

TRABAJO DE FINAL DE GRADO

*Aislamiento de microARNs en
muestras biológicas: potenciales
biomarcadores epigenéticos de la
COVID-19*

GRADO EN FARMACIA

Universidad de La Laguna

2022-2023

Alumna:

Candela Sirvent Blanco

Tutores:

Dr. Alexis Manuel Oliva

Dra. Aída Elizabeth Córdoba Lanús

AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a mi co-tutora, la Dra. Elizabeth Córdoba Lanús por su valioso asesoramiento y orientación a lo largo de este proyecto. A los compañeros de laboratorio; Angélica, Malena, Omar y Natalia por su gran ayuda y por hacer del ambiente de laboratorio un lugar más divertido, siempre tendré el buen recuerdo de “la hora del cafecito”. Ha sido un placer compartir esta última etapa del grado con ustedes.

Además, quiero agradecer al Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias por brindarme acceso a los recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto.

A mis amigos, por su gran apoyo y su amistad durante mi trayectoria académica. Gracias por su paciencia y disposición para escucharme cuando necesitaba desahogarme, y también por celebrar mis logros como si fuesen suyos.

A mi madre, por el apoyo incondicional que me ha dado siempre, por su confianza en mí incluso en aquellos momentos que más he dudado de mí misma. Agradezco profundamente el tiempo y el esfuerzo que ha invertido en mi educación. Por su sacrificio y dedicación que han sido ejemplos inspiradores de perseverancia y determinación. Gracias por estar siempre para escucharme y brindarme un sabio consejo.

Por último, también quiero agradecer a mi familia, en especial a mi abuela Mary por mostrar siempre entusiasmo e interés en todos mis proyectos, esto me impulsa a luchar por mis sueños. A mi tía María y mi tío Adolfo por ayudarme a superar todos los obstáculos que se me interpongan y conseguir mis propósitos. Gracias a todos por acompañarme durante esta etapa y siempre estar dispuestos a ayudarme.

Índice.

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIAL Y MÉTODOS.	8
4.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS.	8
4.2 EXTRACCIÓN DE ARN.	8
4.3 RETROTRANSCRIPCIÓN.	9
4.4 PCR EN TIEMPO REAL (qPCR).	10
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	13
5 RESULTADOS	14
5.1 EXTRACCIÓN DE miARNs Y RETROTRANSCRIPCIÓN.	14
5.2 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs POR qPCR. VALIDACIÓN.	16
6 DISCUSIÓN.	19
7 CONCLUSIONES.	21
8 BIBLIOGRAFÍA.	22

ABREVIATURAS.

- Kb: kilobases.
- ARN: ácido ribonucleico.
- ACE2: receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
- qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
- RT: retrotranscripción.
- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.
- Ct: ciclo umbral
- AUC: área bajo la curva.

ABSTRACT

The SARS-CoV2 global pandemic had an impact on public health and has opened up new ways to study. In this context, microRNAs have emerged as potential biomarkers for disease detection and understanding pathogenesis. MicroRNAs are small molecules of genetic material with the ability to regulate gene expression. It has been shown that miRNAs may be altered in some diseases, including COVID-19.

In the present study, miRNAs were isolated from saliva and serum samples of COVID-19 cases using a commercial kit. Then a real-time qPCR was performed to confirm the correct extraction of microRNAs by amplifying stable reference miRNAs. In addition, miRNAs profiles expression were analyzed in serum and saliva samples from patients with viral infection (17 subjects) and compared with a control group (9 subjects) without infection.

The results showed an efficient extraction of microRNAs for all the serum samples analyzed and for the 70% of saliva. A differential expression of miR-1246, which has been associated with virus pathogenesis, in serum samples was observed between cases and controls. On the other hand, in saliva samples, a significant overexpression of miR-3195, was observed in COVID-19 cases.

In conclusion, miRNAs are efficiently isolated from serum, while an improvement in the collection method and isolation protocol must be made for their isolation in saliva samples. Our preliminary results suggest miR-1246 (in serum) and miR-3195 (in saliva) as potential diagnostic biomarkers of COVID-19 suggesting it's possible role in the development of the disease.

1. RESUMEN

La pandemia provocada por SARS-CoV-2 ha generado un impacto en salud pública y ha abierto nuevas ventanas de investigación. En este contexto, los microARNs han surgido como posibles biomarcadores para la detección de la enfermedad y la comprensión de la patogénesis. Los microARNs son pequeñas moléculas de material genético con capacidad para regular la expresión de genes de forma endógena. Se ha demostrado que los miARNs pueden estar alterados en diversas enfermedades, incluido el COVID-19.

