día) en comparación con HV ($p<0,01$), mTBI+EC (15 días) ($p<0,001$) y sTBI+EC (1 día) ($p<0,01$) (Figura 2A). Se observó una disminución notable de la expresión de miR-335 en mTBI+EC (1 día) en comparación con HV ($p<0,05$), mTBI+EC (15 días) ($p<0,01$) y sTBI+EC (1 día) ($p<0,05$) (Figura 2B).

días) pacientes, detectado mediante análisis qRT-PCR. Se observó que la expresión de miR-21 estaba regulada al alza significativamente en sTBI+EC (1 día y 15 días) en comparación con HV ($p<0,01$) (Figura 2A). Se observó que la expresión de miR-335 estaba regulada al alza notablemente en sTBI+EC (1 día) en comparación con HV ($p<0,001$), EC (15 días) ($p<0,001$) y mTBI+EC (1 día) ($p<0,05$) (Figura 2B).

Figura 3: Evolución temporal de la expresión de miR-425-5p (Figura 3A) y miR-502 (Figura 3B) en 3 categorías diferentes de traumatismo

y la expresión de HVMiR-425-5p y miR-502 en 30 HV, 30 mTBI+EC, 30 EC, 30 sTBI+EC pacientes en diferentes puntos de tiempo de la lesión (T0, T4-12 h, T48-72 h, 15 días) detectada mediante análisis qRT-PCR. Se observó una disminución notable de la expresión de miR-425-5p en mTBI+EC a T0 y T4-12 h en comparación con HV, sTBI+EC y EC ($p<0,05$). Se observó una disminución notable de la expresión de miR-502 en mTBI+EC a T0 y T4-12 h en comparación con HV, sTBI+EC y EC ($p<0,05$). Los valores de P se determinaron mediante la prueba post-hoc de Tukey.* significativamente diferentes de HV

Figura 4: Evolución temporal de la expresión de miR-21 (Figura 4A) y miR-335 (Figura 4B) en 3 categorías diferentes de traumatismo

y la expresión de HVMiR-21 y miR-335 en 30 HV, 30 mTBI+EC, 30 EC y 30 sTBI+EC pacientes en diferentes puntos de tiempo de la lesión (T0, T4-12 h, T48-72 h, 15 días) detectada mediante análisis qRT-PCR. Se observó que la expresión de miR-21 estaba regulada al alza significativamente sTBI+EC a los T4-12 h, T48-72 h y 15 días en comparación con HV ($p<0,01$). Se observó que la expresión de miR-335 estaba regulada al alza notablemente en sTBI+EC a los T0, T4-12 h, T48-72 h y 15 días en comparación con HV y mTBI+EC ($p<0,001$), pero no sólo EC. Los valores de P se determinaron mediante la prueba post-hoc de Tukey.* significativamente diferentes de HV

Figura 5: Diagrama de cuadros de expresión relativa de los 5 microARN que mostraron una regulación al alza significativa ($p<0,05$) en el grupo de validación y evaluados mediante RT-PCR. Se utilizó una prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney) para comparar el nivel de microARN en los dos grupos independientes.

Figura 6: Curva de características operativas del receptor (ROC) y estadísticas de área bajo la curva (ABC) correspondiente para biomarcadores identificados en la cohorte de validación.

Descripción detallada de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona un método para diagnosticar o monitorear la lesión cerebral traumática leve (mTBI) en un sujeto.

Se divulga, pero no es parte de la invención, un método de diagnóstico y/o monitoreo de lesión cerebral traumática leve (mTBI) en un sujeto, en donde el método comprende la determinación de un nivel de al menos un miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto.

También puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g, miR-335, miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, miR-671-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-424-5p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, miR-652-3p, miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p y miR-629. Estos miARN pueden denominarse en la presente miARN de interés o miARN de objetivo.

En algunas realizaciones, al menos un miARN también puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g, miR-335, hsa-miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, y miR-671-3p. Se ha encontrado que estos microARN son biomarcadores expresados en todos los pacientes con TBI (leve o grave).

En algunas realizaciones, al menos un miARN también puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g y miR-335.

También puede seleccionarse del grupo que consiste en let-7c-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, y miR-424-5p; miR-30a-5p; miR-107; miR-135b-5p; miR-199b-5p; miR-324-5p; miR-652-3p.

También se puede seleccionar del grupo que consiste en miR-27b-3p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p.

En algunas realizaciones, al menos un miARN también puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-194, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p y miR-629.

Para evitar dudas, se entenderá que "al menos un miARN se selecciona de un grupo de miARN", como se utiliza en la presente, significa que el método en cuestión, ya sea realizado para un diagnóstico, pronóstico, o propósito terapéutico,

puede llevarse a cabo con cualquiera de los miARN enumerados o con cualquier pluralidad de los miARN enumerados (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más de los miARN enumerados). De ello se deduce que cualquiera o más de los miARN enumerados pueden excluirse explícitamente. Por ejemplo, en donde se selecciona al menos un miARN del grupo que consiste en miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g and miR-335, el método puede incluir la detección y/o evaluación del nivel de cualquier combinación de miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21 y miR-let-7g, con la exclusión de miR-335.

Por ejemplo, de acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método de diagnóstico y/o monitoreo de la lesión cerebral traumática leve (mTBI) en un sujeto, en donde el método comprende la determinación de un nivel de al menos dos miARN en una muestra del sujeto, en donde el miARN se selecciona del grupo que consiste en let-7i-5p y miR-27b-3p, let-7i-5p y miR-142-3p, let-7i-5p y miR-107, o let-7i-5p y miR-135b-5p.

Se divulga, pero no es parte de la invención, un método de diagnóstico y/o monitoreo de lesión cerebral traumática leve (mTBI) en un sujeto, en donde el método comprende determinar un nivel de al menos un miARN en una muestra de saliva del sujeto, en donde el miARN también se puede seleccionar del grupo que consiste en: miR-425-5p; miR-502; miR-21; y miR-335.

La lesión cerebral traumática ocurre cuando una fuerza externa lesiona el cerebro de forma traumática.

Existen diferentes sistemas para clasificar la TBI en función de , por ejemplo, la gravedad, el tipo de lesión y el pronóstico. El sistema más comúnmente utilizado para clasificar la TBI es la Escala de Coma de Glasgow (GCS), que califica el nivel de conciencia de una persona en una escala de 3-15 con base en reacciones verbales, motoras y que abren los ojos a los estímulos. En general, una TBI con un puntaje GCS de 13 o más se define como leve, 9-12 como moderada y 8 o menos como grave. Otro sistema, el Sistema de Clasificación de Mayo, tiene tres clasificaciones principales que incluyen una TBI moderada-grave definida, TBI leve probable y posible TBI. En cada diagnóstico se utilizan múltiples criterios, tal como pérdida del conocimiento, amnesia postraumática, fractura de cráneo y evidencia de anomalías neurorradiológicas, tal como hematoma subdural, contusión cerebral y contusión hemorrágica. La clasificación de TBI utilizando los sistemas GCS o MAYO será conocida por aquellos expertos en la técnica

Como se utiliza en la presente, las referencias a TBI "leve", "moderada" y "grave" se hacen de acuerdo con la GCS. Las referencias de en la presente a la TBI "moderada a grave" abarcan tanto la TBI moderada como la grave de acuerdo con la GCS.

Como se usa en la presente, una referencia a TBI leve (mTBI) también es una referencia a la conmoción cerebral.

Se espera que el diagnóstico y/o el monitoreo de la TBI mediante los biomarcadores apoyen la toma de decisiones clínicas y los regímenes de tratamiento en una variedad de contextos, incluyendo las siguientes situaciones: como parte del valoración inicial de los paramédicos para determinar si los pacientes deben ser transportados a un centro con experiencia en neurocirugía, a un centro de traumatología importante, o a una unidad local de traumatología; en el departamento de urgencias de los hospitales para determinar el tratamiento adecuado, incluyendo la necesidad de una tomografía computarizada cerebral; a pie de campo, para ayudar a la toma de decisiones en cuanto a la eliminación de un jugador del juego y valorar la necesidad de llevar a un jugador al hospital; en las clínicas deportivas, para confirmar un evento de conmoción cerebral y permitir la toma de decisiones con respecto a volver al juego; en situaciones de combate, para determinar la necesidad de enviar un equipo de rescate y evacuar a una víctima. Por lo tanto, los sujetos para quienes la presente invención y divulgación no de acuerdo con la invención reivindicada proporcionan un beneficio particular incluyen víctimas de accidentes, jugadores deportivos y personal militar.

En cualquier caso, pero tal vez particularmente cuando el sujeto está en mayor riesgo de una TBI (por ejemplo, cuando el sujeto es un atleta profesional o está alistado en el ejército), se puede obtener una muestra del sujeto en un momento previo a cualquier trauma conocido o reciente (por ejemplo, cerca del comienzo de una carrera deportiva o antes de un despliegue militar) y cualquier miARN de interés se puede evaluar en ese momento o más tarde, cuando el sujeto ha experimentado una posible TBI. Tales muestras pueden proporcionar así un estándar de referencia interno.

En algunas realizaciones, el sujeto es un humano.

La TBI puede ser TBI leve (mTBI), TBI moderada o TBI grave (sTBI). En algunos ejemplos no conformes con la invención reivindicada, la TBI es de moderada a grave (m-sTBI).

El nivel del miARN o de cada miARN en la muestra se puede determinar cuantitativa o semicuantitativamente. Por "cuantitativamente", se entenderá que se determina la cantidad o concentración absoluta del miARN o de cada miARN en la muestra. La cantidad absoluta de miARN o de cada miARN en la muestra puede entonces compararse con un umbral predeterminado (por ejemplo, un valor de la literatura publicada para los niveles normales esperados), un nivel conocido del mismo o un miARN de referencia en una muestra de control tomada de un sujeto sano, o la cantidad de un miARN de referencia en la muestra tomada del sujeto. En algunas realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene una TBI cuando el nivel del miARN está por debajo del umbral predeterminado, o disminuye en relación con una muestra de referencia o control. En otras realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene una TBI cuando el nivel del miARN está aumentado en

comparación con el umbral predeterminado.

Por “semicuantitativamente”, se entenderá que el nivel del o cada miARN de interés se mide en relación con una referencia.

La referencia puede ser un miARN invariante, es decir, un miARN que tiene un nivel de expresión que permanece sustancialmente sin cambios entre los sujetos sanos y aquellos que tienen una TBI. Se puede diagnosticar que un sujeto sufre de una TBI si el nivel del miARN o de cada miARN de interés se incrementa o disminuye en relación con el de un miARN invariante. Los miARN invariantes adecuados incluyen miR-331, miR-223*, miR-23a-3p y miR148b-3p. miR-23a-3p y miR148b-3p son invariantes sólo en saliva.

En algunas realizaciones, el nivel del miARN o de cada miARN en la muestra obtenida del sujeto puede ser de aproximadamente 0,01 veces a aproximadamente 100 veces, aproximadamente 0,05 veces a aproximadamente 50 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 0,5 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3 veces, o aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 2,0 veces más bajo o más alto que el nivel en la muestra de control, el nivel de referencia o el valor publicado.

Cuando se emplea un dispositivo o método para generar un valor, podemos calificar ese valor con el término “aproximadamente” para capturar el valor declarado y cualquier variación de ese valor inherente al dispositivo o método empleado. Cuando los valores o rangos de valores se divulgan específicamente, “aproximadamente” puede significar más o menos el 10 % del valor o rango indicado. Por ejemplo, aproximadamente 10 minutos puede significar 9-11 minutos.

El nivel del miARN o de cada miARN de interés se puede determinar utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, determinar el nivel del miARN o de cada miARN de interés comprende amplificar el miARN. En algunas realizaciones, el miARN total puede aislarse primero de la muestra utilizando técnicas estándar, por ejemplo, utilizando el mini kit miRNeasy (Qiagen). La cantidad del miARN de interés puede entonces ser determinada. En algunas realizaciones, el nivel del miARN o de cada miARN de interés en la muestra se determina mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Por ejemplo, la PCR cuantitativa puede utilizarse para la determinación cuantitativa del nivel del miARN o de cada miARN de interés. La PCR también se puede utilizar para la determinación semicuantitativa, comparando el nivel del miARN o de cada miARN de interés en la muestra con el de una referencia (por ejemplo, un miARN invariante).

Las técnicas adecuadas para la detección y/o cuantificación de miARN, que serán conocidas por los expertos en la técnica, incluyen qPCR, ensayos de miARN, secuenciación de última generación (NGS) y ensayos de perfiles de miARN multiplex.

En algunas realizaciones, el nivel del miARN o de cada miARN de interés se determina mediante hibridación *in situ*, por ejemplo, utilizando una sonda (por ejemplo, una sonda etiquetada) específica para el miARN.

El nivel de miARN puede determinarse en una muestra que se obtuvo del sujeto inmediatamente después de la lesión (es decir, menos de 1 hora después de la lesión), y/o en una muestra obtenida en uno o más puntos de tiempo unas horas o días después de la lesión. Por lo tanto, los cambios en el nivel de miARN se pueden detectar con el tiempo para permitir el monitoreo de una TBI. En caso de que los niveles de miARN cambien con el tiempo, los métodos descritos en la presente para monitorear la TBI pueden ampliarse para incluir el mantenimiento o ajuste del régimen de tratamiento del sujeto en consecuencia.

Dependiendo del miARN específico y del tipo de TBI, el nivel de miARN en el sujeto puede cambiar significativamente con el tiempo. En algunas realizaciones, por lo tanto, puede ser ventajoso medir el miARN relativamente pronto después de la lesión para permitir un diagnóstico preciso. En algunas realizaciones, el nivel de miARN se determina en una muestra obtenida del sujeto no más de 72 horas, no más de 48 horas, no más de 36 horas, no más de 24 horas, no más de 12 horas, no más de 6 horas, no más de 4 horas, no más de 2 horas o no más de 1 hora después de la lesión.

El nivel de algunos miARN es sustancialmente estable con el tiempo, lo que permite realizar un diagnóstico unas pocas horas, días o incluso semanas después de la lesión. En algunas realizaciones, el nivel de miARN se determina en una muestra obtenida del sujeto hasta 20, 18, 15, 12, 10, 8, 5 o 2 días a partir de la lesión.

En algunas realizaciones, el nivel de miARN se determina en una muestra obtenida del sujeto inmediatamente después de la lesión (por ejemplo, a T= 0 h), a las 4-12 horas después de la lesión, a las 48-72 horas después de la lesión, o a los 15 días después de la lesión.

En algunas realizaciones, el nivel de miARN se determina en una muestra obtenida del sujeto al menos 24 horas después de la lesión. En algunas realizaciones, el nivel de miARN se determina en una muestra obtenida del sujeto 15 días o menos después de la lesión. En algunas realizaciones, el nivel de miARN se determina en una muestra obtenida del sujeto entre 24 horas y 15 días después de la lesión, o entre 24 horas y 10 días después de la lesión, o entre 24 horas y 7 días después de la lesión, o entre 48 horas y 5 días después de la lesión.

En algunas realizaciones, la TBI es leve (mTBI). En ejemplos no conformes con la invención reivindicada, la TBI es una

TBI de moderada a grave (m-sTBI) y al menos un miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g, miR-335, hsa-miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, y miR-671-3p.

5 En ejemplos no conformes con la invención reivindicada, la TBI es TBI leve (mTBI) y el miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-425-5p y miR-502. Se puede diagnosticar que el sujeto tiene mTBI si se determina que el nivel de miR-425-5p y/o miR-502 está por debajo de un umbral predeterminado, o se reduce en relación con una referencia.

10 Un nivel de miR-425-5p y/o miR-502 que está por debajo de un umbral predeterminado, o disminuido en relación con una referencia, es diagnóstico de mTBI cuando el nivel se determina en una muestra obtenida menos de 48 horas después de la lesión.

15 En algunos ejemplos no conformes con la invención reivindicada, la TBI es TBI moderada a grave (m-sTBI) y el miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-21 y miR-335. Se puede diagnosticar que el sujeto presenta TBI de moderada a grave si se determina que el nivel de miR-21 y/o miR-335 está por encima de un umbral predeterminado, o se ha aumentado en relación con una referencia.

