



Casa abierta al tiempo



INR

Informe de finalización del servicio social en actividades relacionadas a la carrera.

Proyecto externo: "Neurofarmacología y Neuroquímica en modelos experimentales"

División de Ciencias Biológicas de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Asesor Interno: Dr. José Francisco Miranda
Hernández

Asesor Externo: Dr. Alfonso Alfaro
Rodríguez

Alumno: Alan Medina Ubaldo

Matricula: 2183086653

Periodo: 26 de septiembre 2023 – 26 de marzo de 2024

1. Introducción

Después de la pandemia de COVID-19, se han reportado diferentes secuelas que han presentado las personas que en algún momento se contagiaron con este virus. Dentro del área de investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (LGII) se está desarrollando un proyecto de investigación sobre los síntomas cognitivos como resultado al contagio con COVID-19. Con base en lo reportado, se conoce que los microARN son moléculas pequeñas de ARN que no codifican proteínas, pero ayudan a la regulación post-transcripcional del ARN que impacta en regulación de producción de proteínas) (Pabón, 2011); por lo cual están presentes durante procesos fisiológicos y del desarrollo humano. De acuerdo a lo anterior, la desregulación en la concentración de microARN induce el desarrollo de enfermedades, por lo tanto, es de gran ayuda el estudio de los niveles de concentración de microARN, presentes tanto en sangre, diferentes fluidos corporales y tejidos (De Planell, 2011). Por lo cual la obtención de un perfil completo respecto a las desregulaciones de microARN, representa una forma de diagnóstico con un gran potencial para el tratamiento y cura de diversas enfermedades humanas (Cheng, 2015).

Por lo tanto, la finalidad del presente trabajo de servicio social es determinar mediante diferentes técnicas de extracción y de cuantificación de microARN, la posible desregulación en la concentración de microARN en pacientes que padecieron COVID-19, a partir de estudios en suero sanguíneo y conocer si este tipo de ácidos nucleicos son un factor de diagnóstico en sujetos que presentaron síntomas cognitivos después de haberse contagiado de COVID-19. Finalmente, a manera de perspectiva, de confirmarse la desregulación en la concentración de microARN, se postulará un programa de rehabilitación en colaboración con el área de psicología del Instituto Nacional de Rehabilitación del LGIII y se llevaría a cabo un seguimiento realizando un análisis de concentración de los microARN post-rehabilitación para conocer la funcionalidad del programa y la recuperación de funciones cognitivas de los sujetos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Contribuir durante el proyecto externo relacionado al estudio de las secuelas cognitivas de pacientes post-COVID-19 a partir del manejo de muestras biológicas, de diagnóstico e informáticos

2.2 Objetivos particulares

- Extracción de material genético (ADN y ARN), así como proteínas presentes en suero sanguíneo de pacientes post COVID-19
- Determinar y evaluar la calidad de las extracciones realizadas de ADN, ARN y proteínas.
- Cuantificar la presencia del gen receptor 3A de 5-hidroxitriptamina (serotonina) mediante la técnica de RT-qPCR
- Comprobar la calidad e integridad de ADN y ARN con un proceso de electroforesis en gel de agarosa.
- Organizar y controlar información y resultados en bases de datos.

- Búsqueda y análisis de artículos científicos con el fin de conocer y aplicar adecuadamente las técnicas que se requieren en el laboratorio relacionadas con el presente proyecto.

3. Metodología de las actividades realizadas

3.1 Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico (ADN) y Proteínas

A partir de suero sanguíneo de 70 sujetos (35 controles y 35 experimentales), se realizaron extracciones de ARN, ADN y proteínas utilizando el protocolo del reactivo TRIzol de la marca Fisher Scientific®, extraída tanto de sujetos que fueron contagiados con SARS-CoV-2, desarrollaron la enfermedad (COVID-19) y presentaron síntomas cognitivos post-contagio y de sujetos llamados "Controles" que hayan sido contagiados con el virus pero no presentar síntomas cognitivos post-contagio. Los criterios de inclusión fueron abiertos, buscando así que pudiesen participar una cantidad adecuada de sujetos, los cuales incluyen características físicas como estatura (a partir de 150cm en adelante), edad (18 años a 65 años) y peso (sin un rango específico).