En el presente estudio, los microARN fueron aislados de muestras de saliva y suero en pacientes con COVID-19 utilizando un kit comercial. Después, se realizó la técnica de

qPCR para confirmar la correcta extracción de los microARNs a través de la amplificación de miARNs estables. Además, se analizaron los perfiles de expresión de miARNs en muestras de suero y saliva de pacientes infectados (17 sujetos) en comparación con el grupo control (9 sujetos) sin infección.

Los resultados revelaron una eficiente extracción de microARNs en todas las muestras de suero analizadas, y un 70% en muestras de saliva. En las muestras de suero, se encontraron diferencias significativas en la expresión de miR-1246, el cual se ha relacionado con la patogénesis viral. Por otro lado, en las muestras de saliva se observó una sobreexpresión significativa del miR-3195 en los casos de COVID-19.

En conclusión, los microARNs se aíslan eficientemente en suero, mientras que en las muestras de saliva se debe mejorar el método de recolección y el protocolo de asilamiento. Los resultados preliminares sugieren los miR-1246 (en suero) y miR3195 (en saliva) como potenciales biomarcadores de COVID-19, dada su posible implicación en el desarrollo de la enfermedad.

2. INTRODUCCIÓN

El brote en 2019 de la enfermedad COVID-19 (del inglés, *Coronavirus Disease 2019*), en Wuhan, China, se convirtió en una pandemia global con graves repercusiones en el ámbito de salud pública, la sociedad y la economía. (1)

Se identificó como agente causal al virus SARS-CoV-2, perteneciente a la familia *Coronaviridae*, específicamente a la subfamilia *Orthocoronaviridae*, del género *Betacoronavirus*. Su genoma es de 26-32 kilobases (Kb) compuesto por ARN monocatenario de polaridad positiva. Éste codifica el material necesario para permitir la replicación del virus en la célula huésped (2, 3, 4).

La sintomatología de la enfermedad varía ampliamente desde casos asintomáticos, hasta cuadros respiratorios agudos y potencialmente mortales, ya que existe una gran heterogeneidad interindividual. La principal vía de transmisión es mediante aerosoles, pequeñas gotas en suspensión que acceden al organismo a través de la boca y fosas nasales. El mecanismo patogénico se centra en la proteína S, ubicada en la superficie del virus que, tras su hidrólisis mediante proteasas, se escinde en dos fragmentos: el fragmento S2 que permite la entrada a la célula huésped y el S1 implicado en la activación del receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). El receptor ACE2 se

expresa en diferentes tejidos como el aparato cardiovascular, el tracto respiratorio inferior, los riñones, y también en el tejido gastrointestinal (2, 4).

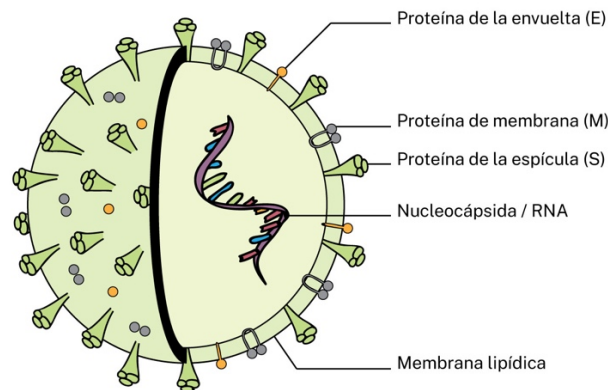


Figura1. Estructura del SARS-CoV2. Adaptado de: ADNInstitut

La investigación acerca de la patogenia viral y su detección ha sido fundamental en la resolución de la pandemia. Esto ha permitido afrontar la amenaza que supuso el SARS-CoV-2 a la población, enfocándose en el estudio de posibles biomarcadores que permitan el diagnóstico de la enfermedad, así como prevenir la progresión de ésta hacia formas más severas. (5)

Los microARNs son pequeñas moléculas de ARN monocatenario de polaridad positiva (18 a 22 nucleótidos). Estas moléculas están presentes en el genoma, pero no son codificantes; no obstante, son un componente epigenético endógeno que destaca por su capacidad de regular la expresión génica (6, 7). Los microARNs son capaces de unirse específicamente al ARNm interfiriendo directamente en la traducción a proteínas. Estas moléculas de material genético están implicadas en procesos biológicos como la apoptosis, la diferenciación celular y el desarrollo tisular (6, 7, 8). En el organismo se encuentran en diversos tejidos y fluidos corporales, como el suero y la saliva (9). Actualmente, se estudia su uso como posibles biomarcadores de diferentes patologías, por ejemplo, el cáncer, la osteoporosis, enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus tipo 2. (7, 8)

Los estudios sobre microARNs como biomarcadores de la COVID-19 se han realizado sobre todo en relación con las formas severas de la enfermedad. Es posible que aquellos pacientes que presentan cuadros agudos expresen ciertos microARNs que

promuevan la patogénesis viral, mientras que otras formas leves presenten perfiles capaces de frenarla (10).

3. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este estudio son los siguientes:

- Comparar el rendimiento de la extracción de microARNs a partir de diferentes tejidos (suero y saliva) de individuos con COVID-19.
- Validar la eficiencia de la extracción mediante la determinación de la expresión de microARNs estables (o de referencia) en cada tipo de tejido por qPCR.
- Determinar la expresión de ciertos microARNs potencialmente desregulados en suero y saliva que puedan ser útiles como biomarcadores de la enfermedad.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS.

Para el presente trabajo, se incluyeron muestras biológicas de un total de 17 sujetos con diagnóstico positivo de COVID-19 mediante PCR. Se incluyeron de cada individuo dos tipos de muestras de diferentes tejidos: suero y saliva (**Tabla 1**). También se seleccionaron muestras de 9 sujetos control, con diagnóstico negativo de COVID-19 y sin infección viral reportada en los dos meses previos. Todas las muestras fueron conservadas a una temperatura de -20°C para impedir la degradación del material genético, hasta su posterior análisis.

Tabla 1. Muestras biológicas incluidas en el estudio de cada grupo de estudio.

<i>Tipo de muestra</i>	<i>Casos COVID-19 (n)</i>	<i>Individuos control (n)</i>
<i>Suero</i>	17	9
<i>Saliva</i>	17	9

4.2 EXTRACCIÓN DE ARN.

Los microARNs se extrajeron a partir de las muestras biológicas utilizando el kit comercial miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizaron de partida 200 µL de muestra tanto de suero, como de saliva.

Para el proceso de extracción, se añadió el tampón de lisis a la muestra para romper las membranas celulares y que el material genético quede desprotegido. Después, se centrifugó para separar los fragmentos de componentes celulares más pesados. A continuación, se extrajeron 200 μL del sobrenadante que se transfirieron a una columna de centrifugación, y se realizaron varios lavados con etanol con el fin de que precipiten los ácidos nucleicos. Finalmente, el ARN retenido en la membrana se eluyó con 20 μL de agua libre de nucleasas y se cuantificó por medio de espectrometría utilizando el equipo Nanodrop lite (ThermoFisher). Esta técnica utiliza la absorbancia de luz por una muestra a una longitud de onda específica (260 nm) que se correlaciona mediante la ecuación Lambert-Beer con la concentración de miARN presente expresada en $\text{ng}/\mu\text{L}$. Se evaluó la calidad mediante la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}), ésta debe de ser superior a 1,5-1,8. La lectura de absorbancia a 280 nm proporciona información acerca de la presencia de contaminantes, como proteínas o etanol. Luego, se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.