20 Un nivel de miR-21 y/o miR-335 que está por encima de un umbral predeterminado, o aumentado en relación con una referencia, es diagnóstico de TBI de moderada a grave cuando el nivel se determina en una muestra obtenida hasta 15 días después de la lesión.

25 En algunos ejemplos no conformes con la presente invención, la TBI es una TBI de moderada a grave (m-sTBI) y al menos un miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-194, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p y miR-629.

30 El paciente puede ser diagnosticado con m-sTBI si el nivel de miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-194, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642 y/o miR-99a se determina que está por encima de un umbral predeterminado, o está aumentado en relación con una referencia.

Se puede diagnosticar que el sujeto presenta m-sTBI si se determina que el nivel de miR-192, miR-429, miR-520D-3p y/o miR-629 está por debajo de un umbral predeterminado o está reducido en relación con una referencia.

35 Los miARN se pueden utilizar individualmente para diagnosticar la TBI. Por ejemplo, en la conmoción cerebral deportiva, miR-502 o miR-425-5p podrían usarse para confirmar que se ha producido una lesión cerebral traumática.

40 Existe un método para determinar la gravedad de la TBI, y los pasos de este método se pueden repetir para monitorear al sujeto a lo largo del tiempo. Se entenderá que un resultado positivo para un solo miARN (por ejemplo, se determina que el nivel de un solo miARN está por encima/por debajo de un umbral predeterminado, o que aumenta/disminuye en relación con una referencia) es suficiente para determinar la gravedad de la TBI. Por ejemplo, si el nivel de miR-425-5p está por debajo de un umbral predeterminado, o disminuye en relación con una referencia, se determina que la gravedad de la TBI es leve (mTBI). Sin embargo, puede ser conveniente combinar diferentes miARN (por ejemplo, en un panel prueba) para facilitar la valoración de gravedad de TBI.

45 El método puede comprender la determinación de un nivel de una pluralidad (por ejemplo, dos o más) miARN en la muestra. Los dos o más miARN objetivo puede seleccionarse del grupo que consiste en: miR-425-5p; miR-502; miR-21; y miR-335.

50 El método puede comprender la determinación del nivel de:
(i) un primer miARN seleccionado de miR-425-5p y miR-502; y
(ii) un segundo miARN seleccionado de miR-21 y miR-335.

55 Un sujeto puede ser diagnosticado con una TBI si se determina que el nivel de miR-425-5p o miR-502 está por debajo de un umbral predeterminado, o reducido en relación con una referencia, o si se determina que el nivel de miR-21 o miR-335 está por encima de un umbral predeterminado, o aumentado en relación con una referencia.

60 En algunas realizaciones, la TBI es leve (mTBI) y al menos un miARN comprende let-7i-5p. También puede seleccionarse del grupo que consiste en let-7c-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miRmmiR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-424-5p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, y miR-652-3p, o una combinación de los mismos. El sujeto puede ser diagnosticado con una mTBI si hay un cambio en número de veces de al menos 0,5, al menos 1,0, al menos 1,5, al menos 2,0, al menos 2,5, al menos 3,0, al menos 3,5 o al menos 4,0 en el nivel del microARN en comparación con una referencia. En algunas realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene mTBI si el nivel o niveles del microARN están aumentados en comparación con una referencia.

En algunas realizaciones, la TBI es mTBI o conmoción cerebral, y al menos un miARN comprende let-7i-5p. También se puede seleccionar del grupo que consiste en miR-27b-3p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p, o cualquier combinación de los mismos. En las realizaciones un nivel regulado al alza de al menos un miARN, un aumento por encima de un umbral predeterminado o un aumento en relación con un control es indicativo de mTBI o conmoción cerebral.

5

Las secuencias y los números de acceso para los miARN descritos en la presente se proporcionan en la Tabla 1:

Tabla 1

miARN	secuencia	Núm. de acceso miRBase
hsa-miR-21	uagcuuauacagacugauguuga (SEQ ID No. 1)	MIMAT0000076
hsa-miR-425-5p	aaugacacgaucacucccgguuga (SEQ ID No. 2)	MIMAT0003393
hsa-miR-502-5p (también conocido como hsa-miR-502)	auccuugcuauucugggugcua (SEQ ID No. 3)	MIMAT0002873
hsa-miR-335-5p (también conocido como hsa-miR-335)	ucaagagcaauaacgaaaaaugu (SEQ ID No. 4)	MIMAT0000765
hsa-miR-301b-3p (también conocido como hsa-miR-301b)	cagugcaaugauuugucuaagc (SEQ ID No. 5)	MIMAT0004958
hsa-miR-184	uggacggagaacugauaaggu (SEQ ID No. 6)	MIMAT0000454
hsa-miR-505-3p (también conocido como hsa-miR-505)	cguaacacuugcugguuuccu (SEQ ID No. 7)	MIMAT0002876
hsa-miR-203a-3p (también conocido como hsa-miR-203a, hsa-miR-203)	gugaaauguuaggaccacuag (SEQ ID No. 8)	MIMAT0000264
hsa-miR-654-3p	uaugucugcugaccauccuu (SEQ ID No. 9)	MIMAT0004814
hsa-miR-655-3p (también conocido como hsa-miR-655)	auauauacauuguaaccuuccu (SEQ ID No. 10)	MIMAT0003331
hsa-miR-331-3p (también conocido como hsa-miR-331)	gccccugggcccuauccuagaa (SEQ ID No. 11)	MIMAT0000760
hsa-miR-223-5p (también conocido como hsa-miR-223*)	cguguauuugacaagcugaguu (SEQ ID No. 12)	MIMAT0004570
hsa-miR-let-7g	ugagguaguaguuuuguacagu (SEQ ID No. 13)	MIMAT0000414
hsa-miR-126* (también conocido como hsa-miR-126-5p)	cauuauuacuuuugguacg (SEQ ID No. 14)	MIMAT0000444
hsa-miR-193a-5p	ugggucuuugcggcgagauga (SEQ ID No. 15)	MIMAT0004614
hsa-miR-144* (también conocido como hsa-miR-144-5p)	ggauaucaucauauacuguaag (SEQ ID No. 16)	MIMAT0004600
hsa-miR-190 (también conocido como hsa-miR-190a o hsa-miR-190a-3p)	cuauauaucaaacauauuccu (SEQ ID No. 17)	MIMAT0026482
hsa-miR-194 (también conocido como hsa-miR-194-5p)	uguaacagcaacuccaugugga (SEQ ID No. 18)	MIMAT0000460
hsa-miR-365 (también conocido como hsa-miR-365a-3p)	uaaugccccuaaaaauccuuau (SEQ ID No. 19)	MIMAT0000710
hsa-miR-590-3p (también conocido como hsa-miR-590)	uaauuuuauaguauaagcuagu (SEQ ID No. 20)	MIMAT0004801
hsa-miR-624	uaguaccaguaccuuguguuca (SEQ ID No. 21)	MIMAT0003638
hsa-miR-625* (también conocido como hsa-miR-625-3p)	gacuauagaacuucccccuca (SEQ ID No. 22)	MIMAT0004808
hsa-miR-671-3p	uccgguucucagggcuccacc (SEQ ID No. 23)	MIMAT0004819
hsa-let-7c-5p	ugagguaguagguuagguu (SEQ ID No. 24)	MIMAT0000064
hsa-let-7i-5p (también conocido como hsa-let-7i)	ugagguaguaguuuugucuguu (SEQ ID No. 25)	MIMAT0000415

miARN	secuencia	Núm. de acceso miRBase
hsa-miR-142-3p	uguaguguuuuccuacuuuauugga (SEQ ID No.26)	MIMAT0000434
hsa-miR-148a-3p (también conocido como hsa-miR-148a)	ucagugcacuacagaacuuugu (SEQ ID No. 27)	MIMAT0000243
hsa-miR-15b-5p (también conocido como hsa-miR-15b)	uagcagcacaucagguuuaca (SEQ ID No. 28)	MIMAT0000417
hsa-miR-16-5p (también conocido como hsa-miR-16)	uagcagcacguaaauauuggcg (SEQ ID No. 29)	MIMAT0000069
hsa-miR-181a-5p (también conocido como hsa-miR-181a)	aacauucaacgcugucggugagu (SEQ ID No.30)	MIMAT0000256
hsa-miR-20a-5p (también conocido como hsa-miR-20;hsa-miR-20a)	uaaagugcuuauagugcagguag (SEQ ID No.31)	MIMAT0000075
hsa-miR-20b-5p (también conocido como hsa-miR-20b)	caaagugcucauagugcagguag (SEQ ID No.32)	MIMAT0001413
hsa-miR-221-3p (también conocido como hsa-miR-221)	agcuacauugucugcuggguuuc (SEQ ID No.33)	MIMAT0000278
hsa-miR-24-3p (también conocido como hsa-miR-24)	uggcucaguucagcaggaacag (SEQ ID No.34)	MIMAT0000080
hsa-miR-27b-3p (también conocido como hsa-miR-27b)	uucacaguggcuaaguucugc (SEQ ID No.35)	MIMAT0000419
hsa-miR-29a-3p (también conocido como hsa-miR-29a)	uagcaccaucugaaaucgguua (SEQ ID No.36)	MIMAT0000086
hsa-miR-29c-3p (también conocido como hsa-miR-29c)	uagcaccauuugaaaucgguua (SEQ ID No.37)	MIMAT0000681
hsa-miR-30a-5p (también conocido como hsa-miR-30a)	uguaaaacauccugcagcaggaag (SEQ ID No.38)	MIMAT0000087
hsa-miR-107 (también conocido como hsa-miR-107-10)	agcagcauuguacagggcuauc (SEQ ID No.39)	MI0000114
hsa-miR-135b-5p (también conocido como hsa-miR-135b)	uauggcuuuuauuccuauuguga (SEQ ID No.40)	MIMAT0000758
hsa-miR-199b-5p (también conocido como hsa-miR-199b)	cccaguguuuagacuaucuguuc (SEQ ID No.41)	MIMAT0000263
hsa-miR-324-5p	cgcaucccuagggcuauggugu (SEQ ID No.42)	MIMAT0000761
hsa-miR-652-3p (también conocido como hsa-miR-652)	aauggcgccacuaggguugug (SEQ ID No.43)	MIMAT0003322
hsa-miR-424-5p (también conocido como hsa-miR-424)	cagcagcaauucauguuuugaa (SEQ ID No.44)	MIMAT0001341
hsa-miR-10a (también conocido como hsa-miR-10-5p)	uaccugugaauccgaauuugug (SEQ ID No.45)	MIMAT0000253
hsa-miR-132 (también conocido como hsa-miR-132-3p)	uaacagucuacagccauggucg (SEQ ID No.46)	MIMAT0000426
hsa-miR-223 (también conocido como hsa-miR-223-3p)	ugucaguuuugcaauacccca (SEQ ID No.47)	<u>MIMAT0000280</u>
hsa-miR-143 (también conocido como hsa-miR-143-3p)	ugagaugaagcacuguagcuc (SEQ ID No.48)	MIMAT0000435
hsa-miR-148b (también conocido como hsa-miR-148b-3p)	ucagugcaucacagaacuuugu (SEQ ID No.49)	MIMAT0000759
hsa-miR-18a (también conocido como hsa-miR-18;hsa-miR-18a-5p)	uaaggugcaucagugcagauag (SEQ ID No.50)	MIMAT0000072

miARN	secuencia	Núm. de acceso miRBase
hsa-miR-192 (también conocido como hsa-miR-192-5p)	cugaccuaugaaugacagcc (SEQ ID No.51)	MIMAT0000222
hsa-miR-429	uaauacugucugguaaaaccgu (SEQ ID No.52)	MIMAT0001536
hsa-miR-618	aaacucuaucuguccuucugagu (SEQ ID No.53)	MIMAT0003287
hsa-miR-95 (también conocido como hsa-miR-95-5p)	ucaauaaaugucuguugaauu (SEQ ID No.54)	MIMAT0026473
hsa-miR-130a (también conocido como hsa-miR-130a-3p)	cagugcaauguuaaaagggcau (SEQ ID No.55)	MIMAT0000425
hsa-miR-152 (también conocido como hsa-miR-152-5p)	agguucugugauacacuccgacu (SEQ ID No.56)	MIMAT0026479
hsa-miR-27b (también conocido como hsa-miR-27b-3p)	uucacaguggcuaaguucugc (SEQ ID No.57)	MIMAT0000419
hsa-miR-301 (también conocido como hsa-miR-301a-3p o hsa-miR-301a)	cagugcaauaguauugucuaagc (SEQ ID No.58)	MIMAT0000688
hsa-miR-326	ccucuggggccuuccuccag (SEQ ID No.59)	MIMAT0000756
hsa-miR-345 (también conocido como hsa-miR-345-5p)	gcugacuccuaguccagggcuc (SEQ ID No.60)	MIMAT0000772
hsa-miR-361 (también conocido como hsa-miR-361-5p)	uuaucagaauccaggguac (SEQ ID No.61)	MIMAT0000703
hsa-miR-422a	acuggacuuaggguccagaaggc (SEQ ID No.62)	MIMAT0001339
hsa-miR-579 (también conocido como hsa-miR-579-3p)	uucuuuugguauaaaccgcgauu (SEQ ID No.63)	MIMAT0003244
hsa-miR-642 (también conocido como hsa-miR-642a-5p; hsa-miR-642)	guccucuccaaaugugucuug (SEQ ID No.64)	MIMAT0003312
hsa-miR-99a (también conocido como hsa-miR-99a-5p)	aaccguagaucgacuugug (SEQ ID No.65)	MIMAT0000097
hsa-miR-520D-3p (también conocido como hsa-miR-520D)	aaagugcuucuuugggggu (SEQ ID No.66)	MIMAT0002856
hsa-miR-629 (también conocido como hsa-miR-629-5p)	uggguuacguugggagaacu (SEQ ID No.67)	MIMAT0004810
hsa-miR-23a-3p (también conocido como hsa-miR-23a)	aucacauugccagggaauucc (SEQ ID No.68)	MIMAT0000078
hsa-miR-148b-3p (también conocido como hsa-miR-148b)	ucagugcaucacagaacuuugu (SEQ ID No.69)	MIMAT0000759

- Convenientemente, la muestra puede ser cualquier muestra adecuada de fluido o tejido obtenida del sujeto. Por ejemplo, la muestra biológica puede comprender al menos uno del grupo que consiste en: orina, saliva, sangre entera, plasma, suero, esputo, semen, heces, un hisopo nasal, lágrimas, un hisopo vaginal, un hisopo rectal, un frotis cervical, una biopsia de tejido y un hisopo uretral. La muestra puede ser una muestra de un fluido. Adecuadamente, la muestra puede ser una que se puede obtener fácilmente del individuo, tal como orina, saliva, sangre y esputo. En la presente invención, la muestra comprende saliva. Se divulga, pero no es parte de la invención, sangre de los dedos de los pies, plasma o suero. Se entenderá que en algunas realizaciones el proceso de obtención de la muestra no forma parte de la invención descrita en la presente.
- La muestra puede comprender o estar constituida por suero. El suero no sólo tiene ventajas prácticas, sino que también está libre de anticoagulantes, tal como la heparina, un posible inhibidor de las reacciones de PCR. El suero también puede verse menos afectado por la hemólisis, en comparación con el plasma.
- La saliva puede obtenerse fácilmente del paciente (por ejemplo, a pie de campo o en el campo), sin necesidad de formación especializada ni equipos médicos. Los miARN que se han encontrado como indicativos de mTBI en la saliva incluyen: hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-1421-3p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-

miR-29c-3p, hsa-miR-340-5p, hsa-miR-424-5p; miR-30a-5p; miR-107; miR-135b-5p; miR-199b se selecciona del grupo que consiste en -5p; miR-324-5p; y miR-652-3p. Los miARN que se han encontrado como indicativos de mTBI en la saliva incluyen: miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p.

La presente invención proporciona un método de diagnóstico y/o monitoreo de lesión cerebral traumática leve (mTBI) en un sujeto, en donde el método comprende la determinación de un nivel de al menos un miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto, en donde al menos un miARN comprende let-7i-5p. El método puede comprender la determinación de un nivel de al menos dos miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto, en donde al menos dos miARN se seleccionan de let-7i-5p y miR-27b-3p, let-7i-5p y miR-142-3p, let-7i-5p y miR-107, o let-7i-5p y miR-135b-5p.

