



# Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe de conclusión:

## **Perfil de expresión de microRNAs en sujetos con COVID largo y problemas de memoria**

Rosa María Benavides Hernández

Matricula: 2192051275

Lugar de realización del servicio:

**Instituto Nacional de Rehabilitación**

**Luis Guillermo Ibarra Ibarra**

Asesor interno

Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

Asesor externo

Dr. Alfonso Benito Alfaro Rodríguez



## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de coronavirus 2019 (COVID-19 por sus siglas en inglés) o coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2 por sus siglas en inglés), es una infección causada por un virus de ARN monocatenario, se identificó por primera vez en Wuhan, China, en 2019 (Barai et al., 2024). El COVID largo, también conocido como secuelas posagudas de la infección por SARS-CoV-2 (PASC) se refiere a la persistencia de síntomas durante al menos 12 semanas después de la fase aguda de la infección, COVID largo implica manifestaciones neurológicas que alteran la vida cotidiana, entre las que se encuentran el deterioro del pensamiento, problema de memoria, fatiga, trastornos del sueño y dolores de cabeza (Reiss A. B., et al., 2023).

En teoría, después que el SARS-CoV-2 ingresa al cuerpo humano, se estimulan diferentes tipos de células inmunes, estas células desencadenan la respuesta inmune adecuada produciendo diferentes citocinas, quimiocinas, anticuerpos, etc. Este virus puede infectar el sistema nervioso central (SNC) tras la entrada del virus por la nariz o el ojo. Las partículas virales se transmiten al bulbo olfatorio y luego al tronco del encéfalo y posteriormente a todas las partes del cerebro. Además del ataque directo a las células nerviosas, el COVID-19 puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) a través de los vasos sanguíneos y llegar al SNC. La característica principal del COVID-19 es el aumento masivo de factores proinflamatorios en la sangre, lo que se conoce como “almacenamiento de citoquinas” Esto lleva a la permeabilidad de la BHE y a la transmisión de SARS-CoV-2 y de las células inmunes periféricas. Una vez que el COVID-19 ingresa al SNC, les corresponde a los astrocitos y la microglia de combatirlo, estos están regulados por los miRNAs (Keikha R., et al., 2023).

### miRNA

Los microRNAs (miRNAs o miR) son moléculas de ARN pequeño, monocatenario que regulan la expresión genética uniéndose al ARN mensajero (ARNm) diana, evitando la traducción o iniciando su degradación, lo que es fundamental para definir la identidad celular durante el desarrollo y coordinar la actividad celular a lo largo de la vida de la célula. miRNAs constan de 21 a 23 nucleótidos de longitud pueden regular casi un tercio del genoma humano, y están involucrados en diferentes vías, como la proliferación y muerte celular, metabolismo de las grasas y resistencia al estrés. Desempeñan un papel importante en la interacción de COVID-19-huésped y en la replicación viral al unirse a la región no traducida (UTR) 3' o 5'-UTR viral o al afectar la síntesis de las proteínas asociadas al SARS-CoV-2 (Jankovic et al., 2023). Los microRNAs se han identificado en biofluidos como la sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva y lágrimas (Chorley B. N., et al., 2021).

### Papel de miRNAs en memoria

Los miRNAs para los cuales se han reportado alteraciones significativas son; miR-146a que desempeña un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmunitaria, especialmente en respuesta a la inflamación; miR-155 involucrado en la



regulación de la respuesta inflamatoria; miR-16 se ha visto implicado en procesos biológicos, como la inflamación, muerte celular programada y la respuesta inmune (Gaytan P. N., et al., 2022)

Por lo tanto en este trabajo el objetivo es obtener información sobre la expresión de miR-146a en suero humano en sujetos control con COVID largo, y utilizando miR-RNU6 como gen endógeno, debido a que el miRNA-146a antes descrito se ha visto implicado en problemas de memoria.