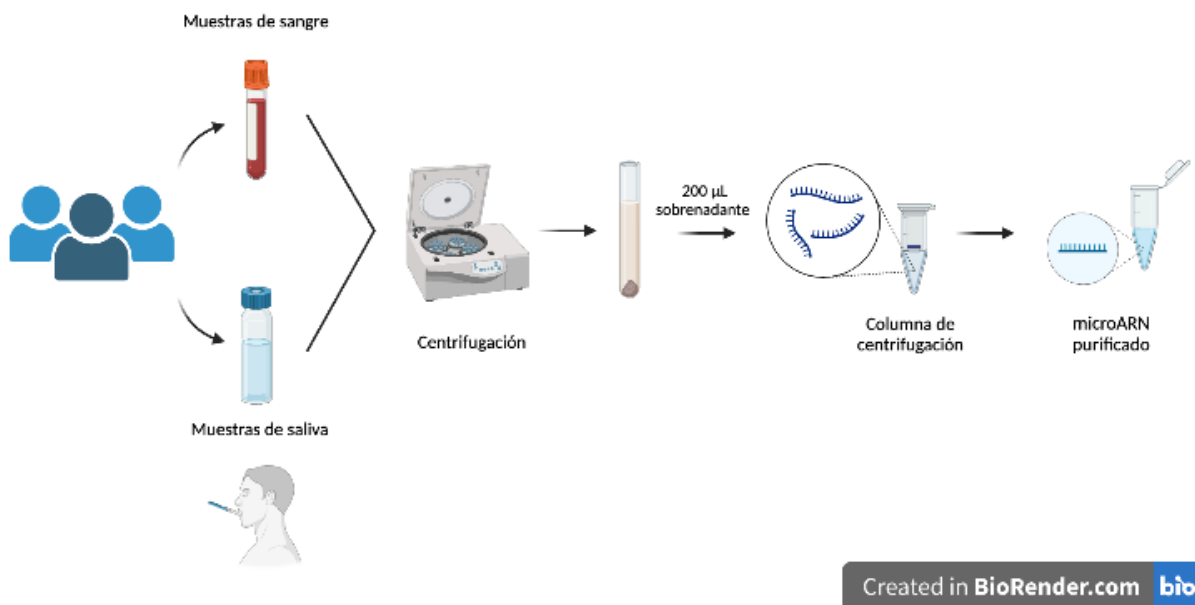


Figura 2. Esquema del proceso de extracción de microARNs de las muestras de estudio. **Creado en:** Biorender.

4.3 RETROTRANSCRIPCIÓN.

A continuación, se procedió con la reacción de retrotranscripción que consiste en la reacción catalizada por una enzima tipo ADN-polimerasa conocida como transcriptasa inversa con el fin de obtener ADNc a partir de ARN. Para este proceso se usó el kit

comercial miRCURY LNA RT kit (QIAGEN). La reacción se llevó a cabo en un termociclador del modelo ProFlex (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción utilizadas se detallan a continuación (**Tabla2**) y los procesos implicados en la retrotranscripción (**Tabla3**).

Tabla 2. Detalle de los reactivos empleados en la reacción de retrotranscripción.

Reactivos	Volumen por reacción (μl)
<i>10X Tampón de RT</i>	2
<i>25X mezcla de dNTPs (100mM)</i>	0,8
<i>10X Cebadores Random</i>	2
<i>Transcriptasa MultiScribe™ Reverse</i>	1
<i>H₂O libre de nucleasas</i>	4,2
<i>Volumen total</i>	10

Los volúmenes que se muestran son para una reacción. A partir de esta mezcla se dispensó 10 μ l a cada tubo.

Tabla 3. Condiciones de termociclado de la reacción de retrotranscripción.

Proceso	Tiempo	Temperatura
<i>Incubación</i>	60 min	62°C
<i>Inactivación enzimática</i>	5 min	95 °C

Una vez finalizada la reacción se cuantificó el ADNc obtenido como el mismo método descrito en el punto **3.2**.

4.4 PCR EN TIEMPO REAL (qPCR).

Los microARNs a analizar en este trabajo fueron seleccionados a partir de un estudio piloto realizado por el grupo de investigación, en el que se determinó la expresión diferencial de miARNs en pacientes con COVID-19 leve o asintomáticos, mediante una técnica de secuenciación masiva, Next Generation Sequencing (NGS). Esta técnica permitió detectar aquellos miARNs que se expresan de manera estable en cada tipo de tejido (suero o saliva), y, por tanto, que se pueden utilizar como instrumento de comprobación de la correcta amplificación del ADNc obtenido en las muestras de suero

y saliva incluidas. Se detectaron alrededor de 150 microARNs desregulados, de los cuales 18 microARNs en muestras de suero y 1 microARN en muestras de saliva cumplían los criterios estrictos necesarios para considerar una diferencia de expresión significativa ($p > 0.001$ y $FDR < 0.05$) entre casos COVID-19 y controles, como candidatos de validación por qPCR (trabajo presentado en las Jornadas CIBERINFEC-CIBERES, Madrid, 2023).

La qPCR es una técnica de biología molecular, altamente sensible, utilizada para detectar secuencias específicas. También, permite cuantificar los niveles de expresión génica y realizar un análisis comparativo de las expresiones relativas entre dos grupos. Existe un parámetro de medida conocido como ciclo umbral (Ct) que aporta información acerca de los ciclos necesarios para que la muestra amplificada alcance un umbral de detección cuya señal sea significativamente superior al ruido de fondo. Por consiguiente, este valor depende principalmente de la cantidad de ADN inicial.