Se divulga, pero no es parte de la invención, que al menos un miARN también puede ser miR-27b-3p.

Convenientemente, al menos un miARN también puede ser miR-142-3p. Al menos un miARN también puede ser miR-107. Al menos un miARN también puede ser miR-135b-5p.

En las realizaciones, un nivel regulado al alza en saliva de al menos un miARN que comprende let-7i-5p es indicativo de mTBI o conmoción cerebral. Se divulga, pero no es parte de la invención, que al menos un miARN también se puede seleccionar de miR-27b-3p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p. En las realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene mTBI si el nivel de al menos un miARN está por encima de un umbral predeterminado o aumentado en relación con un control.

Un nivel regulado al alza indicativo de mTBI puede ser equivalente a un cambio en número de veces de 2,0 o más obtenido mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. En las realizaciones, un nivel regulado al alza indicativo de mTBI puede ser equivalente a un cambio en número de veces de 2,0 o más obtenido mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para al menos un miARN, let-7i-5p.

El método de diagnóstico y/o monitoreo de la mTBI en un sujeto puede consistir en poner en contacto una muestra de saliva obtenida del sujeto con al menos una sonda de oligonucleótido específica de miARN que tenga al menos un 70 % de identidad con el complemento de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 25.

El método puede comprender además la cuantificación de al menos una sonda de oligonucleótido específica de miARN y la comparación de dicho nivel de expresión con un miARN de referencia o un nivel de expresión de control obtenido o derivado de un sujeto sano. Una diferencia de 1,5 veces o más, tal como una diferencia de 2-0 veces o más, entre el sujeto y el control es indicativa de una mTBI.

Los métodos de la presente invención pueden consistir en determinar un nivel de al menos un segundo miARN en la muestra de saliva obtenida del sujeto.

Los métodos de la presente invención pueden consistir en determinar un nivel de al menos dos miARN en la muestra de saliva obtenida del sujeto. En las realizaciones, el primero de al menos dos miARN es let-7i-5p. En las realizaciones, se seleccionan al menos dos miARN de let-7i-5p y miR-27b-3p, let-7i-5p y miR-142-3p, let-7i-5p y miR-107, y let-7i-5p y miR-135b-5p.

Opcionalmente, al menos dos miARN son let-7i-5p y miR-142-3p.

Alternativamente, al menos dos miARN son let-7i-5p y miR-27b-3p.

Convenientemente al menos dos miRNAs son let-7i-5p y miR-107.

En las realizaciones, al menos dos miARN son let-7i-5p y miR-135b-5p.

Se divulga, pero no es parte de la invención, que al menos dos miARN pueden ser miR-142-3p y miR-27b-3p.

Opcionalmente, al menos dos miARN pueden ser miR-142-3p y miR-107.

Alternativamente, al menos dos miARN pueden ser miR-142-3p y miR-135b-5p. Convenientemente, al menos dos miARN pueden ser miR-27b-3p y miR-107.

Al menos dos miARN pueden ser miR-27b-3p y miR-135b-5p.

Al menos dos miARN pueden ser miR-107 y miR-135b-5p.

En las realizaciones, el método incluye determinar un nivel de los miARN miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p.

En las realizaciones, el método además comprende determinar un nivel de uno o más miARN adicionales seleccionados del grupo que consiste en let-7c-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-

20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, y miR-424-5p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p y miR-652-3p.

5 Un nivel regulado al alza de dos o más miARN indicativos de mTBI puede ser equivalente a un cambio en número de veces de 1,5 o más, o 2,0 o más obtenido mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

10 En las realizaciones, el nivel de miARN se determina en una muestra de saliva obtenida del sujeto al menos 24 horas después de la lesión. En algunas realizaciones, el nivel de miARN se determina en una muestra de saliva obtenida del sujeto 15 días o menos después de la lesión. En algunas realizaciones, el nivel de miARN se determina en una muestra de saliva obtenida del sujeto entre 24 horas y 15 días después de la lesión, o entre 24 horas y 10 días después de la lesión, o entre 24 horas y 7 días después de la lesión, o entre 48 horas y 5 días después de la lesión.

15 Los niveles de miARN se pueden utilizar para rastrear la recuperación de un sujeto de una lesión. Así, la presente invención abarca el monitoreo de la recuperación de un sujeto de TBI, como alternativa o además del diagnóstico inicial.

20 En algunas realizaciones, el método comprende el monitoreo de la mTBI y el nivel de al menos un miARN se determina en una muestra obtenida del sujeto al menos 2, al menos 3, al menos 5, al menos 7, al menos 10 o al menos 14 días después de la lesión. En algunas realizaciones, el nivel de al menos un miARN se determina en una muestra obtenida del sujeto 15 días después de la lesión. En algunas realizaciones, el nivel de al menos un miARN se determina en al menos dos muestras obtenidas en diferentes intervalos de tiempo después de la lesión, lo que permite monitorear la recuperación. Por ejemplo, los niveles de miARN podrían determinarse a los 7 y 14 días después de la lesión, o a los 5, 10 y 15 días después de la lesión. Un retorno de los niveles de miARN a la normalidad puede ser indicativo de la recuperación del sujeto de la mTBI.

25 Se puede determinar que un sujeto se ha recuperado de la mTBI si el nivel de miR-425-5p y/o miR-502 ya no está por debajo de un umbral predeterminado o ya no ha disminuido en relación con una referencia.

30 Se puede determinar que un sujeto se ha recuperado de una TBI de moderada a grave si el nivel de miR-21 y/o miR-335 ya no está por encima de un umbral predeterminado o ya no ha aumentado en relación con una referencia.

35 El diagnóstico de un sujeto que sufre de una TBI, y en particular el diagnóstico de TBI leve o TBI moderada a grave, puede facilitar la determinación de un tratamiento adecuado. Por lo tanto, la presente invención proporciona una prueba que permite a los trabajadores de la salud, tales como médicos, clínicos, paramédicos e incluso personal no médico (por ejemplo, profesores, entrenadores deportivos, personal militar) decidir sobre la acción adecuada para un sujeto con sospechas de tener una TBI. Por lo tanto, un sujeto que se determine que tiene una TBI puede recibir el tratamiento más adecuado como resultado de un diagnóstico. Por lo tanto, el método puede comprender la dirección de la terapia adecuada a un sujeto diagnosticado con una TBI.

40 Un sujeto diagnosticado con TBI puede ser evaluado más a fondo, por ejemplo, mediante exploración por CT. El sujeto puede ser admitido en el hospital. Si se puede descartar una TBI de moderada a grave, es posible que no sea necesario que el sujeto sea admitido en el hospital para su evaluación. Un sujeto diagnosticado con TBI de moderada a grave puede ser ingresado en el hospital o en un centro especializado en neurotraumatismos.

45 Un sujeto diagnosticado con una TBI (particularmente mTBI) fuera de un entorno hospitalario, por ejemplo, en un evento deportivo, durante un combate o durante un juego, puede ser retirado del juego o combate inmediatamente. Posteriormente, el sujeto puede iniciar un regreso gradual al juego o combate.

50 Se divulga, pero no es parte de la invención, un método para determinar si es apropiado administrar a un sujeto una terapia para aliviar la TBI, en donde el método comprende:

50 Determinar un nivel de al menos un miARN en una muestra del sujeto; y
determinar si es apropiado o no administrar una terapia para aliviar la TBI, en función del nivel de al menos un miARN.

55 Se entenderá que el paso de administrar la terapia al sujeto no forma parte del método reivindicado, a menos que se indique específicamente.

60 El método puede comprender además la administración al sujeto de un tratamiento adecuado. El tratamiento puede comprender una terapia para aliviar la TBI. En consecuencia, existen métodos descritos para diagnosticar y tratar la TBI en un sujeto, en donde el método comprende los pasos de (a) obtener una muestra (por ejemplo, una muestra de sangre, plasma, orina o saliva) del sujeto; (b) detectar uno o más miARN (seleccionados de los descritos en la presente); diagnosticar que el paciente tiene una TBI cuando los niveles de miARN difieren de un estándar de referencia (como se describe en la presente); y administrar un tratamiento para la TBI.

65 Se divulga, pero no es parte de la invención, un método para determinar un tratamiento apropiado a un sujeto sospechoso de sufrir una TBI, en donde el método que comprende identificar si el sujeto tiene o no una TBI mediante la determinación de un nivel de al menos un miARN en una muestra del sujeto.

- Si se identifica que un sujeto tiene una TBI, un tratamiento apropiado puede incluir uno o más de los siguientes: evaluación adicional del sujeto, por ejemplo, mediante pruebas adicionales (por ejemplo, pruebas verbales, cognitivas, motoras y/u ópticas), tomografía computarizada y/o resonancia magnética; retirar al sujeto de la actividad (por ejemplo, la actividad durante la cual se incurrió la TBI); admitir al sujeto en el hospital o en una clínica especializada; cirugía; y administrar una terapia para aliviar la TBI al sujeto.
- La terapia para aliviar la TBI puede incluir fármacos neuroprotectores, por ejemplo, fármacos para tratar la hinchazón cerebral, tal como el manitol y la disolución salina hipertónica, y/u otras medidas neuroprotectoras, tal como evitar la reanimación hipertensiva y el uso de sedación.
- El sujeto puede ser monitoreado posteriormente para realizar un seguimiento de su recuperación, por ejemplo, en un hospital o clínica.
- Se divulga, pero no es parte de la invención, un método para detectar y/o determinar un nivel de un miARN objetivo
- En un sujeto, el método que comprende los pasos de (a) obtener una muestra del sujeto; y (b) detectar y/o determinar el nivel del miARN objetivo en la muestra poniendo en contacto la muestra con una sonda que es específica para el miARN objetivo.
- La muestra puede ser cualquier muestra adecuada de fluido o tejido obtenida del sujeto, como se ha definido anteriormente. La muestra puede ser sangre, suero, plasma, orina o saliva.
- El método puede comprender la determinación del nivel de dos o más miARN objetivo en la muestra.
- Se divulga, pero no es parte de la invención, una terapia para aliviar la TBI para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que lo necesita, en donde se identifica que dicho sujeto tiene una TBI mediante la determinación de un nivel de al menos un miARN en una muestra del sujeto.
- El paso para determinar el nivel del miARN objetivo puede consistir en poner en contacto la muestra con un sustrato funcionalizado con la sonda, por ejemplo, un chip que comprende la sonda. El sustrato o chip puede incluir cómodamente varias sondas, cada una específica para un miARN objetivo diferente.
- El sujeto puede haber sufrido una lesión, en particular una lesión en la cabeza. Se puede sospechar que el sujeto tiene una TBI. Se puede sospechar que el sujeto tiene mTBI o conmoción cerebral. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene no más de 72 horas, no más de 48 horas, no más de 36 horas, no más de 24 horas, no más de 12 horas, no más de 6 horas, no más de 4 horas, no más de 2 horas o no más de 1 hora después de la lesión. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene 24 horas o más después de la lesión. En realizaciones adicionales, la muestra se obtiene del sujeto 15 días o menos después de la lesión. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene del sujeto entre 24 horas y 15 días después de la lesión, o entre 24 horas y 10 días después de la lesión, o entre 24 horas y 7 días después de la lesión, o entre 48 horas y 5 días después de la lesión.
- El método comprende además el tratamiento del sujeto. El tratamiento puede incluir uno o más de los siguientes: evaluación adicional del sujeto, por ejemplo, mediante pruebas adicionales (por ejemplo, pruebas verbales, cognitivas, motoras y/u ópticas), tomografía computarizada y/o resonancia magnética; retirar al sujeto de la actividad (por ejemplo, la actividad durante la cual se incurrió la TBI); admitir al sujeto en el hospital o en una clínica especializada; y administrar una terapia para aliviar la TBI al sujeto. El tratamiento comprende la administración de un cantidad eficaz de un fármaco neuroprotector.
- Se divulga, pero no es parte de la invención, un método de tratamiento de la TBI, en donde el método que comprende:
Determinar un nivel de al menos un miARN en una muestra del sujeto; y
Si el nivel de al menos un miARN es indicativo de mTBI, administrar un tratamiento apropiado para mTBI; o
Si el nivel de al menos un miARN es indicativo de m-sTBI, administrar un tratamiento apropiado para m-sTBI.
- Los expertos en la técnica entenderán que diferentes vías de tratamiento pueden ser utilizados para mTBI y m-sTBI.
- Se divulga, pero no es parte de la invención, un método para tratar a un sujeto con sospecha de mTBI, en donde el método comprende:
i) determinar si un nivel regulado al alza de al menos un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p es detectable en una muestra de saliva obtenida del sujeto, y
ii) si se detecta un nivel regulado al alza de al menos un miARN que proporciona un tratamiento para mTBI al sujeto.
- Un aspecto de la invención proporciona un fármaco neuroprotector o un sedante para su uso en un método de tratamiento de mTBI en un sujeto, en donde se ha identificado que dicho sujeto tiene una mTBI mediante la determinación del nivel de let-7i-5p en una muestra de saliva del sujeto.

Un sujeto con mTBI puede ser tratado de la siguiente manera:

- Un atleta diagnosticado con mTBI normalmente se iniciaría con un protocolo de regreso al juego graduado (según lo definido por la Conferencia de Consenso de Berlín sobre Conmoción Cerebral y las autoridades deportivas individuales, por ejemplo, RFU). Esto implicaría un período de descanso seguido de un aumento gradual en el nivel de esfuerzo y exposición al contacto. Por lo general, un atleta con mTBI no podría jugar durante un período que varía entre 6 y 23 días, dependiendo del nivel de supervisión médica y la edad. Por el contrario, si se excluyera el mTBI, el atleta no tendría ninguna restricción y podría entrenar de forma normal al día siguiente.
- Si se diagnostica en un entorno prehospitario, la mTBI sería una indicación para que un paciente busque atención médica (por ejemplo, en el hospital o en atención primaria), mientras que si se excluyera la mTBI no se indicaría ninguna revisión médica.
- Una persona con mTBI no debe permanecer sin supervisión durante 24-48 horas y no debe conducir ni operar un montacargas o maquinaria abierta hasta que se recupere.
- El personal militar diagnosticado con mTBI sería retirado del teatro de operaciones y descansaría, mientras que, si se pudiera excluir la mTBI, esa persona continuaría en funciones activas.
- En el NHS, una persona con mTBI puede permanecer en el hospital para observación o puede tener una tomografía computarizada de acuerdo con las directrices emitidas por NICE, mientras que si se pudiera excluir la mTBI, ese paciente podría ser dado de alta inmediatamente.
- A una persona a la que se le diagnosticó una mTBI típicamente se le pediría que no regresara al trabajo o al estudio por un cierto período de tiempo.
- Una persona diagnosticada con mTBI puede ser referida a una clínica de TBI leve o a una clínica de neurología o a una clínica de neurocirugía. Las intervenciones típicas para la mTBI consisten en educación, asesoramiento en relación con el trabajo, estudio y conducción, manejo médico de secuelas típicas, tales como cefalea o ansiedad, o trastorno del ánimo o trastorno de estrés postraumático con medicamento y/o intervención psicológica si es necesario, y derivación a otros servicios como se indica, por ejemplo, neuropsicología, neurovestibular u oftalmología.
- Un paciente con mTBI necesitaría ser monitoreado para la disfunción pituitaria postraumática retardada de acuerdo con la guía emitida por la Sociedad de Cirujanos Neurológicos Británicos.

En el contexto médico-legal, el diagnóstico de la mTBI es a menudo poco claro y especulativo, ya que las investigaciones radiológicas suelen ser normales y los síntomas no son específicos. La confirmación objetiva del mTBI puede conducir a una adjudicación por daños y necesidades de atención. Un tratamiento apropiado para mTBI puede incluir: retirar al sujeto de la actividad; tratamiento *in situ* o en la comunidad; evaluación adicional del sujeto en el hospital sin ingreso durante la noche (por lo general, los pacientes con mTBI se dan de alta de inmediato con asesoramiento sobre lesiones en la cabeza); o ingreso al hospital durante un período de observación (por lo general, 1-2 días). El sujeto puede ser evaluado más a fondo mediante pruebas (por ejemplo, pruebas verbales, cognitivas, motoras y/o ópticas). Por lo general, la tomografía computarizada sólo es necesaria si existen ciertas indicaciones, incluyendo sospecha de fractura de cráneo, convulsión postraumática, déficit neurológico focal, vómitos repetidos, puntaje de la escala de Glasgow inferior a 13 en la evaluación inicial (menos de 14 para niños, o menos de 15 para bebés menores de 1 año), de acuerdo con los lineamientos NICE.