El procedimiento consiste en centrifugar la sangre para separarla en 3 fases la cual se recupera solo el sobrenadante (la parte clara y amarilla), después, se aplica el protocolo de TRIzol (Gutiérrez, 2018) para extraer y dejar un pellet solo de ADN, ARN o proteínas.

3.2 Determinación de la calidad del material genético (ARN/ADN) obtenido.

El paso siguiente fue cuantificar la cantidad y pureza de las muestras, ya que teniendo estos datos es posible continuar con más procedimientos utilizando estas mismas. Para esto se utiliza el equipo NanoDrop de Fisher Scientific®, el cual es un espectrofotómetro UV el cual brinda los datos necesarios para conocer la pureza y concentración de las extracciones. Éste procedimiento consiste en colocar en la platina del equipo, 10 uL (microlitros) de la re-suspensión del pellet realizado en la extracción con TRIzol. Este equipo proporcionará tres valores importantes de la muestra:

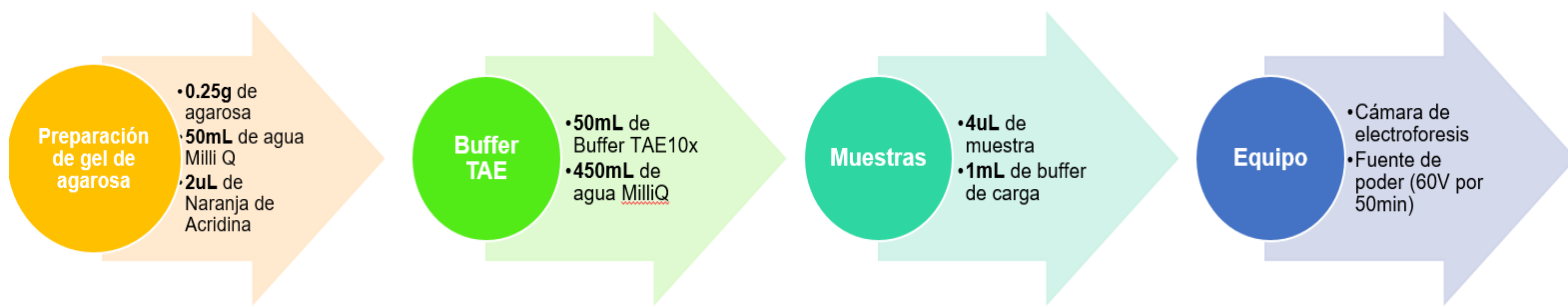
- **A260:** La absorbancia de la muestra de un espectro Ultravioleta
- **A260/280:** Grado de pureza de la extracción (ratio de absorbancia para la cuantificación ADN, ARN y proteínas)

La concentración del material genético se reporta en unidades de nano gramo sobre microlitro (ng/uL).

Este proceso se debe realizar siempre con cada una de las muestras que se tengan para evitar errores que puedan desencadenar posibles complicaciones a futuro con el proyecto.

3.3 Electroforesis en gel de agarosa.

Para conocer con mucha más certeza si hay impurezas o si en todas las muestras solo se encuentra ARN, ADN o proteínas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se presenta un esquema con los componentes de la técnica de electroforesis:



En la preparación del gel, se probó diferentes concentraciones de agarosa ya que las extracciones de ADN o ARN al estar concentradas se dificultaba el paso de los ácidos nucleicos dentro del gel (alterando resultados), por lo cual se optó por un gel con menos concentración permitiendo así desplazamiento durante el procedimiento; así utilizando al final una concentración de 0.25g de agarosa en 50 mililitros de agua Milli Q (Ultrapura). Se calienta hasta disolver la agarosa, seguido se deja enfriar hasta que tome una temperatura soportable al sostener con la mano y se le agrega 2uL de un colorante que ayudara a marcar con fluorescencia nuestras muestras y observarlas en la luz UV, en este caso se utilizó naranja de acridina.

El buffer de TAE se colocó dentro de la cámara del equipo y se sumergirá el gel, esto ayudará a las muestras que recorran el gel y que no varíe el pH para evitar la degradación de las mismas.