En el presente trabajo, se realizó:

1. Una qPCR en tiempo real para comprobar la eficiencia de extracción en cada tipo de muestra. Para ello, se utilizaron microARNs que se expresan de manera estable, es decir, aquellos genes cuya expresión sea relativamente constante en cada tipo de muestras y presenten menor desviación estándar. Estos genes son de gran relevancia para la normalización de los datos y la comparación de las expresiones génicas. Estos fueron miR-26a-5p en suero y miR-3195 en saliva.
2. Además, se evaluó la utilidad de dos posibles microARNs (uno en suero y otro en saliva) como biomarcadores de la enfermedad. Para ello, se comparó la expresión de un gen candidato respecto a uno de referencia (gen de expresión estable). En este estudio, se determinó la expresión relativa de los miARNs: miR-1246 en suero junto a miR-26a-5p como referencia, así como la expresión de miR-3195 en muestras de saliva junto a miR345-5p como referencia. La validación se realizó en el grupo de sujetos con COVID-19 y sujetos control incluidos en este trabajo.

Para la reacción de qPCR se utiliza el kit miRCURY LNA Sybr Green PCR Master Mix (QIAGEN Inc, Alemania) en una mezcla de reacción final de 10 μ l, que contiene: los cebadores específicos a 200nmol/L, 1X de la enzima polimerasa y el fluorocromo, y 3ng de la muestra de ADNc a amplificar. El compuesto químico SYBR Green, actúa como fluorocromo que se intercala en las moléculas de ADN pudiendo indicar la cantidad de material genético amplificado a través de fluorescencia. Los reactivos utilizados se recogen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Reactivos utilizados en la reacción de qPCR

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen por reacción (µl)</i>
Tampón con SYBER + ROX	5,5
<i>Cebadores</i>	0,5
<i>H₂O libre de nucleasas</i>	1
<i>ADN molde</i>	3
<i>Volumen total</i>	10

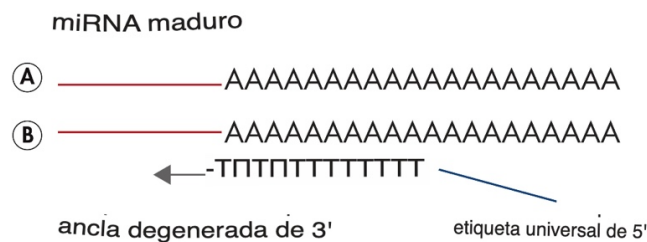
La reacción de qPCR se realiza en un termociclador StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystem, USA) en las siguientes condiciones (**Tabla 5**):

Tabla 5. Condiciones de reacción de la qPCR para la determinación de la expresión génica.

<i>Proceso</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
<i>Desnaturalización ADN</i>	15 min	95°C
<i>Desnaturalización ADN</i>	15 seg	94 °C
<i>Hibridación de cebadores</i>	30 seg	55 °C
<i>Amplificación secuencia</i>	30 seg	72 °C

40 CICLOS

Etapa 1: Síntesis de la primera hebra (RT)



Etapa 2: Amplificación por PCR en tiempo real

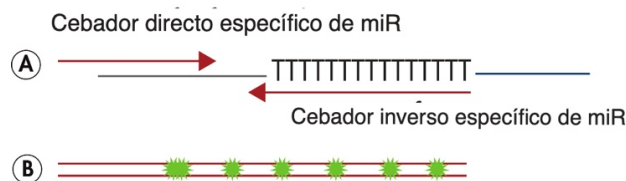


Figura 3. Reacción de 1- Retrotranscripción y 2-qPCR para la amplificación de miRNAs específicos utilizando SybrGreen. Adaptado de: Ensayos LNA RT miRCURY microARN (QIAGEN)

En primer lugar, se realizaron las qPCR con miARNs de expresión estable para comprobar la amplificación del ADNc y posteriormente utilizarse como referencia para la normalización de los datos. Luego, se procedió a trabajar con miARNs diana. Se utiliza un ensayo específico que contiene la pareja de cebadores para detectar un microARN singular en cada reacción (**Figura 2**). En la **Tabla 6** y **Tabla 7** se muestran los ensayos comerciales escogidos para la amplificación de los miARNs diana.

Tabla 6. miARNs estudiados en muestras de suero.