Un tratamiento apropiado para m-STBI puede incluir: Resonancia magnética o tomografía computarizada (particularmente dentro de 1 hora de la lesión); ingreso al hospital (que puede incluir ingreso a cuidados intensivos y/o traslado a una clínica especializada o centro de trauma mayor con instalaciones neuroquirúrgicas); neuromonitoreo; cirugía; administrar una terapia para aliviar la TBI, tal como administrar fármacos neuroprotectores, por ejemplo, fármacos para tratar la hinchazón cerebral, tal como manitol y solución salina hipertónica, y/u otras medidas neuroprotectoras, tal como evitar la reanimación hipertensiva y el uso de sedación.

Por lo tanto, los sujetos con una TBI pueden estratificarse rápidamente en mTBI o m-STBI, para que puedan recibir el tratamiento más adecuado.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un sistema de detección para el diagnóstico y/o monitoreo de mTBI, en donde el sistema de detección comprende un elemento sensor que comprende un sustrato funcionalizado con una sonda específica para un miARN objetivo. El sistema de detección puede comprender además un dispositivo de detección que es capaz de detectar la unión de un miARN objetivo a la sonda.

Se divulga, pero no es parte de la invención, un elemento sensor para su uso en un sistema de detección para el diagnóstico y/o monitoreo de TBI, en donde el elemento sensor que comprende un sustrato funcionalizado con una sonda específica para un miARN objetivo.

El elemento sensor puede comprender además una zona de adición de muestras para recibir una muestra (por ejemplo, una muestra de fluido).

La sonda es capaz de unirse selectivamente al miARN de interés. El sustrato puede ser funcionalizado con una pluralidad de sondas. Las sondas pueden ser todas iguales, o se pueden proporcionar dos o más sondas diferentes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sustrato puede ser funcionalizado con una primera sonda específica para un primer miARN, y una segunda sonda específica para un segundo miARN. La primera y la segunda sonda pueden agruparse, por ejemplo,

en diferentes porciones del elemento sensor.

Se divulga, pero no es parte de la invención, una composición para su uso en un método de diagnóstico y/o monitoreo de lesiones cerebrales traumáticas (TBI) en un sujeto, en donde la composición comprende una sonda específica para un miARN objetivo. La composición puede comprender cualquiera de los miARN enumerados o con cualquier pluralidad de los miARN enumerados (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más de los miARN enumerados).

El miARN objetivo puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g, miR-335, miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, miR-671-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-30a-5p; miR-107; miR-135b-5p; miR-199b-5p; miR-324-5p; miR-652-3p, miR-424-5p, miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p y miR-629.

El miARN objetivo puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g, miR-335, hsa-miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, y miR-671-3p. Se ha encontrado que estos microARN son biomarcadores expresados en todos los pacientes con TBI (leve o grave).

El miARN objetivo puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g y miR-335.

El miARN objetivo puede seleccionarse del grupo que consiste en let-7c-5p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, y miR-424-5p; miR-30a-5p; miR-107; miR-135b-5p; miR-199b-5p; miR-324-5p; miR-652-3p.

El miARN objetivo puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p. Dos miARN objetivo pueden seleccionarse del grupo que consiste en miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p.

El miARN objetivo puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-194, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p y miR-629.

El miARN objetivo puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-425-5p, miR-502, miR-21 y miR-335.

La sonda puede comprender una molécula biológica, tal como una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) o un ácido nucleico. La sonda puede comprender un ácido nucleico. El ácido nucleico puede comprender una secuencia que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a una secuencia que es el complemento de la secuencia de longitud completa del miARN objetivo. El ácido nucleico puede comprender una secuencia que es 100 % idéntica a una secuencia que es el complemento de la secuencia del miARN objetivo (es decir, el receptor comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento exacto de la secuencia del miARN objetivo).

Las sondas se pueden unir a una superficie del sustrato por cualquier medio adecuado, tal como, por ejemplo, mediante el acoplamiento de la química conocida por los expertos en la técnica. Cada sonda se puede conectar a una superficie del sustrato mediante un enlazador. La sonda puede comprender una fracción para inmovilizar la sonda en el sustrato o para conectar la sonda a un enlazador inmovilizado en el sustrato.

Alternativa o adicionalmente, la sonda puede comprender una etiqueta detectable. La etiqueta detectable puede ser, por ejemplo, radioactiva, fluorescente, luminiscente, o a base de anticuerpos (por ejemplo, puede constituir un anticuerpo tetramérico convencional o un fragmento detectable del mismo).

El sustrato del elemento sensor puede estar formado por cualquier material adecuado. El sustrato puede comprender o está formado por metal, plástico, vidrio, sílice, silicio, grafito, grafeno, o cualquier combinación de los mismos. El sustrato puede comprender varias capas. Por ejemplo, un sustrato puede prepararse formando una superficie o capa de grafeno sobre una capa de carburo de silicio o sílice. La superficie del grafeno puede modificarse químicamente, por ejemplo, a óxido de grafeno (GO) o a grafeno-amina (GA). Los métodos para formar capas de grafeno, tal como el crecimiento epitaxial y el crecimiento de sublimación, serán conocidos por los expertos en la técnica.

Convenientemente, las sondas compuestas o constituidas por un ácido nucleico se pueden unir a una superficie GO mediante un enlazador, utilizando un reactivo de acoplamiento de amida (por ejemplo, (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU)). Un elemento sensor que comprende una superficie funcionalizada con una sonda de ácido nucleico puede utilizarse para detectar selectivamente su miARN complementario.

- Los enlazadores adecuados pueden comprender una fracción de anilina (o un derivado de la misma), una resto de ácido benzoico (o un derivado del mismo) o una fracción de etandiamina (o un derivado de la misma). Un enlazador de anilina se puede formar mediante la unión de una molécula de nitrobenzono (o derivado) a una superficie de grafeno (por ejemplo, utilizando una sal de diazonio), y la reducción del nitrobenzono a anilina. El grupo de aminas de la anilina puede utilizarse para fijarse a la sonda. Del mismo modo, se puede utilizar una sal de diazonio (por ejemplo, tetrafluoroborato de diazonio de ácido 4-benzoico) para unir un ácido benzoico o derivado de ácido benzoico a una superficie de grafeno. Un resto de etandiamina se puede unir al grafeno carboxilado o al óxido de grafeno.
- El elemento sensor puede estar compuesto por una tira de prueba. La tira de prueba puede ser desechable.
- El dispositivo de detección puede configurarse para detectar la unión de un miARN objetivo al receptor por cualquier medio adecuado conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante la detección de cambios en la impedancia eléctrica, la concentración de iones de hidrógeno, o los cambios conformacionales resultantes de la hibridación.
- El dispositivo de detección puede incluir además una interfaz de usuario para enviar datos a un usuario.
- El dispositivo de detección puede incluir una base de datos de información del tratamiento. El dispositivo puede ser capaz de identificar las opciones de tratamiento adecuadas de la base de datos en función de los niveles de miARN de interés. La información del tratamiento puede ser proporcionada al usuario a través de la interfaz de usuario.
- Convenientemente, el dispositivo de detección puede ser portátil, por ejemplo, de mano. El dispositivo de detección puede comprender una unidad de almacenamiento de datos para almacenar los niveles de miARN y otra información relacionada con el sujeto. El dispositivo puede comprender un medio de comunicación de datos para comunicar datos a otros dispositivos. Por ejemplo, el dispositivo puede comunicar datos de forma inalámbrica a través de WiFi, 3G, 4G, Bluetooth, o a través de una aplicación móvil. Esto puede permitir convenientemente que los profesionales médicos puedan acceder fácilmente a los datos si es necesario.
- Por lo tanto, se prevé que el dispositivo de detección de la invención proporcione un medio asequible y portátil para el diagnóstico y el monitoreo de la TBI de forma no invasiva. El dispositivo puede ser utilizado por equipos de ambulancias, militares, escuelas, clubes deportivos y profesionales de la salud, lo que permite la valoración correcta y el triage de pacientes con sospechas de tener una TBI.
- Otro aspecto de la presente invención es el uso de un sistema para detectar y/o monitorear la mTBI en un sujeto.
- Un tipo de sistema de detección se basa en la complementariedad entre un miARN objetivo y una sonda de ácido nucleico, generalmente una sonda de oligonucleótido. Por lo tanto, la presente invención abarca el uso de un sistema de detección para detectar y/o monitorear la mTBI en un sujeto que comprende un sustrato funcionalizado con un oligonucleótido capaz de unirse a let-7i-5p. También puede unirse a al menos un miR-27b-30, miR-142-3p, miR-107 o miR-135b-5p. El oligonucleótido puede tener una secuencia complementaria a por lo menos una porción de let-7i-5p. El oligonucleótido también puede tener una secuencia complementaria a al menos uno de miR-27b-3p, miR-142-3p, miR-107 o miR-135b-5p. El oligonucleótido tiene una secuencia complementaria a al menos una porción de la SEQ ID NO: 25. También puede ser la SEQ ID No: 26, 35, 39 o 40. La región complementaria o de emparejamiento de bases puede tener 7, 8 o más nucleótidos de longitud. En las realizaciones, la región complementaria o de emparejamiento de bases puede ser de 9, 10, 12, 15 o más nucleótidos de longitud, o la región complementaria o de emparejamiento de bases puede ser la longitud completa del miARN. El sustrato funcionalizado con un oligonucleótido puede ser una perla o una nanopartícula. El sistema de detección puede tener otros componentes capaces de convertir la sonda de ácido nucleico-miARN unidos en una señal detectable.
- Otro tipo de sistema de detección se basa en RT-PCT. Por lo tanto, la presente invención abarca el uso de un sistema de detección para detectar y/o monitorear el mTBI en un sujeto que comprende un par de cebadores diseñados para la amplificación de un complemento de ADNc de al menos un miARN que comprende let-7i-5p. Al menos un miARN también puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-27b-3p, miR-142-3p, miR-107 o miR-135b-5p.
- Se divulga, pero no es parte de la invención, un kit para su uso en los presentes métodos. El kit puede incluir al menos una sonda (por ejemplo, una proteína, tal como un anticuerpo o un ácido nucleico) que es capaz de unirse selectivamente al miARN de interés. El kit puede comprender una matriz que comprende una pluralidad de sondas. Al menos una sonda puede ser un cebador para llevar a cabo la PCR. El kit puede incluir además instrucciones de uso, por ejemplo, instrucciones de uso en el diagnóstico y/o monitoreo de la TBI. El kit puede incluir además disoluciones amortiguadoras y reactivos adecuados, tales como cebadores de amplificación y enzimas (por ejemplo, ADN polimerasa, transcriptasa inversa para la conversión de miARN en ADNc).
- Se entenderá que las declaraciones hechas en la presente en relación con cualquier aspecto de la invención pueden aplicarse igualmente a cualquier otro aspecto de la invención, según corresponda.

Ejemplos

Las realizaciones de la invención se describirán a continuación a modo de ejemplo y con referencia a las figuras adjuntas.

A medida que los miARN emergen como biomarcadores prometedores en una variedad de patologías diferentes, los inventores actuales trataron de explorar su papel en la TBI.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Pacientes y recolección de muestras

Los participantes del estudio fueron reclutados del Centro de Investigación de Reconstrucción Quirúrgica y Microbiología (SRMRC), en el Hospital Queen Elizabeth de Birmingham (Reino Unido), como parte del estudio de biomarcadores cerebrales después de un trauma (The Golden Hour Study) (Ethics Ref. 13/WA/0399).

En primer lugar, se realizó la selección de 754 miARN en 5 pacientes con mTBI con lesiones extracraneales (EC), 5 pacientes con lesiones sTBI+EC y voluntarios sanos (HV) a 1 día y 15 días de la lesión con el objetivo de seleccionar biomarcadores candidatos específicos capaces de discriminar la TBI leve de la grave y predecir la recuperación de mTBI después de 15 días. A partir de esta información (Tabla 2), se pudo confirmar los resultados del estudio en una cohorte ampliada de pacientes de 40 individuos agrupados en 4 categorías diferentes: HV (n=10), EC (n=10), mTBI+EC (n=10), sTBI+EC (n=10). Los voluntarios sanos dieron su consentimiento y se inscribieron en el estudio RECOS. Los pacientes con lesiones de EC tenían fracturas confirmadas radiográficamente, sin traumatismo craneal, sin infección, sin antecedentes de trastornos neurológicos o psiquiátricos y sin dependencia al alcohol o fármacos. La TBI leve con EC incluyó a aquellos con traumatismo craneal no penetrante y puntaje de la escala de coma de Glasgow (GCS) >13. La TBI grave con EC incluyó a pacientes con puntaje GCS de 8 o menos. Todos los pacientes tenían sexo y edad emparejados con HV.

Procesamiento de muestras

Se tomaron muestras de sangre periférica a 1 día y 15 días de la lesión en cada paciente. Las muestras de sangre se procesaron para el aislamiento del suero dentro de las 2 h siguientes a la extracción. La sangre entera se dejó reposar durante aproximadamente 30' a temperatura ambiente antes de ser centrifugada a 3000 rpm durante 10' a 4 °C. El suero se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta el análisis.

Aislamiento de ARN, transcripción inversa y perfiles de miARN mediante matriz de baja densidad TaqMan (TLDA)

Se realizó la selección inicial (conjunto de descubrimiento) en 5 pacientes mTBI+EC y 5 pacientes sTBI+EC, que se compararon con los HV en los dos puntos de tiempo diferentes (1 día y 15 días desde la lesión). Se utilizó el suero de estos pacientes para perfilar el transcriptoma de 754 miARN. Las muestras de suero se centrifugaron a 2000 rpm durante 10' para granular y eliminar cualquier célula o residuo circulante. Los miARN se extrajeron de 400 µl de muestras de suero utilizando el mini kit de Qiagen miRNeasy (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania), de acuerdo con el protocolo complementario de Qiagen para la purificación de ARN pequeños de suero y plasma, y finalmente se eluyeron en 30 µl de volumen de agua libre de ARNasa. La concentración y pureza del ARN resultante se determinó con un espectrofotómetro ND-1000 UV-Vis (NanoDrop). 20 ng de ARN sérico se retrotranscribieron y pre-amplificaron, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos preamplificados se cargaron en TLDA, matriz de microARN humano TaqMan v3.0 A y B (Applied Biosystems LifeTechnologies™). Las PCR en TLDA se realizaron en el sistema 7900HT Fast RealTime PCR (Applied Biosystem, LifeTechnologies™).

Análisis de datos

Para obtener un perfil miARN preciso, se utilizó el método de normalización global de mediana. De forma similar al análisis de micromatrices, los valores de Ct de cada muestra se normalizaron con la mediana de Ct de la matriz. Además, calculando la correlación de Pearson entre los medianos de Ct y las medias de cada matriz y Ct de cada miARN, identificamos dos miARN que mostraron un perfil de expresión cercano a la mediana y media de los TLDA, es decir, miR-331 y miR-223*. También se confirmó que estos miARN están entre los más estables en TLDA mediante la aplicación de dos métodos diferentes [software DataAssistv3 (Applied Biosystem Life Technologies™)] y el algoritmo geNorm. En consecuencia, se utilizaron miR-331 y miR-223* como genes de referencia para la validación mediante ensayos TaqMan individuales. Los cambios en número de veces de la expresión se calcularon mediante el método 2-ΔΔCT. Los miARN expresados diferencialmente (DE miARN) fueron identificados mediante análisis de significancia de micromatrices (SAM) computado por el visor Multi Experiment v4.8.1, aplicando un prueba de dos clases no emparejada entre ΔCt y usando un valor p basado en permutaciones 100; motor de imputación: K-vecinos más cercanos (10 vecinos); la tasa de descubrimiento falso <0,15 se utilizó como corrección para comparaciones múltiples. Aceptamos como fiables sólo los miARN DE concordantes mediante el uso de todos los controles endógenos.