## **METODOLOGÍA**

### **Biofluido**

Se utilizaron 5 muestras de sangre de sujetos control con COVID largo, extraídas en octubre del 2023.

### **Extracción de suero humano**

En un tubo con anticoagulante se dejó reposar 30 min a ~25°C la muestra de sangre previamente extraída. Posteriormente se centrifugó a 2,000 xg por 10 min a 4°C, se procedió a separar el sobrenadante en tubos LoBind de 2 mL y se guardaron las muestras en el ultracongelador.

### **Extracción de RNA con Trizol en suero humano**

Se transfirieron 500 µL de suero a un tubo DNA LoBind, posteriormente se agregó 1 mL de Trizol, se incubó a 25°C por 15 min, se homogeneizó por pipeteo inmediatamente, se procedió a agregar 200 µL de cloroformo, se mezcló por inversión e incubó a 25°C por 5 min. Después se centrifugó a 12,000 xg por 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante, se agregó 500 µL de isopropanol. Se mezcla por inversión y refrigeró durante 24 h a -20°C.

Una vez pasado este tiempo se centrifugó a 12,000 xg por 20 min a 4°C, se descartó sobrenadante, se centrifugó a 16,000 xg por 2 min a 4°C, se limpió el pellet. Posteriormente, se lavó el pellet con 1 mL de etanol, se centrifugó a 10,000 xg por 10 min a 4°C se descartó sobrenadante, se repitió el lavado con etanol (dos lavados) se evaporó el etanol sin dejar que el pellet se seque demasiado y por último se resuspendió el pellet con 10 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas y posteriormente se cuantificó en el espectrofotómetro UV-Vis BioDrop, se procedió a guardar las muestras en el ultracongelador.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR)**

De acuerdo con el kit *TaqMan® Advanced miRNA Assays* (A25576, revisión C, Applied Biosystems), este kit puede detectar y cuantificar los miRNAs a partir de 5-10 ng utilizando 2 µL del ARN total, por lo tanto se realizaron las siguientes reacciones:

### **Reacción de adición de la cola de Poli (A)**

Se descongelaron las muestras y los reactivos de síntesis de cDNA en hielo, verterlos suavemente para mezclarlos completamente, luego se centrifugó



brevemente para bajar el contenido y eliminar las burbujas de aire. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se preparó suficiente mezcla de reacción de Poli (A) para el número requerido de reacciones de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 1. Master mix para la reacción de adición de la cola de Poli (A)

Reactivos	1 reacción	5 [1] reacciones
Buffer de 10X Poli (A)	0.5 $\mu$ L	2.75 $\mu$ L
ATP	0.5 $\mu$ L	2.75 $\mu$ L
Enzima Poli (A)	0.3 $\mu$ L	1.65 $\mu$ L
Agua libre de RNasa	1.7 $\mu$ L	9.35 $\mu$ L
<b>Volumen total de la Reacción de Poli (A)</b>	<b>3.0 <math>\mu</math>L</b>	<b>16.5 <math>\mu</math>L</b>

[1] los volúmenes incluyen un excedente del 10%

**Nota:** el reactivo PEG 8000 al 50% debe estar a temperatura ambiente para la reacción de ligación del adaptador.

Se llevó al vortex la mezcla de Reacción de Poli (A) para mezclar completamente el contenido, luego se centrifugó brevemente para bajar el contenido y eliminar las burbujas de aire.

Se agregó 2  $\mu$ L de muestra a cada pozo de la placa de reacción de 96 pocillos, luego se transfirió 3  $\mu$ L de Mezcla de Reacción de Poli (A) a cada pozo. El volumen total debe ser de 5  $\mu$ L por pozo. Se selló la placa de reacción, se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente la placa y posteriormente se colocó la placa en el StepOne Plus con las siguientes condiciones:

Tabla 2. Condiciones utilizadas en el termociclador para la reacción de adición de la cola de Poli (A)