<u>SUERO</u>	
<i>Gen de referencia</i> miR-26a-5p	Referencia del ensayo (Quiagen) YP00206023
<i>Gen diana</i> miR-1246	YP00205630

Tabla 7. miARNs estudiados en muestras de saliva

<u>SALIVA</u>	
<i>Gen de referencia</i> miR-345-5p	Referencia del ensayo (Quiagen) YP00206006
<i>Gen diana</i> miR-3195	YP02100869

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

A continuación, para determinar los valores de expresión relativa de cada miARN estudiado se utilizó el método $\Delta\Delta Ct$ que permite comparar la variación de la expresión del gen de interés con respecto al gen de referencia. Se aplica la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct (\text{muestra}) = Ct (\text{gen de interés}) - Ct (\text{gen de referencia})$$

Tras la comparación de los Ct en estudio, se obtiene una ratio de expresión entre ambos miARNs al que se le aplica logaritmo para la normalización de los datos para disminuir su dispersión (9). Después, se realiza el análisis de los datos para estudiar la expresión génica relativa aplicando la siguiente ecuación:

$$\Delta Ct - 2Ct.$$

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS Statistics v.26 asumiendo un valor de significación de $p < 0,05$ en cada prueba.

Se utilizó la prueba estadística t-Student o la no paramétrica Mann-Whitney U, según la normalidad en la distribución de los datos, para determinar si existen diferencias significativas en la expresión génica de dos grupos de estudio, casos de COVID-19 frente a controles negativos.

Además, se empleó el análisis de curvas ROC (*del inglés*, Receiver Operating Characteristic) para evaluar la utilidad de los microARNs como biomarcadores. Esta herramienta estadística proporciona una representación gráfica de la sensibilidad y la especificidad a diferentes porcentajes. En la que la sensibilidad (verdaderos positivos) conforma el eje Y, mientras que la especificidad (falsos positivos) se representa en el eje X. En este estudio, las curvas ROC se construyeron a partir de los resultados de expresión obtenidos de los microARNs en muestras de suero y de saliva en los dos grupos de estudio: individuos positivos y negativos para SARS-CoV2. El área bajo la curva (AUC) (*del inglés*, *area under the curve*) ROC es una medida cuantitativa que permite conocer la eficacia de la prueba diagnóstica, es decir, la capacidad discriminativa de la prueba. Un valor de AUC cercano a 1 indica que la prueba diagnóstica tiene una alta capacidad discriminativa. Sin embargo, valores cercanos a 0,5 significa que la prueba está aleatorizada.

5 RESULTADOS

5.1 EXTRACCIÓN DE miARNs Y RETROTRANSCRIPCIÓN.

Después del aislamiento de los miARNs, se determinó tanto la cantidad, como la calidad mediante espectrometría. Los resultados de concentración y pureza de miARNs obtenidos de las muestras de suero y saliva, tanto de pacientes positivos en COVID-19 como de controles negativos, se recogen en la **Tabla 8** y **Tabla 9**.

En cuanto al rendimiento de extracción de microARNs en muestras de saliva y suero, se consiguieron cantidades e índice de pureza similares entre los dos tipos de muestra, sin embargo, el índice de pureza es ligeramente mayor en muestras de saliva, ya que se encuentra en un rango entre 1,1-1,71, mientras que en las de suero está entre 0,62-1,24.

Tabla 8. Resultados de la extracción de miARN en muestras de suero.

Muestras COVID-19		
<i>Nº de muestra</i>	<i>Concentración (ng/uL)</i>	<i>Pureza (abs 260/280)</i>
204	14,4	0,77
205	11,3	0,77
207	14,4	0,89
211	9,6	0,78
223	12,1	0,95
224	16	1,03
225	19	0,85
226	14,6	1,01
228	11,3	0,84
230	11,3	0,91
233	13,6	0,78
236	12,5	0,63
237	11,3	0,98
239	15,1	0,66
241	10,5	0,62
244	25,6	1,14
246	24	1,17
Muestras control		
<i>Nº de muestra</i>	<i>Concentración (ng/uL)</i>	<i>Pureza (abs 260/280)</i>
7255	11,8	0,93
7258	14,9	1,24
7464	6,5	0,84
7465	3,3	0,75
7470	15,1	0,99
8023	8,1	0,81
8024	8	0,56
8524	7,2	0,91
4259	17	0,94

Tabla 9. Resultados de la extracción de miARNs en muestras de saliva.