Una vez preparado, el gel de agarosa se coloca dentro de la cámara y se sumerge en el buffer, se colocan en los pozos del gel las muestras, haciendo una mezcla con 4uL de la muestra con 1uL de buffer de carga que dará peso a la muestra y evita que se disuelva, además de brindar color que ayudará a verlas en la luz UV.

Por último, para iniciar el proceso electroforético (corrimiento de las muestras en el gel de acuerdo a su tamaño), el equipo utiliza carga eléctrica para que se mueva las muestras, las configuraciones que se utilizaron fueron un voltaje de 60V en un tiempo de 50min; al término de este tiempo se lleva el gel bajo la luz UV y se realiza un análisis de lo obtenido.

3.4 Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real y retro-transcripción (RT-PCR)

Para este proceso, se realizaron pruebas para saber a detalle el cuidado, proceso y medidas a seguir, ya que es muy fácil que se contaminen las muestras a tratar o se realice de manera inadecuada así desperdiciando muestras y reactivos. En esta ocasión no se trabajó con las muestras de sujetos con los síntomas cognitivos provocados por el contagio con COVID-19, ni los controles, esto se hizo para juntar aún más muestras y tener un número significativo de resultados.

Este procedimiento se realizó con muestras de modelos experimentales de ratas inducidas con Parkinson, las cuales se les extrajo el cerebro, corazón, pulmones y riñones, se procesaron con TRIzol para extraer y obtener ARN.

Al trabajar con ARN es necesario realizar una retro-transcripción con un equipo de PCR para así obtener cadenas de ADN y copias de estas las cuales se conocen como ADN complementario (cADN). Posteriormente se realiza amplificaciones de secuencias de un gen en específico del Receptor 3A de 5-hidroxitriptamina (serotonina), después, cuantificar las amplificaciones con la presencia de la secuencia genética de interés; es importante el cerciorarse que no haya impurezas de contaminación o si los reactivos ya no sean útiles y sea necesario utilizar nuevos. Para la retro-transcripción y la amplificación del gen de interés se utilizó el kit comercial "Taq PCR master mix kit (QIAGEN ®)" donde se encuentran los elementos necesarios para realizar estos procedimientos.

3.5 Construcción de Bases de datos

Se organizó la información obtenida de un total de 70 sujetos de los cuales fueron 35 Controles y 35 experimentales, con ayuda del programa Excel (Microsoft ®), para que todos los resultados de los procedimientos se pudiera conocer su relevancia y realizar un análisis con más detalle para seguir avanzado con el proyecto externo.

3.6 Búsqueda de artículos de revisión y guías

En la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) y su derivado PUBMED, se realizó la búsqueda de revisiones científicas (reviews) para establecer antecedentes tanto de los daños cognitivos generados por el contagio del virus de COVID-19 y el estudio de la concentración de microARN como diagnóstico de enfermedades (10 en total), además, en las páginas principales de internet de las empresas de las cuales se adquirieron los reactivos y material necesarios, se descargaron guías para realizar los procedimientos de manera adecuada.

4. Metas alcanzadas

Durante la estancia en el Instituto Nacional de Rehabilitación LGII se realizaron diversas actividades relacionadas con los contenidos estudiados durante la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica de la UAM-Xochimilco, por ejemplo, extracciones de material genético (ADN y ARN) y proteínas, determinación de calidad, electroforesis en gel de agarosa y RT-PCR, así procesando todas las muestras de los pacientes con síntomas cognitivos post-COVID-19 y el grupo control que se tenían en ese periodo. No hubo pérdidas de muestras ya que con anterioridad se realizaron estandarizaciones para poder desarrollar todas las técnicas de la manera más adecuada y eficaz. Este proyecto externo, se mantiene en curso, ya que se espera en durante todo este año 2024, se incluya a una mayor cantidad de pacientes lo que permitirá la recopilación de una mayor cantidad de resultados y esto tendrá como resultado una mayor precisión en el diagnóstico. La experiencia brindada es muy valiosa ya que se muestra un enfoque más realista dentro del laboratorio, desde conocer la importancia de cada procedimiento, cuidado y tiempo durante los procesos de un proyecto dentro de un instituto importante en investigación, además, el

mejorar el concepto de buenas prácticas de laboratorio, manejos de equipos, aplicaciones de técnicas de biología molecular.