Paso	Temperatura	Tiempo
Poliadenilación	37°C	45 minutos
Detener la reacción	65°C	10 minutos
Hold	4°C	30 minutos

**Nota:** proceder inmediatamente a la siguiente reacción.

### Reacción de ligación del adaptador

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se preparó la suficiente mezcla de reacción para el número requerido de reacciones, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 3. Master mix para la reacción de ligación del adaptador

Reactivos	1 reacción	5 [1] reacciones
Buffer de ligasa de DNA al 5X	3 $\mu$ L	16.5 $\mu$ L
PEG 8000 50%	4.5 $\mu$ L	24.75 $\mu$ L
Adaptador de Ligación al 25X	0.6 $\mu$ L	3.3 $\mu$ L
Ligasa RNA	1.5 $\mu$ L	8.25 $\mu$ L



Agua libre de RNasa	0.4 µL	2.2 µL
Volumen total de la reacción de ligación	10 µL	55 µL

[1] los volúmenes incluyen un excedente del 10%

Se llevó al vortex y se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto, se transfirieron 10 µL de la Mezcla de Reacción de Ligación a cada pozo de la placa de reacción que contiene el producto de cola de Poli (A). El volumen total debe ser de 15 µL por pozo. Se selló la placa de reacción, se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente la placa y posteriormente se colocó la placa en el StepOne Plus con las siguientes condiciones:

Tabla 4. Condiciones utilizadas en el termociclador para la reacción de ligación del adaptador

Paso	Temperatura	Tiempo
Ligación	16°C	60 minutos
Hold	4°C	30 minutos

**Nota:** proceder inmediatamente a la siguiente reacción.

### Reacción de Transcripción Inversa (RT)

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se preparó la suficiente mezcla de reacción para el número requerido de reacciones, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 5. Master mix para la reacción de transcripción inversa

Reactivos	1 reacción	5 [1] reacciones
Buffer RT 5X	6 µL	33 µL
dNTP Mix	1.2 µL	6.6 µL
Primer RT Universal 20X	1.5 µL	8.25 µL
Enzima Mix RT 10X	3 µL	16.5 µL
Agua libre de RNasa	3.3 µL	18.15 µL
Volumen total de la reacción de RT	15 µL	82.5 µL

[1] los volúmenes incluyen un excedente del 10%

Se llevó al vortex y se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto, transferir 15 µL de la Mezcla de Reacción de RT a cada pozo de la placa de reacción que contiene el producto de la reacción de ligación del adaptador. El volumen total debe ser de 30 µL por pozo. Se selló la placa de reacción, se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente la placa y posteriormente se colocó la placa en el StepOne Plus con las siguientes condiciones:

Tabla 6. Condiciones utilizadas en el termociclador para la reacción de transcripción inversa

Paso	Temperatura	Tiempo
Transcripción inversa	42°C	15 minutos
Detener la reacción	85°C	5 minutos
Hold	4°C	Hold



**Nota:** almacena el producto de la reacción RT hasta por 2 meses a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Reacción de miR-Amp

En un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, se preparó la suficiente mezcla de reacción para el número requerido de reacciones, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 7. Master mix para la reacción de miR-Amp

Reactivos	1 reacción	5 [1] reacciones
Master mix miR-Amp 2X	25 $\mu\text{L}$	137.5 $\mu\text{L}$
Mix Primer miR-Amp 20X	2.5 $\mu\text{L}$	13.75 $\mu\text{L}$
Agua libre de RNasa	17.5 $\mu\text{L}$	96.25 $\mu\text{L}$
<b>Volumen total de la mezcla de reacción de miR-Amp</b>	<b>45 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>247.5 <math>\mu\text{L}</math></b>

[1] los volúmenes incluyen un excedente del 10%

Se llevó al vortex y se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto, se transfirieron 45  $\mu\text{L}$  de la Mezcla de Reacción de miR-Amp a cada pozo de la placa de reacción. Se agregó 5  $\mu\text{L}$  del producto de la reacción de RT a cada pozo de la reacción. El volumen total debe ser de 50  $\mu\text{L}$  por pozo. Se selló la placa de reacción, se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente la placa y posteriormente se colocó la placa en el StepOne Plus con las siguientes condiciones:

Tabla 8. Condiciones utilizada en el termociclador para la reacción de miR-Amp

Paso	Temperatura	Tiempo
Activación de la enzima	$95^{\circ}\text{C}$	5 minutos
Desnaturalización	$95^{\circ}\text{C}$	3 segundos
Alineamiento	$60^{\circ}\text{C}$	30 segundos
Detener la reacción	$99^{\circ}\text{C}$	10 minutos
Hold	$4^{\circ}\text{C}$	10 minutos

**Nota:** almacenar el producto de la reacción de miR-Amp no diluido a  $-20^{\circ}\text{C}$  por hasta 2 meses.

### Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)

El volumen total para las reacciones es de 20  $\mu\text{L}$ . Se descongelaron los reactivos en hielo, se agitó suavemente para mezclar completamente y luego se centrifugó por 1000 rpm durante 1 minuto para bajar el contenido y eliminar las burbujas de aire. Se preparó una dilución 1:10 de cDNA, se agitó suavemente el frasco de Taqman Fast Advanced Master Mix para mezclar completamente el contenido, NO se invirtió



la botella. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se preparó suficiente mezcla de reacción de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 9. Master mix para la reacción de qPCR

Reactivos	1 reacción	5 [1] reacciones
TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X)	10 µL	55 µL
miR-146a	1 µL	5.5 µL
Agua libre de RNasa	4 µL	22 µL
<b>Volumen total de la Master Mix de PCR</b>	15 µL	82.5 µL

[1] los volúmenes incluyen un excedente del 10%

Se llevó al vortex el tubo de la master mix para mezclar completamente y luego centrifugar a 1000 rpm durante 1 minuto para bajar el contenido y eliminar las burbujas de aire. Se transfirieron 15 µL de la mezcla de reacción de PCR a cada pozo de la placa de 96 pocillos y 5 µL del cDNA diluido, el volumen total debe ser de 20 µL por pocillo Como gen endógeno se utilizó el miR-RNU6, utilizando las mismas condiciones con miR-146a, realizando un triplicado y un control sin plantilla (NTC por sus siglas en inglés) por cada muestra de los 5 sujetos teniendo un total de 36 pozos.

Se selló la placa de reacción, se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente y posteriormente se colocó en el StepOne Plus con las siguientes condiciones:

Tabla 10. Condiciones utilizadas en el termociclador para la reacción de qPCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la enzima	95°C	20 segundos	1
Desnaturalización	95°C	1 segundo	40
Alineamiento	95°C	20 segundos	

## Electroforesis

Se agregó .5 g de agarosa en 50 mL de Buffer TAE 10X hasta la completa disolución, se añadieron 2 µL de naranja de acridina 10%, se deja solidificar, se colocó en la cámara de electroforesis las muestras, añadiendo 4 µL de muestra y 1 µL de Trackit Orange Loading Buffer.

## RESULTADOS

### Extracción de RNA con Trizol en suero humano

Al pellet obtenido de la extracción de ARN, se le agregó 10 µL de agua libre de RNasas y DNasas. Los resultados obtenidos de cuantificar en el BioDrop en octubre de 2023 en los 5 sujetos control fueron los siguientes:



Tabla 11. Resultados obtenidos de cuantificar el ARN en el BioDrop en octubre del 2023.

Sujeto	A260	A260/280	Concentración (ng/ $\mu$ L)
S1	0.263	1.80	10.5
S2	0.877	1.80	35.1
S3	0.676	1.80	27
S4	0.873	1.83	34.9
S5	0.785	1.82	31.4

Se descongelaron las muestras y se volvió a medir en el BioDrop en septiembre del 2024.