Ensayos TaqMan individuales

Se eligieron diez miARN expresados diferencialmente de los arreglos como posibles biomarcadores candidatos con el objetivo de discriminar la TBI leve de la grave y monitorear la recuperación de TBI leve. Estos candidatos se utilizaron para validar los datos en una cohorte ampliada de 30 pacientes (conjunto de validación) agrupados en 3 categorías diferentes (mTBI+EC, sTBI+EC y EC solamente) y 10 controles (HV) en dos puntos de tiempo diferentes (1 y 15 días desde la lesión) mediante ensayos TaqMan individuales (AppliedBiosystems, Life Technologies™). Las muestras se extrajeron y retrotranscribieron como se describió anteriormente y el análisis de RT-qPCR se realizó en el Sistema de Detección de PCR en Tiempo Real Bio-Rad iQ5 (Bio-Rad, CA, EE.UU.). Los cambios en número de veces de la expresión se calcularon mediante el método 2- $\Delta\Delta CT$.

10 *Análisis estadístico*

Los datos se revisaron con respecto a la distribución normal y se transformaron para realizar pruebas paramétricas. Las comparaciones entre grupos en cada momento y dentro de los grupos a lo largo del tiempo se realizaron mediante el análisis de varianza unidireccional y la prueba post-hoc de Tukey sobre los datos transformados. Se utilizó un análisis de características operativas del receptor para calcular la sensibilidad y la especificidad de cada biomarcador en el diagnóstico de mTBI or sTBI que se expresan como área bajo la curva (ABC). Todos los análisis se llevaron a cabo en SPSS v,20 (IBM). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor $p < 0,05$.

20 **RESULTADOS**

Perfiles de expresión mediante matriz de baja densidad TaqMan (TLDA)

A partir de 754 miARN de TLDA, se identificaron diez miARN circulantes a 1 día y 13 a 15 días en mTBI+EC, 19 a 1 día y 22 a 15 días en sTBI+EC expresados diferencialmente (Tabla 2). De esta lista, se excluyeron hsa-miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625* y miR-671-3p para análisis adicionales debido a que se expresaron en la mayoría de los pacientes, por lo que no eran biomarcadores candidatos adecuados sólo para traumatismos leves o graves. Sin embargo, los microARN anteriores pueden identificar la TBI de cualquier gravedad y, por lo tanto, son biomarcadores útiles de TBI. Por otro lado, miR-184, miR-301b, miR-502 y miR-505 expresados única y diferencialmente en mTBI+EC a 1 día, fueron seleccionados como biomarcadores candidatos tempranos de mTBI. Además, miR-203, miR-425-5p, miR-654-3p y miR-655 expresados diferencialmente a los 15 días posteriores a mTBI+EC fueron seleccionados como biomarcadores candidatos capaces de rastrear la recuperación de mTBI.

Finalmente, se seleccionaron dos miARN, miR-21 y miR-335, expresados constantemente en ambos momentos en sTBI+EC, para estudios posteriores.

Tabla 2: Cambio en número de veces de microARN expresado diferencialmente en 5 pacientes mTBI+EC (1 y 15 días) y 5 pacientes sTBI+EC (1 y 15 días), frente a 5 HV y detectado por TLDA.

mTBI+EC 1 día VS HV		mTBI+EC 15 días VS HV		sTBI+EC 1 día VS HV		sTBI+EC 15 días VS HV	
hsa-miR-184	0,13 83	hsa-miR-193a-5p	24,9 01	hsa-let-7g	0,32 50	hsa-miR-130a	14,9 79
hsa-miR-190	0,12 78	hsa-miR-194	20,9 46	hsa-miR-10a	11,9 53	hsa-miR-152	9,89 21
hsa-miR-425-5p	0,07 98	hsa-miR-203	4,17 63	hsa-miR-132	8,18 75	hsa-miR-190	0,02 77
hsa-miR-502	0,05 38	hsa-miR-365	3,70 87	hsa-miR-143	26,1 93	hsa-miR-193a-5p	13,6 55
hsa-miR-505	7,76 96	hsa-miR-425-5p	3,01 66	hsa-miR-148b	20,0 95	hsa-miR-194	12,3 01
hsa-miR-126*	0,15 70	hsa-miR-654-3p	0,08 78	hsa-miR-18a	26,8 06	hsa-miR-21	12,6 62
hsa-miR-144*	0,27 58	hsa-miR-655	0,07 56	hsa-miR-190	0,06 34	hsa-miR-27b	18,9 77
hsa-miR-590-3p	0,38 42	hsa-miR-671-3p	4,05 84	hsa-miR-192	0,22 45	hsa-miR-301	21,9 54
hsa-miR-624	0,08 36	hsa-miR-126*	0,29 78	hsa-miR-193a-5p	29,7 85	hsa-miR-326	93,0 99
hsa-miR-301b	0,04 35	hsa-miR-144*	0,26 45	hsa-miR-21	7,16 54	hsa-miR-335	45,0 50
		hsa-miR-590-3p	0,30 35	hsa-miR-223	4,67 99	hsa-miR-345	37,6 99
		hsa-miR-624	0,16 43	hsa-miR-335	37,1 92	hsa-miR-361	37,2 95
		hsa-miR-625*	0,15 21	hsa-miR-365	5,57 71	hsa-miR-422a	77,3 73
				hsa-miR-429	0,12 94	hsa-miR-579	4,72 03
				hsa-miR-618	29,5 27	hsa-miR-642	41,5 15
				hsa-miR-95	20,7 88	hsa-miR-671-3p	8,44 25
				hsa-miR-144*	0,27 59	hsa-miR-99a	12,2 18

mTBI+EC 1 día VS HV		mTBI+EC 15 días VS HV		sTBI+EC 1 día VS HV		sTBI+EC 15 días VS HV	
				hsa-miR-624	0,03 04	hsa-miR-144*	0,29 05
				hsa-miR-625*	0,09 81	hsa-miR-520D-3p	0,25 79
						hsa-miR-590-3p	0,41 88
						hsa-miR-625*	0,15 75
						hsa-miR-629	0,27 93

Ensayo de TaqMan individual para biomarcadores candidatos de mTBI

Para validar estos hallazgos, posteriormente probamos la expresión de miARN seleccionados en tres grupos separados e independientes (10 mTBI + EC, 10 sTBI + EC, 10 EC) en los dos puntos de tiempo elegidos (1 y 15 días desde la lesión) mediante el uso de ensayos TaqMan individuales. Los resultados se compararon con 10 HV. Los cambios en número de veces se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando miR-331 y miR-223* como genes de referencia.

Entre los biomarcadores candidatos de mTBI en ambos puntos de tiempo (miR-184, miR-301b, miR-502, miR-505, miR-203, miR-425-5p, miR-654-3p y miR-655), dos mostraron resultados interesantes y se expresaron de manera significativa y diferenciada en las tres categorías diferentes en comparación con HV. En particular, miR-425-5p y miR-502 mostraron una tendencia similar (Figura 1). Ambos fueron significativamente regulados a la baja en mTBI+EC (media de $0,387 \pm 0,201$ y $0,314 \pm 0,146$) respectivamente a 1 día de la lesión en comparación con V ($p < 0,001$), EC ($p < 0,001$) y sTBI+EC ($p < 0,001$). A los 15 días de la lesión leve, miR-425-5p y miR-502 volvieron a los niveles normales ($0,886 \pm 0,310$ y $1,157 \pm 0,258$). La expresión de miR-425-5p y miR-502 también se encontró similar a la de HV en muestras de EC a 1 día y 15 días de la lesión, lo que sugiere que estos dos biomarcadores se expresan de manera diferencial sólo en pacientes con lesión cerebral. Además, ninguno de ellos mostró diferencia significativa en sTBI+EC en comparación con HV en ambos puntos de tiempo. Por lo tanto, miR-425-5p y miR-502 podrían ser considerados los biomarcadores candidatos más prometedores para el diagnóstico temprano y el monitoreo de mTBI a los 15 días después del trauma. Las ABC para estos biomarcadores se muestran en la Tabla 3.

Ensayo de TaqMan individual para biomarcadores candidatos de sTBI

Se analizaron miR-21 y miR-335 como posibles biomarcadores de sTBI, ya que ambos aparecieron regulados al alza en ambos puntos de tiempo de sTBI+EC en la selección inicial. También demostraron ser candidatos fuertes en el segundo conjunto de datos de pacientes (Figura 2). miR-21 estaba regulado al alza significativamente en ambos puntos de tiempo en sTBI con EC ($7,106 \pm 4,192$ y $4,012 \pm 1,577$) con respecto a HV ($p < 0,001$), EC ($p < 0,001$) y mTBI ($p < 0,001$). No se encontraron diferencias significativas en las categorías restantes en comparación con HV. miR-335 mostró una regulación al alza en sTBI+EC y en ambos puntos de tiempo ($16,824 \pm 14,195$ y $12,324 \pm 8,931$, respectivamente). En el día 1, este grupo fue significativamente diferente de los controles ($p = 0,001$) y mTBI+EC ($p = 0,031$), pero no EC. Curiosamente, se observó un aumento significativo en los pacientes con EC a 1 día ($7,951 \pm 4,870$), pero no a los 15 días de la lesión ($1,260 \pm 0,531$). Por esta razón, el día 15, miR-335 fue significativamente mayor en el grupo de sTBI+EC con respecto a HV ($p = 0,002$), EC ($p = 0,007$) y mTBI+EC ($p = 0,001$). miR-335 no mostró ninguna diferencia significativa en mTBI+EC en ambos puntos de tiempo en comparación con HV. Las ABC para estos biomarcadores también se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Área bajo la curva

Variable(s)	Área	Intervalo de confianza del 95 % asintótico	
		Límite inferior	Límite superior
miR-502 1 día	,993	,972	1,000
miR-502 15 días	No significativo	-	-
miR-425-5p 1 día	,994	,977	1,000
miR-425-5p 15 días	No significativo	-	-
miR-21 1 día	,979	,934	1,000
miR-21 15 días	,975	,929	1,000
miR-335 1 día	,758	,592	,921
miR-335 15 días	,957	,884	1,000

Discusión

El presente estudio investigó si los cambios en los niveles de miARN pueden aplicarse al diagnóstico de TBI, y evaluando

su gravedad. Se identificaron cuatro miARN expresados diferencialmente en TBI; miR-425-5p, miR-502, miR-21 y miR-335.

miR-425-5p mostró resultados significativos en el día 1 en mTBI+EC en comparación con HV y resultados similares se obtuvieron en todas las demás categorías. Su regulación a la baja dentro de las primeras 24 h de la lesión leve y su regreso a los niveles normales después de 15 días, hace de miR-425-5p un biomarcador candidato adecuado para el trauma leve. miR-502 también se encontró que se expresa diferencialmente en mTBI+EC. La tendencia de este miARN fue muy similar a miR-425-5p. Mostró especificidad para los pacientes con lesiones cerebrales y también podría usarse para rastrear la recuperación, ya que vuelve a su valor normal después de 15 días de la lesión leve.

Después de la sTBI, se observó que 2 miARN (miR-21, miR-335) se expresaron a los 1 y 15 días y, por lo tanto, se seleccionaron como biomarcadores potenciales para la sTBI. miR-21 y miR-335 estaban regulados al alza significativamente en ambos puntos de tiempo en comparación con los controles en sTBI+EC. Por lo tanto, la sobreexpresión confirmó los resultados de la matriz y mostró el potencial de estas moléculas como biomarcadores de sTBI.

El panel seleccionado de miARN tiene el potencial de diagnosticar la TBI con precisión y permitir la estratificación de los pacientes de acuerdo con la gravedad que, a su vez, permite el suministro del tratamiento más adecuado.

Ejemplo 2

Pacientes y recolección de muestras

Los participantes en el estudio fueron reclutados en el Centro de Investigación de Microbiología y Reconstrucción Quirúrgica (SRMRC) del Hospital Queen Elizabeth de Birmingham (Reino Unido) como parte del estudio SIR (Los esteroides y la inmunidad desde las lesiones hasta rehabilitación) (Ethics Ref. 11/SW/0177), estudio ReCoS (The REpetitive Concussion in Sport) (Ethics Ref. 11-0429AP28) y estudio Golden Hour (Ethics Ref. 13/WA/0399). Se recibió el consentimiento informado por escrito de los participantes o de un representante válido (familia o profesional que no participó directamente en el estudio) antes de su inclusión en el estudio.

El segundo conjunto de datos de muestras utilizó muestras de suero de un total de 120 individuos agrupados en 4 categorías diferentes: HV (n=30), EC (n=30), mTBI+EC (n=30), sTBI+EC (n=30), y se tomó sangre en diferentes momentos (T0-1 h, T4-12 h, T48-72 h, 15 días) en cada paciente. Los voluntarios sanos dieron su consentimiento y se inscribieron en el estudio ReCoS. Los pacientes con lesiones de EC tenían fracturas ortopédicas confirmadas radiográficamente, sin traumatismo craneal, sin infección, sin antecedentes de trastornos neurológicos o psiquiátricos y sin dependencia al alcohol o fármacos. La TBI leve con EC incluyó a aquellos con traumatismo craneal no penetrante y puntaje de la Escala de coma de Glasgow (GCS) ≥ 13 . La TBI grave con EC incluyó a pacientes con GCS ≤ 8 .

Procesamiento de muestras

Las muestras de sangre se procesaron para el aislamiento del suero dentro de las 2 h siguientes a la extracción. La sangre entera se dejó reposar durante aproximadamente 30' a temperatura ambiente antes de ser centrifugada a 3000 rpm durante 10' a 4 °C. El suero se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta el análisis.

El aislamiento de ARN, el análisis de datos, los ensayos y el análisis estadístico se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

RESULTADOS

Ensayo de TaqMan individual para biomarcadores candidatos de mTBI

Para validar los hallazgos del Ejemplo 1, se midió la expresión de miARN seleccionados en 3 grupos separados e independientes (30 mTBI + EC, 30 sTBI + EC, 30 EC) en diferentes puntos de tiempo (T0, T4-12 h, T48-72 h y 15 días desde la lesión) mediante el uso de ensayos TaqMan individuales. Los resultados se compararon con 10 HV. Los cambios en número de veces se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando miR-331 y miR-223* como referencia.

Entre los biomarcadores candidatos de mTBI en ambos puntos de tiempo (miR-184, miR-502, miR-505, miR-301b, miR-203, miR-425-5p, miR-654-3p y miR-655), sólo dos mostraron resultados interesantes y se expresaron de manera significativa y diferenciada en las 3 categorías diferentes en comparación con HV. Específicamente, miR-425-5p y miR-502 mostraron una tendencia similar (Figura 3). Ambos estaban regulados a la baja significativamente en mTBI+EC, miR-425-5p a T0-1 h ($p=0,01845$), y a T4-12 h ($p=0,01962$), respectivamente, en comparación con HV, o EC y sTBI+EC ($p<0,05$), y miR-502 a T0-1h y a T4-12 h en comparación con HV ($p=0,02538$ y $p=0,03718$, respectivamente), o EC y sTBI+EC ($p<0,01$). Después de 48 h de una lesión leve, miR-425-5p y miR-502 volvieron a los niveles normales. La expresión de miR-425-5p y miR-502 también se encontró en el grupo EC a un nivel comparable a HV, lo que sugiere que estos dos biomarcadores están regulados a la baja sólo en pacientes con lesiones cerebrales. Por otra parte, ninguno de ellos mostró ninguna regulación a la baja significativa en sTBI+EC en comparación con HV en todos los puntos de tiempo.

Por lo tanto, miR-425-5p y miR-502 podrían ser considerados los biomarcadores candidatos más prometedores para el diagnóstico temprano y el monitoreo de mTBI. Las ABC para estos biomarcadores en los puntos de tiempo más relevantes, se muestran en la Tabla 4.