Siempre se trabajó con respeto y apoyo constante de parte del personal involucrado en esta investigación, lo cual permitió un correcto desenvolvimiento en el laboratorio, guiando de manera correcta, compartiendo experiencias y consejos para mejorar dentro del laboratorio. La contribución del servicio social prestado dentro del Instituto de Nacional de Rehabilitación LGII, contribuyó al desarrollo, conocimiento y establecimiento de un método que contribuirá a un mejor diagnóstico y, por tanto, mejor tratamiento, así como para enfermedades como el COVID-19 u otras enfermedades mundiales que se relacionan con el estudio de los microARN y su influencia en diversas patologías de interés nacional y mundial.

5. Conclusiones

Para la fecha acordada de finalización del servicio social, todas las actividades realizadas generaron compilaciones de las muestras con las que se contaba hasta esa fecha, (sujetos experimentales y controles); además, se consiguió la estandarización de la técnica de RT-qPCR, así como la técnica de electroforesis a partir de las muestras obtenidas de roedores con la enfermedad de Parkinson, lo cual será valioso para este estudio en el futuro inmediato, lo que implica un claro avance y fungirán como referencia para próximos proyectos.

Referencias

- Ayano, G. J. J. M. D. T. (2016). Dopamine: receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: review of literatures. *J Ment Disord Treat*, 2(120), 2.
- Bowe, B., Xie, Y., & Al-Aly, Z. (2023). Postacute sequelae of COVID-19 at 2 years. *Nature medicine*, 29(9), 2347-2357.
- Cheng, Á., Doecke, J. D., Sharples, R. A., Villemagne, V. L., Fowler, C. J., Rembach, A., ... & Hill, A. F. (2015). Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment. *Molecular psychiatry*, 20(10), 1188-1196.
- De Planell-Saguer, M., & Rodicio, M. C. (2011). Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. *Analytica chimica acta*, 699(2), 134-152.
- Gutiérrez Fidencio, M. (2018). Establecimiento de un protocolo de extracción y purificación de RNA libre de RNA ribosomal (rRNA) de la microbiota ruminal para la generación de un meta-transcriptoma por RNA-seq (Master's thesis).
- Jankovic, M., Nikolic, D., Novakovic, I., Petrovic, B., Lackovic, M., & Santric-Milicevic, M. (2023). MiRNAs as a potential biomarker in the COVID-19 infection

and complications course, severity, and outcome. *Diagnostics*, 13(6), 1091.

- Keikha, R., Hashemi-Shahri, S. M., & Jebali, A. (2023). The miRNA neuroinflammatory biomarkers in COVID-19 patients with different severity of illness. *Neurología*, 38(6), e41-e51.
- Ogonowski, N., Salcidua, S., Leon, T., Chamorro-Veloso, N., Valls, C., Avalos, C., ... & Duran-Aniotz, C. (2022). Systematic review: microRNAs as potential biomarkers in mild cognitive impairment diagnosis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 807764.
- Pabón-Martínez, Y. Vladimir. (2011). MicroARNs: una visión molecular. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43(3), 289-297. Retrieved May 14, 2024.
- Papa, L., Slobounov, S. M., Breiter, H. C., Walter, A., Bream, T., Seidenberg, P., ... & Concussion Neuroimaging Consortium (CNC). (2019). Elevations in microRNA biomarkers in serum are associated with measures of concussion, neurocognitive function, and subconcussive trauma over a single national collegiate athletic association division I season in collegiate football players. *Journal of neurotrauma*, 36(8), 1343-1351.
- Sheinerman, K. S., Tsivinsky, V. G., Crawford, F., Mullan, M. J., Abdullah, L., & Umansky, S. R. (2012). Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment. *Aging (Albany NY)*, 4(9), 590.
- Tucker, E. J., Wong, S. W., Marri, S., Ali, S., Fedele, A. O., Michael, M. Z., ... & Gleadle, J. M. (2024). SARS-CoV-2 produces a microRNA CoV2-miR-O8 in patients with COVID-19 infection. *Iscience*, 27(1).
- Shang, H., Chang, T., Yang, W., Shi, L., Hu, S., Tian, L., ... & Cui, Y. (2024). Analysis of influencing factors on long COVID in COVID-19 patients infected with omicron variant three months after discharge: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, 24(1), 36.