Muestras COVID-19		
<i>Nº de muestra</i>	<i>Concentración (ng/uL)</i>	<i>Pureza (abs 260/280)</i>
204	16,2	1,48
205	7,8	1,22
207	16,8	1,35
211	10,7	1,31
223	5,3	1,25
224	9	1,22
225	7,7	1,61
226	10	1,2
228	10,6	1,4
230	9,3	1,49
233	9,1	1,39
236	19,8	1,5
237	27,4	1,75
239	17,9	1,39
241	8,5	1,71
244	18,4	1,52
246	20,6	1,52
Muestras control		
<i>Nº de muestra</i>	<i>Concentración (ng/uL)</i>	<i>Pureza (abs 260/280)</i>
5512	11,9	1,1
5664	7,2	1,33
1001	8,8	1,41
1002	11,9	1,35
1003	10,7	1,54
1004	15,6	1,62
1005	17,6	1,64
1006	13	1,39
1007	13,2	1,55

A continuación, y tras la retrotranscripción, se comprobó la calidad y concentración del ADNc obtenido de las muestras de estudio. Los valores de cantidad y pureza fueron similares en todos los tipos de muestra, mostrando concentraciones adecuadas, con valores en un rango entre 178,2-222,1 ng/ul, y grados de pureza aceptable para sus ADNc, entre 1,62-2. Los datos se recogen en la **Tabla1** y **Tabla 2** del **Anexo1**.

5.2 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs POR qPCR. VALIDACIÓN.

Se determinó la expresión del miARN de referencia, miR26a-5p, y miR345-5p en muestras de suero y saliva respectivamente.

El resultado del experimento de qPCR genera una curva de amplificación que muestra la acumulación de producto (ADN) con respecto al número de ciclos. Se pudo observar que se generaron curvas de amplificación para los dos miARNs de referencia en todas las muestras de suero (**Figura4**) y en la mayoría de las muestras de saliva (70%) analizadas (**Figura5**).

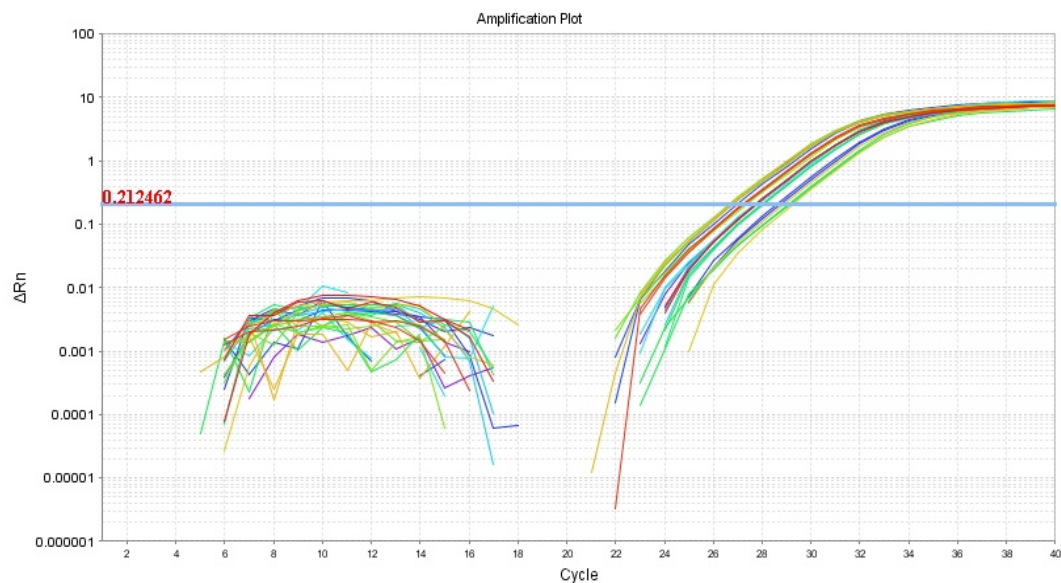


Figura 4. Curva de amplificación para miR26a-5p en suero.