Tabla 12. Resultados obtenidos de cuantificar el ARN en el BioDrop en septiembre del 2024.

Sujeto	A260	A260/280	Concentración (ng/ $\mu$ L)
S1	0.034	1.327	12.98
S2	0.045	1.304	34.29
S3	0.034	1.342	25.11
S4	0.045	1.341	31.46
S5	0.045	1.364	29.98

## Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR)

Los valores obtenidos de la tabla 13 se obtuvieron por la concentración que requiere el kit, 5 ng/ $\mu$ L, y menciona que se debe agregar 2  $\mu$ L del ARN total. En la siguiente tabla se muestran los volúmenes a utilizar por cada muestra y agua libre de DNAsas y RNAsas.

Tabla 13. Volumen a utilizar de RNA total y agua libre de RNAsas y DNAsas para cada muestra.

Sujeto	Concentración (ng/ $\mu$ L)	Volumen del RNA total ( $\mu$ L)	Volumen de agua libre de RNAsas y DNAsas ( $\mu$ L)
S1	12.98	0.77	1.23
S2	34.29	0.30	1.70
S3	25.11	0.40	1.60
S4	31.46	0.32	1.68
S5	29.98	0.33	1.67

Se obtuvo el cDNA de acuerdo a las reacciones establecidas en el kit *TaqMan® Advanced miRNA Assays* (A25576, revisión C, Applied Biosystems).



## Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)

Los resultados obtenidos del qPCR en el StepOne Plus fueron los siguientes. Se obtuvo la gráfica de amplificación.

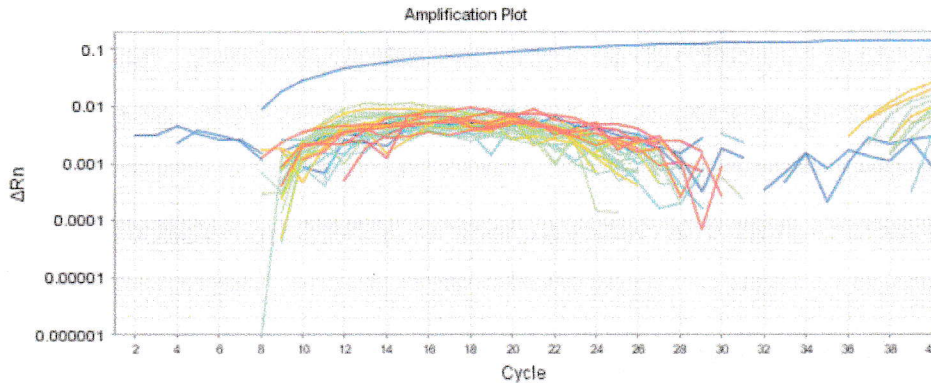


Imagen 1. Gráfica de amplificación de miR-146a y miR-RNU6.

## Electroforesis

Se corrió el gel a 80 V durante 40 minutos, de acuerdo a la tabla 14 obteniendo la siguiente imagen:

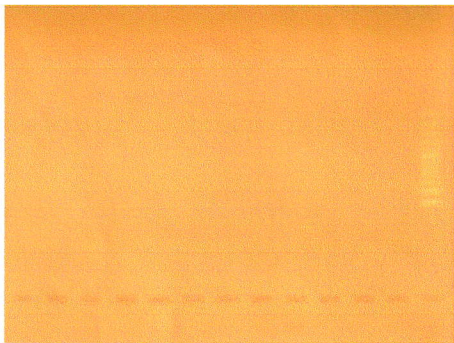


Imagen 2. Gel de agarosa del estándar de ADN 100 pb (pozo 1, derecha) cDNA diluido de las 5 muestras (pozo 2-6, derecha a izquierda) y miRNA 146a (pozo 7-11, derecha a izquierda) y NTC (pozo 12).

Tabla 14. Orden utilizado en el gel de agarosa.