5 Ensayo de TaqMan individual para biomarcadores candidatos de sTBI

Se analizaron miR-21 y miR-335 como posibles biomarcadores de sTBI, ya que ambos aparecieron regulados al alza en ambos puntos de tiempo de sTBI+EC en la selección inicial. Demostraron ser candidatos fuertes en el segundo conjunto de datos de pacientes también (Figura 4). El miR-21 estaba regulado al alza significativamente en sTBI con EC en todos los puntos de tiempo después de 4 h de la lesión con respecto a HV, EC y mTBI+EC ($p=0,00306$ a T4-12 h, $p=0,00844$ a T48-72 h y $p=0,00077$ a 15 días). No se encontraron diferencias significativas en las categorías restantes en comparación con HV. MiR-335 mostró una regulación ascendente en sTBI+EC y en todos los puntos de tiempo en comparación con HV $p=0,00109$ a T0-1 h, $p=0,00284$ a T4-12 h, $p=0,00012$ T48-72 h y $p=0,01284$ a 15 días) y mTBI+EC, pero no se encontró una regulación al alza significativa en comparación con EC. Las ABC para estos biomarcadores también se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Área bajo la curva de los cuatro biomarcadores candidatos de TBI en diferentes puntos de tiempo.

Sólo se muestran los puntos de tiempo más relevantes.				
Variable(s)	Área	Señal	Intervalo de confianza del 95 % asintótico	
			Límite inferior	Límite superior
miR-425-5p T0				
mTBI vs. HV	1	,002	1	1
mTBI vs. sTBI	,911	,020	,778	1,000
mTBI vs. EC	,950	,01	,860	1,000
miR-502 T0				
mTBI vs. HV	1	,001	1,000	1,000
mTBI vs. sTBI	,990	,001	,960	1,000
mTBI vs. EC	,990	,001	,940	1,000
miR-21 T4-12h				
sTBI vs. HV	,961	,003	,880	1,000
sTBI vs. mTBI	,960	,001	,870	1,000
sTBI vs. EC	,900	,004	,740	1,000
miR-335 T0				
sTBI vs. HV	,990	,000	,960	1,000
sTBI vs. mTBI	,780	,023	,590	,960
sTBI vs. EC	,500	1	,240	0,780

Discusión

Este estudio validó el hallazgo previo de que los cambios en los niveles de miARN se pueden aplicar al diagnóstico de TBI, y evaluando su gravedad. El estudio confirmó que los siguientes cuatro miARN se expresan diferencialmente en TBI; miR-425-5p, miR 502, miR-21 y miR-335.

miR-425-5p mostró resultados significativos en T0 y T4-12 h en mTBI+EC en comparación con HV y resultados similares se obtuvieron en todas las demás categorías. Su regulación a la baja vuelve a los niveles normales después de T48-72 h, y confirma que el miR-425-5p es un candidato biomarcador adecuado de trauma leve.

También se confirmó que el miR-502 se expresaba de forma diferenciada en mTBI+EC. La tendencia de este miARN fue muy similar a miR-425-5p. Mostró especificidad para pacientes con lesiones cerebrales y también podría usarse para rastrear la recuperación, ya que vuelve a su valor normal después de T48-72 h de la lesión leve.

Después de la sTBI, se observó que 2 miARN (miR-21, miR-335) se expresaron en todos los puntos de tiempo analizados y, por lo tanto, se confirmaron como posibles biomarcadores para la sTBI. miR-21 y miR-335 estaban regulados al alza significativamente en comparación con los controles en sTBI+EC. Por lo tanto, la sobreexpresión confirmó el potencial de estas moléculas como biomarcadores de sTBI.

Ejemplo 3

5 Se recolectaron muestras de saliva de atletas profesionales conmocionados después de 2-3 días de lesión y se analizaron los microARN presentes en la saliva. Los atletas fueron diagnosticados clínicamente con mTBI.

Materiales y métodos

10 Los microARN se analizaron utilizando la tecnología nCounter (nanoString Technologies®), que utiliza códigos de barras moleculares y imagenología microscópica para detectar y contar hasta varios cientos de transcripciones únicas en una reacción de hibridación. Cada código de barras codificado por colores se conecta a una única sonda específica del objetivo correspondiente a un microARN de interés.

15 El análisis se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante que incluye los siguientes pasos:

Hibridación: La tecnología emplea dos sondas de ~20 bases por microARN que se hibridan en disolución. Una sonda indicadora lleva la señal, mientras que una sonda de captura permite inmovilizar el complejo para la recopilación de datos.

Purificación e inmovilización: Después de la hibridación, las sondas sobrantes se retiran y los complejos sonda/objetivo se alinean e inmovilizan en el cartucho nCounter.

20 **Recolección de datos:** Los cartuchos de muestras se colocan en un instrumento analizador digital para la recolección de datos. Los códigos de color en la superficie del cartucho se cuentan y tabulan para cada molécula objetivo.

RESULTADOS

25 La Tabla 4 a continuación es una lista de microARN que se encontró que se expresaron de manera significativa y diferenciada en atletas con conmoción cerebral en comparación con voluntarios sanos. La tabla muestra el cambio en número de veces en la expresión de los microARN en los pacientes en comparación con el grupo de control. Los cambios en número de veces se calcularon utilizando miR-23a-3p y miR-148b-3p como genes de referencia que se expresan de manera diferente en atletas con conmociones cerebrales en comparación con voluntarios sanos. La tabla muestra el cambio en número de veces en la expresión de los microARN en los pacientes en comparación con el grupo de control.

30 Los cambios en número de veces se calcularon utilizando miR-23a-3p y miR-148b-3p como genes de referencia.

Tabla 5

microARN	Cambio en número de veces
hsa-let-7c-5p	2,80
hsa-let-7i-5p	1,82
hsa-miR-142-3p	1,41
hsa-miR-148a-3p	1,72
hsa-miR-15b-5p	2,30
hsa-miR-16-5p	2,32
hsa-miR-181a-5p	1,54
hsa-miR-20a-5p+hsa-miR-20b-5p [§]	2,16
hsa-miR-221-3p	2,90
hsa-miR-24-3p	1,94
hsa-miR-27b-3p	3,45
hsa-miR-29a-3p	4,03
hsa-miR-29c-3p	1,44
hsa-miR-424-5p	2,88
hsa-miR-30a-5p	2,16
hsa-miR-107	1,72
hsa-miR-135b-5p	1,97
hsa-miR-199b-5p	1,88
hsa-miR-324-5p	5,61
hsa-miR-652-3p	3,43

microARN**Cambio en número de veces**

§ los valores para miR-20a-5p y miR-20b-5p se combinaron debido a que la tecnología nCounter no era capaz de distinguir entre ellos.

Discusión

- 5 Este estudio muestra que los microARN presentes en la saliva son un indicador de conmoción cerebral/mTBI. Esto es significativo debido a que la saliva se obtiene más fácilmente que la sangre, y, por lo tanto, la detección de microARN salivales ofrece un medio rápido y conveniente para diagnosticar la TBI, particularmente a pie de campo.

Ejemplo 4**10 Materiales y métodos***Aprobación del estudio*

- 15 Los participantes del estudio fueron reclutados a través del Centro de Investigación de Reconstrucción Quirúrgica y Microbiología (SRMRC), con sede en el Hospital Queen Elizabeth de Birmingham (Reino Unido), como parte del estudio ReCoS (The REpetitive COncussion in Sport) (Ethics Ref. 11-0429AP28). Se recibió consentimiento informado por escrito de los participantes antes de su inclusión en el estudio.

- 20 Se analizaron muestras de saliva de un total de 20 sujetos (grupo de descubrimiento). En particular, se utilizaron muestras de saliva de 10 atletas con conmoción cerebral y 10 atletas sin conmoción cerebral para detectar proteínas, y 6 atletas con conmoción cerebral y 6 atletas sin conmoción cerebral para el análisis de microARN. La saliva de los jugadores conmocionados se recogió 48-72 horas después de la conmoción cerebral certificada por el equipo de cuidados intensificados que los atendió, de acuerdo con el protocolo vigente para el deporte correspondiente. A partir de estos datos, se calculó el tamaño de la muestra necesaria para la validación en una cohorte mayor de pacientes con $\alpha=0,05$ y potencia=0,9. El tamaño de muestras requerido fue de 29 sujetos con base en el miARN más variante identificado en el grupo de descubrimiento.

- 25 Se obtuvo un segundo conjunto de muestras (grupo de validación) de un total de 22 jugadores conmocionados y 10 no conmocionados. Las muestras se recolectaron entre 2 y 5 días después de la conmoción cerebral.

30 Procesamiento de muestras

- 35 Se recolectaron cinco ml de saliva en un tubo de envase universal de plástico estéril de 50 ml mantenido en hielo durante no más de 30'. Las muestras se centrifugaron entonces a 2600 x g durante 15' a 4 °C. La saliva se dividió en alícuotas y a cada ml de saliva se añadió un inhibidor de ARNasa (500 unidades/ml) para el análisis de miARN.

Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el análisis.

40 Aislamiento de ARN

- El ARN total se aisló de 400 µl de saliva mediante el uso del mini kit Qiagen miRNeasy (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania), de acuerdo con el protocolo complementario de Qiagen para la purificación de ARN (incluidos ARN pequeños) de suero o plasma. Finalmente, el ARN se eluyó en 200 µl de agua libre de ARNasa y posteriormente se precipitó añadiendo 20 µg de glucógeno, 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol frío al 100 %. Después de la incubación a -80 °C durante la noche, el ARN se centrifugó y se lavó dos veces en etanol al 75 % frío y se volvió a suspender en 7 µl de agua libre de ARNasa. El ARN se cuantificó mediante NanoDrop.

Perfil de miARN circulante mediante tecnología NanoString

- 50 El perfil de expresión de miARN de saliva se realizó a través de la tecnología NanoString mediante el uso de kits de ensayo de expresión de miARN humanos nCounter v3 (tecnologías NanoString) en un nCounter FLEX (estación de preparación y analizador digital) (NanoString Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El perfil se llevó a cabo en 6 atletas con conmociones cerebrales y 6 atletas sin conmociones cerebrales. Se utilizaron tres µl (aproximadamente 150 ng) de ARN total para la preparación de la muestra. El análisis de los datos se realizó a través del software nSolver 2.6; los miARN utilizados como controles endógenos se seleccionaron mediante el método de normalización de mediana global (GMN): se calculó la correlación de Pearson entre las medias de recuento para cada carril y los recuentos de cada miARN, identificando aquellos miARN cuya expresión era más cercana a la media de recuento del cartucho (miR-23a-3p, miR-29b-3p, miR-148b-3p). El análisis estadístico se realizó a través del análisis de significancia de micromatrices (SAM) (<http://www.tm4.org>), utilizando un valor p basado en permutaciones 100; motor de imputación: K-vecinos más cercanos (10 vecinos); tasa de descubrimiento falso (FDR) < 0,05.
- 60

Ensayos TaqMan individuales

Veintiún miARN expresados diferencialmente fueron elegidos de las matrices como biomarcadores candidatos potenciales de conmoción cerebral. Estos candidatos se utilizaron para validar los datos en una cohorte ampliada de 22 atletas con conmoción cerebral y 10 atletas sin conmoción cerebral (grupo de validación). La saliva se recolectó después de 2-5 días de la lesión y se analizó mediante ensayos TaqMan individuales (AppliedBiosystems, Life Technologies™). Las muestras se extrajeron como se describió anteriormente, se retrotranscribieron (AppliedBiosystems, Life Technologies™) y el análisis RT-qPCR se realizó en un sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad iQ5 (Bio-Rad, CA, EE. UU.). Los cambios en número de veces de la expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando miR-23a-3p y miR-148b-3p como genes de referencia.

Análisis estadístico

Se utilizó una prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney) para comparar el nivel de microARN en los dos grupos independientes. Un valor $p < 0,05$ se aceptó como significativo. Además, se utilizó un análisis de características operativas del receptor (ROC) para calcular la sensibilidad y especificidad de cada biomarcador en el diagnóstico de conmoción cerebral, expresado como área bajo la curva (ABC). Todos los análisis se llevaron a cabo en SPSS v,22 (IBM).

Resultados

Perfil Nanostring

Entre los 800 microARN analizados mediante nCounter NanoString en la saliva de atletas con y sin conmoción cerebral, se seleccionaron 21 miARN con expresión diferencial en las dos poblaciones: hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-652-3p. Los resultados mostraron una regulación al alza significativa para todos los miARN mencionados anteriormente.

Ensayo TaqMan individuales

Para validar estos hallazgos, posteriormente probamos la expresión de los 21 miARN seleccionados en un grupo separado e independiente, compuesto por 22 atletas con conmoción cerebral y 10 atletas sin conmoción cerebral. La saliva se recolectó después de 2-5 días de la lesión, mediante el uso de ensayos TaqMan individuales. Los cambios en número de veces se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (método 2-delta delta CT), utilizando miR-23a-3p y miR-148b-3p como marcadores de referencia.

Entre estos biomarcadores candidatos para la conmoción cerebral, 5 estaban regulados al alza significativamente en el grupo de validación. Específicamente, miR-27b-3p ($p=0,02$), let-7i-5p ($p=0,001$), miR-142-3p ($p=0,008$), miR-107 ($p=0,03$), miR-135b-5p ($p=0,02$) confirmaron los resultados obtenidos mediante el análisis Nanostring (Figura 5). Estos resultados también se muestran en la Tabla 6, que muestra que el grupo control tiene un cambio en número de veces de entre 0,6 y 1,4. Un cambio en número de veces por encima de esto se considera indicativo de conmoción cerebral. El cambio en número de veces de mediana visto para los atletas conmocionados es un cambio en número de veces de aproximadamente 2,5 para cada uno de los 5 miARN identificados. Un valor de cambio en número de veces calculado mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de 2,0 o más para cualquiera de estos biomarcadores 5 identificados daría un diagnóstico de conmoción cerebral.

Tabla 6

	miR 27b-3p	let 7i-5p	miR 142-3p	miR 107	miR 135b-5p
control	0,6-1,4	0,6-1,4	0,6-1,4	0,6-1,4	0,6-1,4
promedio de conmoción	4,494754 264	4,6913 58	5,35579 639	3,3364 7	6,022724 008
mediana de conmoción	2,462406 429	3,2665 26	2,98367 692	2,3877 47	2,539442

En la Figura 6 y en la Tabla 7 se muestran gráficos de cuadros de expresión relativa y ABC para estos biomarcadores (0,755, 0,845, 0,791, 0,732 y 0,755, respectivamente).

Tabla 7: Área bajo la curva (ABC) de miARN seleccionados como biomarcadores de conmoción cerebral

Variables	ABC
miR-27b-3p	0,755
let-7i-5p	0,845
miR-142-3p	0,791

Variables	ABC
miR-107	0,732
miR-135b-5p	0,755

Discusión

5 En este estudio, examinamos la saliva, un fluido potencialmente novedoso para el examen de biomarcadores en el contexto de lesión en la cabeza y conmoción cerebral (mTBI).

10 Se encontraron cinco miARN significativamente regulados al alza en la saliva de la población con conmociones cerebrales solamente. Cada uno de miARN-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p estaban regulados al alza significativamente en atletas con conmociones cerebrales. Cada uno de estos cinco biomarcadores tiene la capacidad de distinguir a los atletas con conmoción cerebral de los atletas sin conmoción cerebral, especialmente después de 2-5 días de la lesión.