Pozo	Muestra	Pozo	Muestra	Pozo	Muestra
1	Estándar de ADN 100 pb	5	cDNA diluido S4	9	miRNA 146a S3
2	cDNA diluido S1	6	cDNA diluido S5	10	miRNA 146a S4
3	cDNA diluido S2	7	miRNA 146a S1	11	miRNA 146a S5
4	cDNA diluido S3	8	miRNA 146a S2	12	NTC

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 13, se observa que en el transcurso de un año el ARN se degradó, según Seelenfreund et al., el ARN es altamente lábil y se degrada rápidamente si se almacena en condiciones inadecuadas, la temperatura a la que se debe almacenar es a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  o en nitrógeno líquido para evitar reacciones degradativas, por ejemplo las RNasas que



degradan enzimáticamente el ARN acuoso son casi ubicuas en todas las células y son una amenaza constante de contaminación y degradación de ARN purificado.

En el laboratorio de Neurociencias Básica, los ultracongeladores presentaron fallas a partir de noviembre del 2023, además de problemas en la corriente eléctrica en el edificio de Investigación, se asume que podría ser una de las posibles causas que se haya degradado el RNA y sumando que el BioDrop presenta fallas desde enero del 2024, por lo tanto los resultados obtenidos no son confiables.

Los resultados obtenidos en la qPCR se puede observar en la imagen 1 que no amplificaron los miR-146a y miR-RNU6, debido a que el ARN está degradado y que la concentración utilizada es muy baja, por lo tanto se recomienda que en los siguientes experimentos se utilice una concentración mayor a los 5 ng/μL y para comprobar los resultados obtenidos se realizó el gel de agarosa que se observa en la imagen 2, mostrando únicamente el estándar de ADN 100 pb.

## **CONCLUSIÓN**

No se logró identificar la presencia o ausencia del miR-146a en muestras de suero de sujetos control con COVID largo en concentración de 5 ng/μL de ARN total.



## BIBLIOGRAFÍA

Chorley B. N., Atabakhsh E., Doran G., Gautier J. C., Ellinger. Ziegelbauer H., Jackson D., Sharapova T. et al., (2021). Methodological considerations for measuring biofluid-based microRNA biomarkers. *Critical reviews in toxicology*, 51 (3), 264-282. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8577439/>

Gaytán P. N., Ibáñez S. A., Herrera V. O., Oropeza V., J. J., Magaña A., M., López, J., Monárrez E. J., y López H., (2022). miR-146a, miR-221, and miR-155 are Involved in Inflammatory Immune Response in Severe COVID-19 Patients. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 13(1), 133. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9818442/#app1-diagnostics-13-00133>

Jankovic M., Nikolic D., Novakovic I., Petrovic B., Lackovic M. y Santric-Milicevic M. (2023). miRNAs as a Potential Biomarker in the COVID-19 Infection and Complications Course, Severity, and Outcome. *Diagnostics*, 13 (6), 1091. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10047241/>

Keikha R., Hashemi-Shahri SM., Jebali A. (2023). The miRNA neuroinflammatory biomarkers in COVID-19 patients with different severity of illness. *Neurología* 38. <https://sciencedirect.uam.elogim.com/science/article/pii/S2173580823000354>

Khan Z. U., Montañez E. M., Lobato I. N., Muly E. C. (2014). Chapter one: Memory Deficits in Aging and Neurological disease. *Progress in molecular biology and translational science*, 124, 1-29. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124201705000015?via%3Dihub>

Reiss A. B., Greene C., Dayaramani C., Rauchman S. H., Stecker M., De Leon J., Pinkhasow A. (2023). Long COVID, the Brain, Nerves, and Cognitive Function. *Neurology International*, 15 (3), 821-841. <https://www.mdpi.com/2035-8377/15/3/52>

Seelenfreund E., Robinson W., Amato C., Choon T., Kim J., y Robinson S. (2014). Long term storage of dry versus frozen RNA for next generation molecular studies. *Plos one*, 9(11), e111827. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4224406/>