Divulgaciones no de acuerdo con la invención reivindicada

- 15 1. Un método de diagnóstico y/o monitoreo de lesión cerebral traumática leve (mTBI) en un sujeto, en donde el método comprende determinar un nivel de al menos un miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto, en donde al menos un miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p, o cualquier combinación de los mismos.
- 20 2. El método del párrafo 1, en donde un nivel regulado al alza de al menos un miARN es indicativo de mTBI.
3. El método del párrafo 1, en donde se diagnostica que el sujeto tiene mTBI si el nivel de al menos un miARN está por encima de un umbral predeterminado o aumentado en relación con un control.
4. El método del párrafo 3, en donde el umbral predeterminado es equivalente a un cambio en número de veces de 2 o más en el método 2-delta delta CT (2- $\Delta\Delta$ CT).
5. El método de cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde al menos un miARN es miR-27b-3p.
- 25 6. El método de cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde al menos un miARN es let-7i-5p.
7. El método de cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde al menos un miARN es miR-142-3p.
8. El método de cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde al menos un miARN es miR-107.
9. El método de cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde al menos un miARN es miR-135b-5p.
10. El método de cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el método comprende determinar un nivel de al menos dos miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto.
- 30 11. El método del párrafo 10, en donde al menos dos miARN se seleccionan de miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 o miR-135b-5p.
12. El método de los párrafos 10 o 11, en donde un nivel regulado al alza de al menos dos miARN es indicativo de mTBI.
13. El método del párrafo 10 u 11, en donde se diagnostica que el sujeto tiene mTBI si el nivel de al menos dos miARN está por encima de un umbral predeterminado o aumentado en relación con un control.
- 35 14. El método del párrafo 13, en donde el umbral predeterminado es equivalente a un cambio en número de veces de 1,5 o más en el método 2-delta delta CT (2- $\Delta\Delta$ CT).
15. El método de cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la muestra de saliva se obtiene de 24 horas a 15 días después de la lesión.
- 40 16. El método del párrafo 15, en donde la muestra de saliva se obtiene de 24 horas a 7 días después de la lesión.
17. El método del párrafo 16, en donde la muestra de saliva se obtiene de 2 a 5 días después de la lesión.
18. El método de cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el método comprende determinar un nivel de los miARN miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p.
- 45 19. El método de cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el método además comprende determinar un nivel de uno o más miARN adicionales seleccionados de let-7c-5p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, y miR-424-5p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, o miR-652-3p.
20. Un elemento sensor para un sistema de detección para el diagnóstico y/o monitoreo de mTBI, en donde el elemento sensor comprende un sustrato funcionalizado con una sonda específica para al menos uno de miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 o miR-135b-5p.
- 50 21. El elemento sensor del párrafo 20, en donde la sonda comprende un ácido nucleico capaz de unirse al menos un miARN.
22. El elemento sensor del párrafo 20 o 21, en donde la sonda comprende un ácido nucleico que tiene al menos 70 % de identidad con una secuencia que es el complemento de la secuencia del miARN objetivo.
- 55 23. El elemento sensor del párrafo 20 o 21, en donde la sonda comprende un ácido nucleico que tiene al menos 70 % de identidad con una secuencia que es el complemento de SEQ ID NO: 25, 26, 35, 39 o 40.
24. Un sistema de detección para el diagnóstico y/o monitoreo de mTBI, que comprende
 - un elemento sensor de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 20 a 23, y
 - un dispositivo de detección capaz de detectar la unión de un miARN objetivo a la sonda.
- 60 25. El sistema de detección de acuerdo con el párrafo 24, que además comprende los medios para determinar si el miARN objetivo está regulado al alza.

26. Un método para determinar un curso de acción para un sujeto con sospecha de tener mTBI, que comprende la aplicación de una muestra de saliva obtenida del sujeto a un sistema de detección de acuerdo con los párrafos 24 o 25, si se detecta un nivel regulado al alza de al menos un miARN proporcionando un tratamiento para mTBI.

27. Un método para tratar a un sujeto con sospecha de TBI, en donde el método que comprende

- 5 i) determinar si un nivel regulado al alza de al menos un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR-27b-3p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p es detectable en una muestra de saliva obtenida del sujeto, y
ii) si se detecta un nivel regulado al alza de al menos un miARN que proporciona tratamiento para mTBI al sujeto.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de diagnóstico y/o monitoreo de lesión cerebral traumática leve (mTBI) en un sujeto, en donde el método comprende determinar un nivel de al menos un miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto, en donde al menos un miARN comprende let-7i-5p.
2. El método de la reivindicación 1, en donde un nivel regulado al alza de al menos un miARN es indicativo de mTBI.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto ha sido diagnosticado con mTBI si el nivel de al menos un miARN está por encima de un umbral predeterminado o aumentado en relación con un control, preferiblemente, en donde el umbral predeterminado es equivalente a un cambio en número de veces de 2 o más en el método 2-delta delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$).
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende determinar un nivel de al menos dos miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto, preferiblemente en donde al menos dos miARN se seleccionan de:
 - a. let-7i-5p y miR-142-3p;
 - b. let-7i-5p y miR-107;
 - 20 c. let-7i-5p y miR-135b-5p; o
 - d. let-7i-5p y miR-27b-3p.
5. El método de la reivindicación 4, en donde un nivel regulado al alza de al menos dos miARN es indicativo de mTBI.
- 25 6. El método de la reivindicación 4, en donde se diagnostica que el sujeto tiene mTBI si el nivel de al menos dos miARN está por encima de un umbral predeterminado o aumentado en relación con un control.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el umbral predeterminado es equivalente a un cambio en número de veces de 1,5 o más en el método 2-delta delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$).
- 30 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra de saliva se obtiene:
 - a. hasta 20, 18, 15, 12, 10, 8, 5 o 2 días desde la lesión;
 - b. no más de 72, 48, 36, 24, 12, 6, 4, 2 o 1 horas después de la lesión;
 - c. al menos 24 horas de la lesión;
 - d. hasta 15 días después de la lesión;
 - 35 e. 24 horas a 15 días después de la lesión;
 - f. 24 horas a 10 días después de la lesión;
 - g. 24 horas a 7 días después de la lesión; o
 - h. 2 a 5 días después de la lesión.
- 40 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende determinar un nivel de los miARN let-7i-5p, miR-142-3p, miR-107 y miR-135b-5p.
- 45 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método además comprende determinar un nivel de uno o más miARN adicionales seleccionados de let-7c-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, y miR-424-5p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, o miR-652-3p.
- 50 11. El método de conformidad con la reivindicación 10, en donde el método comprende determinar un nivel de tres, cuatro, o más miARN en una muestra de saliva obtenida del sujeto.
- 55 12. Un uso de un sistema de detección en el método para diagnosticar y/o monitorear mTBI en el método de la reivindicación 1, que comprende
 - un elemento sensor que comprende un sustrato funcionalizado con una sonda específica para let-7i-5p, en donde la sonda comprende un ácido nucleico que tiene al menos 70 % de identidad con una secuencia que es el complemento de la secuencia de let-7i-5p, preferiblemente, en donde la sonda comprende un ácido nucleico que tiene al menos 70 % de identidad con una secuencia que es el complemento de SEQ ID NO: 25, y
 - un dispositivo de detección capaz de detectar la unión de un miARN objetivo a la sonda.
- 60 13. Un uso del sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 12, que además comprende los medios para determinar si el miARN objetivo está regulado al alza.
14. Un fármaco neuroprotector o un sedante para su uso en un método de tratamiento de mTBI en un sujeto, en donde se ha identificado que dicho sujeto tiene una mTBI mediante la determinación del nivel de let-7i-5p en una muestra de saliva obtenida del sujeto.

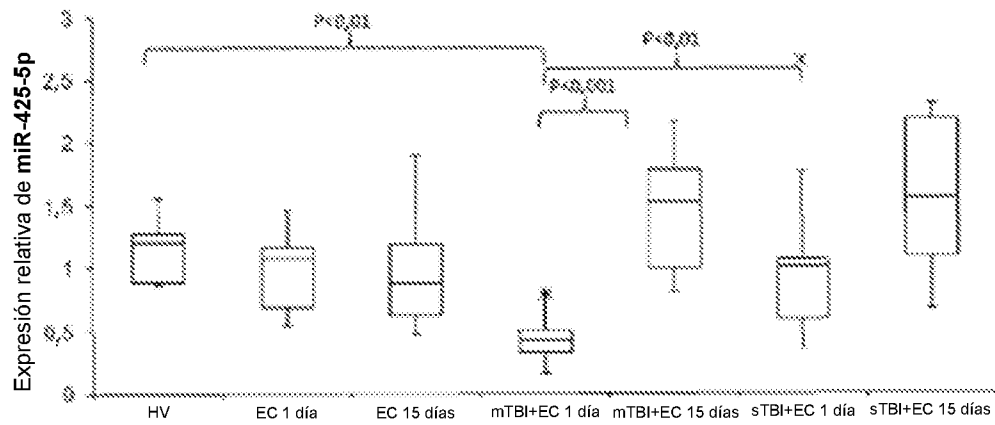


Figura 1A

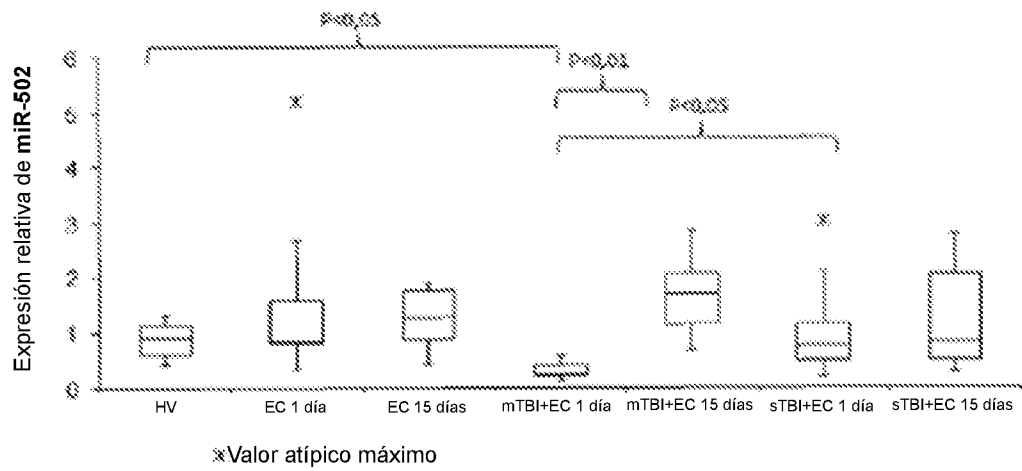


Figura 1B

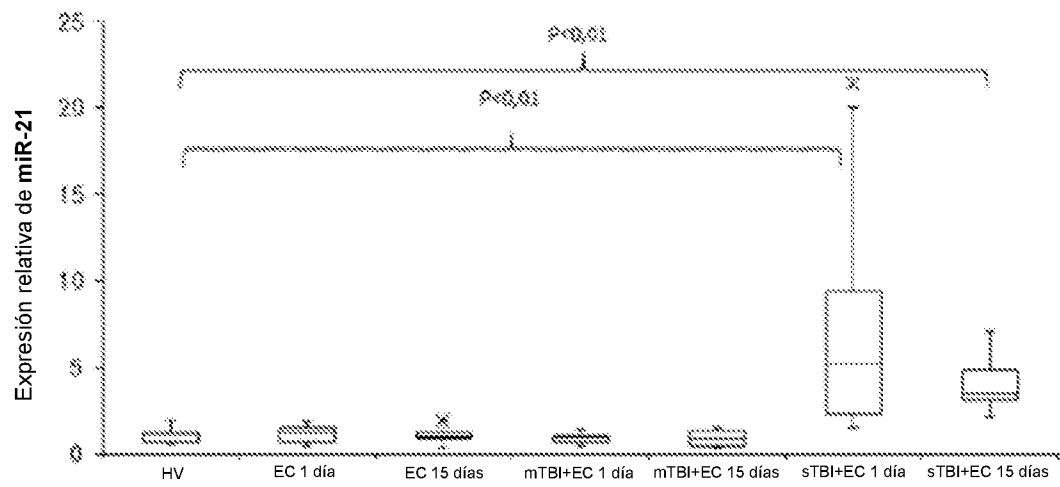
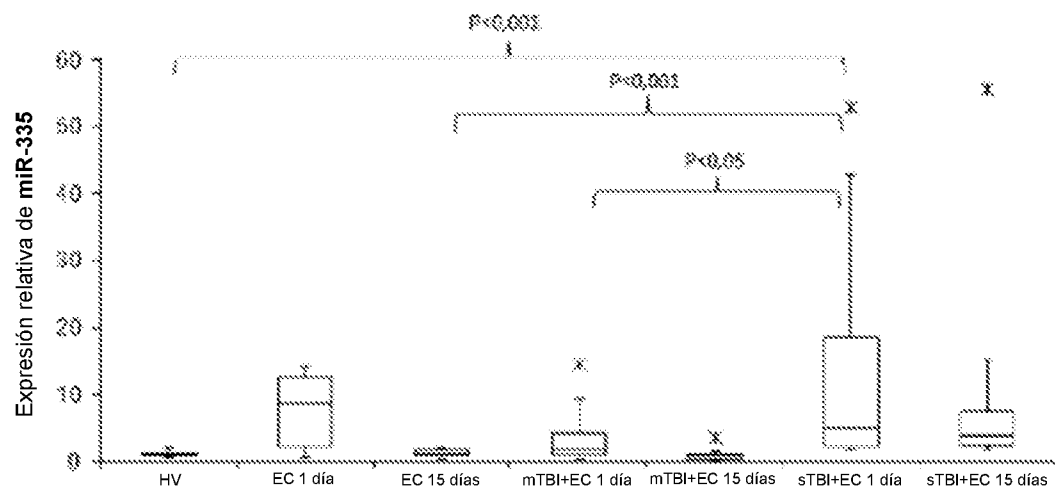


Figura 2A



x Valor atípico máximo

Figura 2B

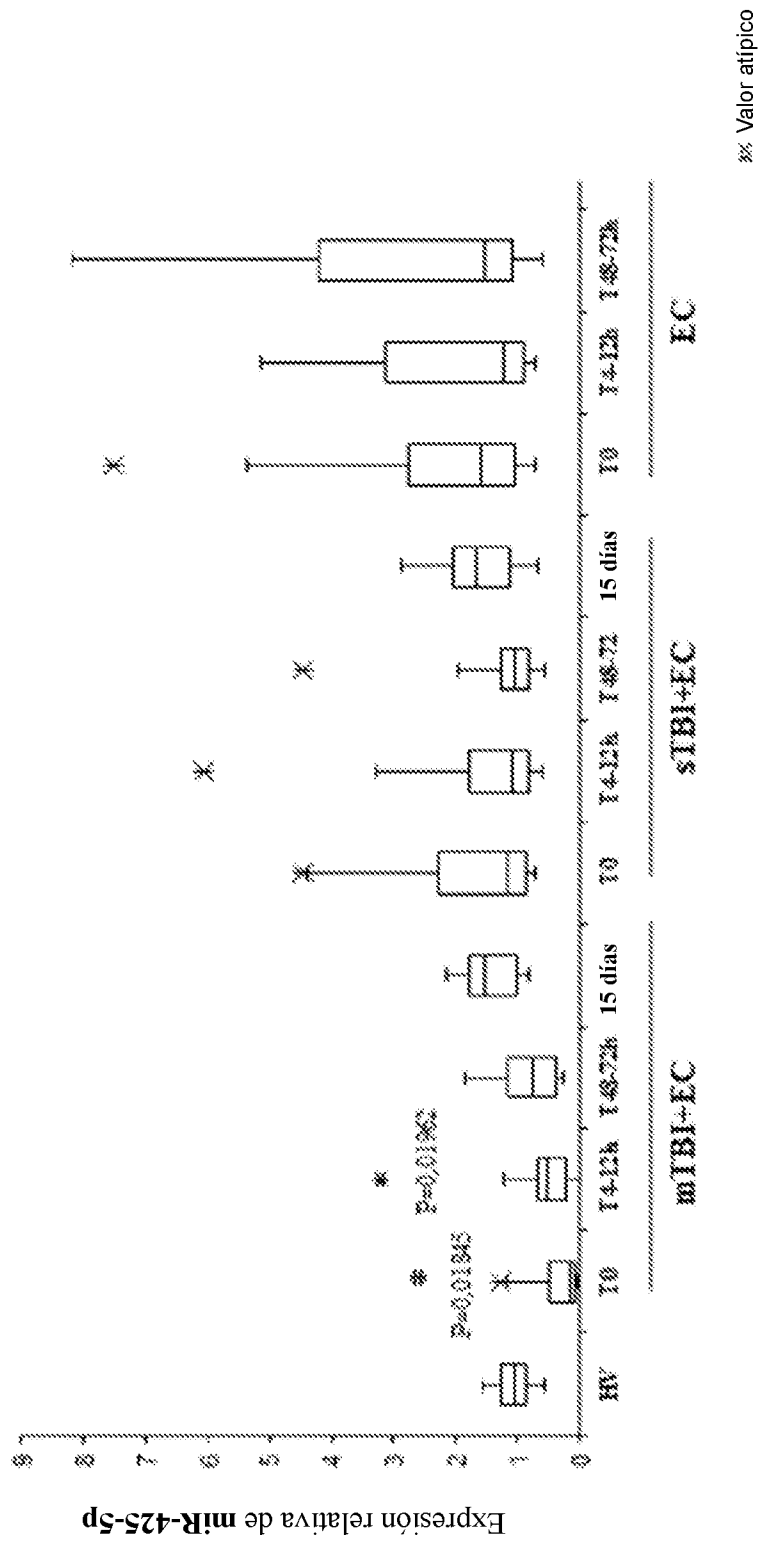


Figura 3A

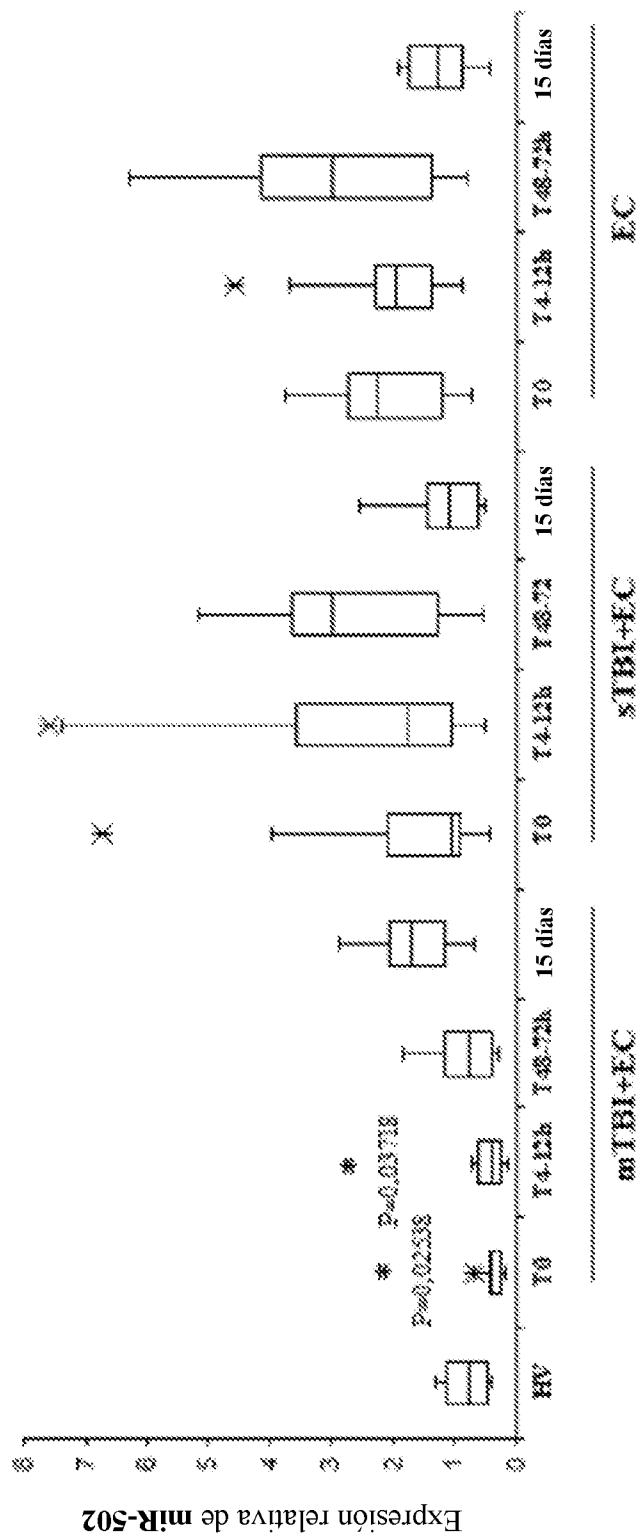


Figura 3B

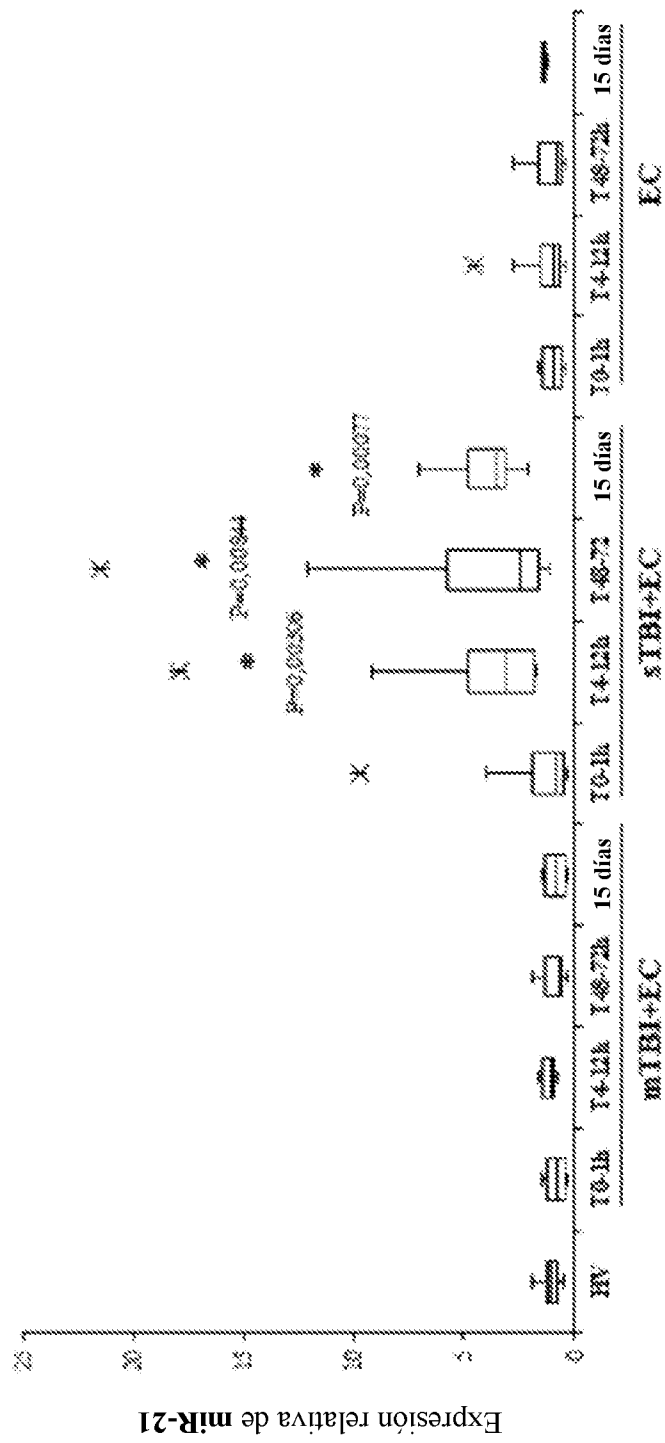


Figura 4A

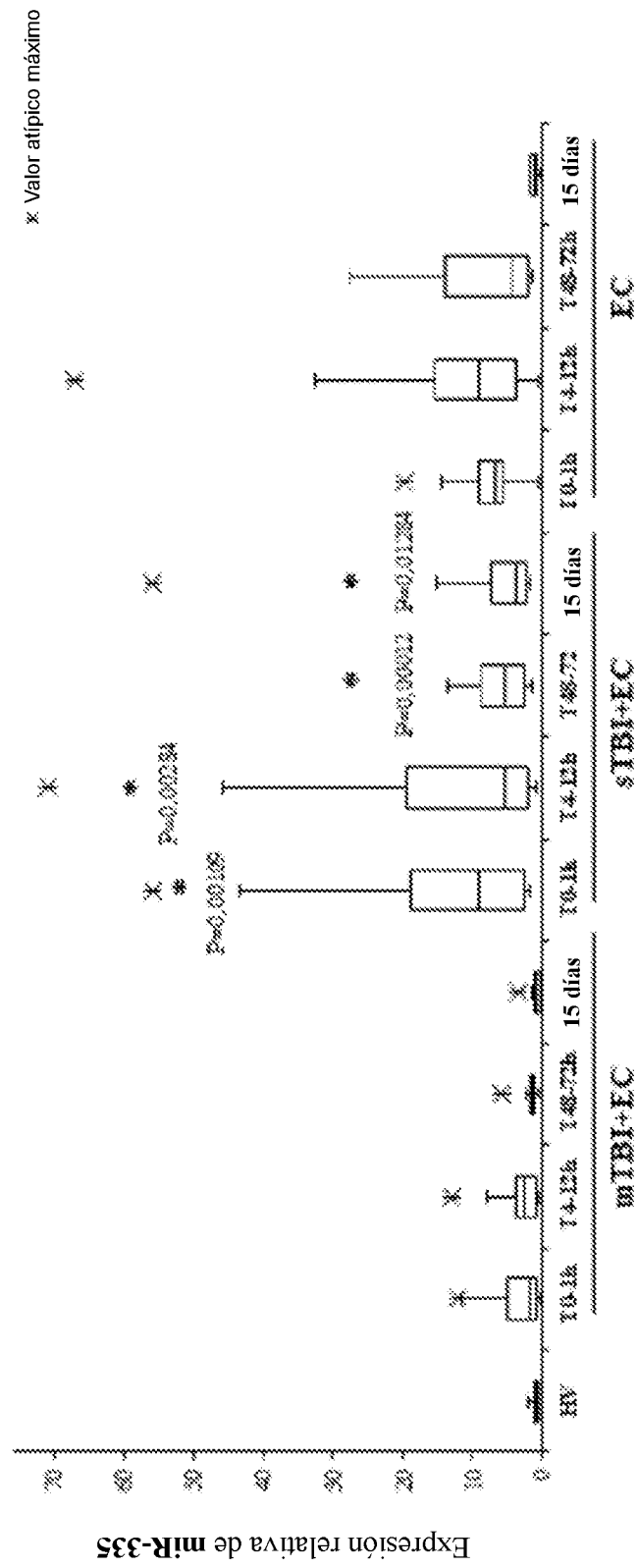


Figura 4B

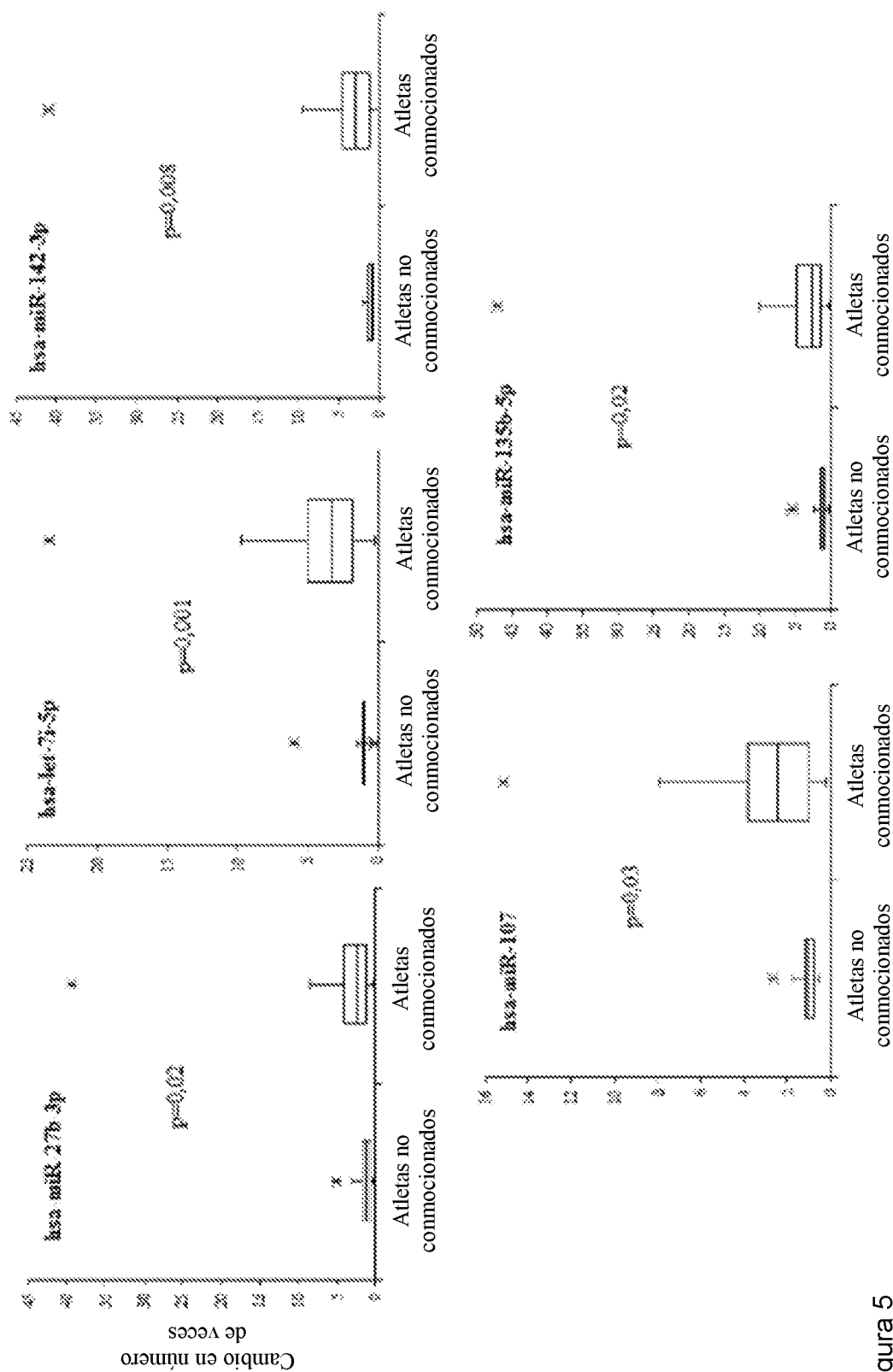


Figura 5

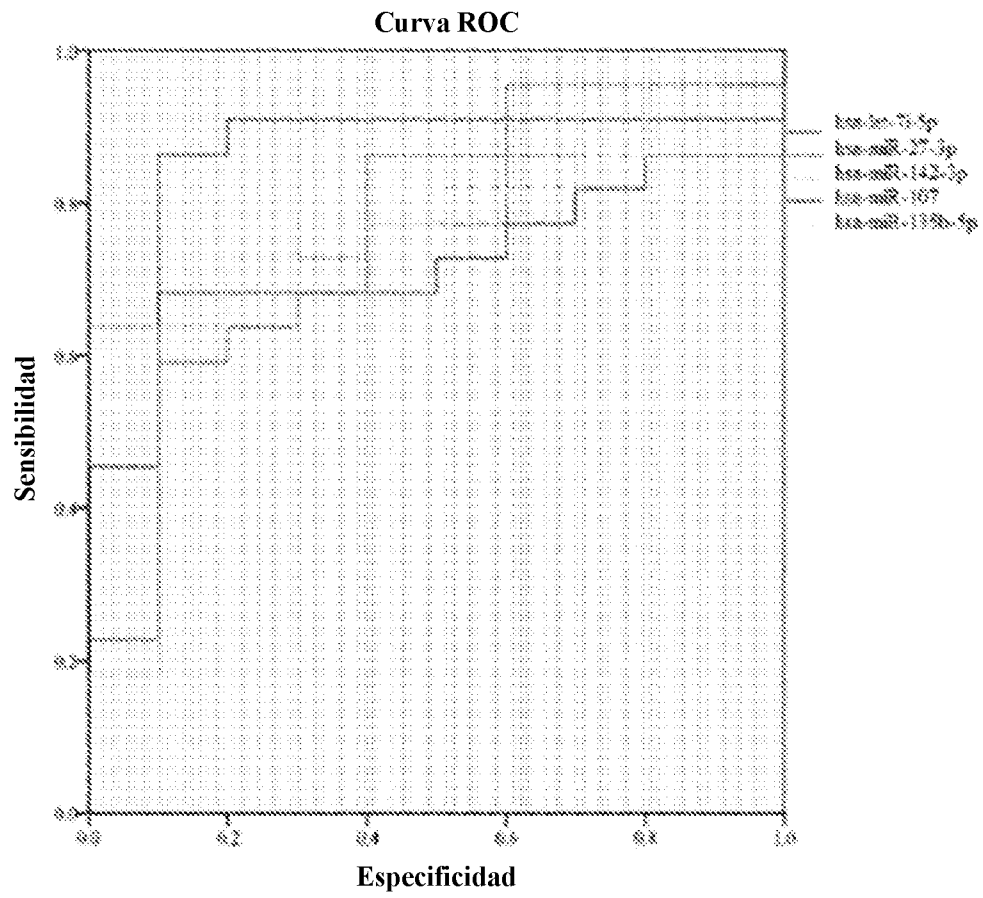


Figura 6