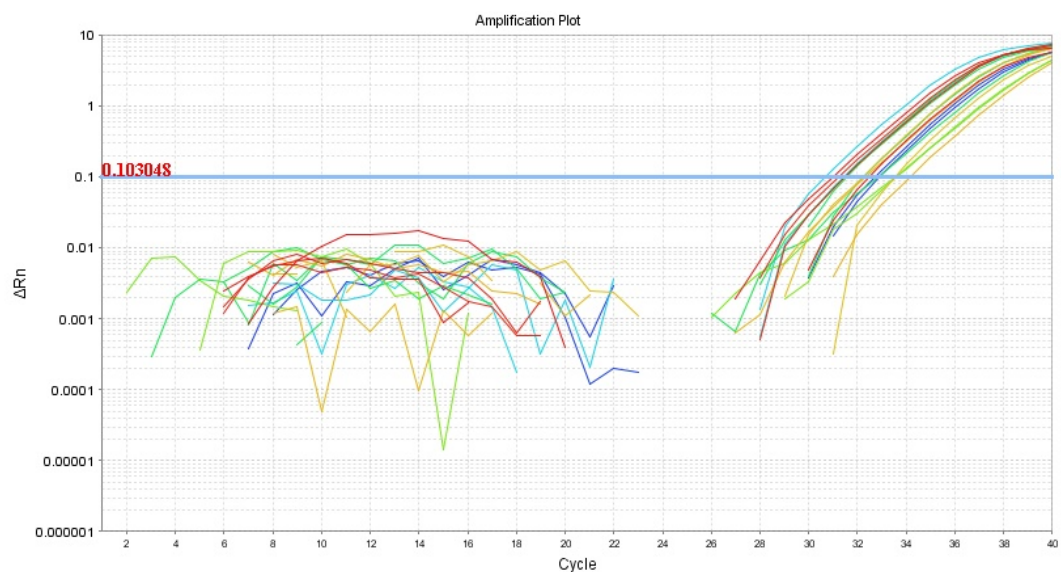


Figura 5. Curva de amplificación para miR345-5p en saliva.

- *miARNs diferencialmente expresados en muestras de suero.*

Se determinó la expresión del miARN de referencia, miR-26a-5p y el miARN diana miR-1246 resultantes del estudio preliminar de NGS.

Se observó que ambos microARNs amplificaron en todas las muestras de suero, tanto en los casos como en los controles. Las curvas de amplificación de las muestras de suero para el gen de referencia miR-26a-5p mostraron un Ct medio de 30,67. En cuanto al miR-1246, los resultados obtenidos presentan un Ct medio de 34,35. El análisis estadístico permitió determinar la existencia de diferencias significativas en la expresión del miR-1246 entre individuos con diagnóstico positivo de COVID-19 y el grupo de controles negativos (**Figura6**).

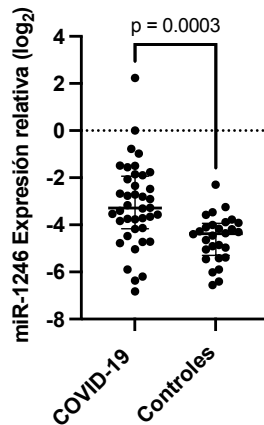


Figura 6. Representación de la expresión relativa del miR-1246 en suero de pacientes infectados con SARS-CoV-2 y controles negativos.

- *miARNs diferencialmente expresados en muestras de saliva.*

Los miARNs determinados en muestras de saliva fueron los siguientes: el miR-3195 como miARN diana y el miR345-5p como miARN de referencia.

Se observó que un pequeño subconjunto de ellas no mostró amplificación en la reacción de qPCR para el miARN de referencia. Las muestras de pacientes con infección viral que no amplificaron fueron las siguientes: n°223, n°224, n°225, n°226, n°233, n°241. En cuanto al grupo control, tampoco se detectaron curvas de amplificación en tres muestras (n°1001, n°1002). La falta de amplificación en estas muestras puede deberse a varios factores, como, por ejemplo, el rendimiento de la extracción y la calidad del ARN obtenido. Es importante destacar que, la mayoría de las muestras en las que no se obtuvo

un resultado satisfactorio, se obtuvieron concentraciones inferiores a $10 \mu\text{l}$ tras el proceso de extracción y purificación de los microARNs.

El resto de las muestras mostraron una curva de amplificación exponencial lo que indica una buena eficiencia en la reacción qPCR. Las curvas de amplificación para el gen de referencia miR-345-5p, mostraron un Ct medio de 32,13. En este caso el análisis estadístico determinó la existencia de diferencias significativas en la expresión del miR-3195 entre individuos con COVID-19 y el grupo control (**Figura 7**).

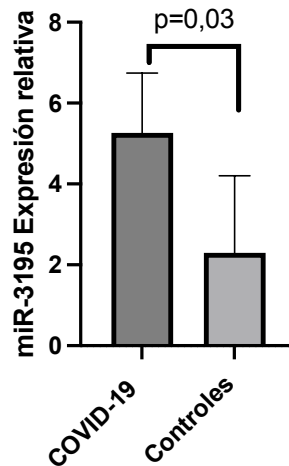


Figura 7. Representación de la expresión relativa del miR-3195 en saliva de pacientes infectados con SARS-COV2 y controles negativos.

Los resultados obtenidos en el estudio ROC mostraron que el AUC para miR-1246 en muestras de suero presentó un valor de 0,8 (IC=0,67-0,89; $p=0,001$). Por otro lado, aunque con menor número de muestras analizadas, el AUC del miR-3195 en muestras de saliva es de 0,9 (IC=0,76-1,00; $p=0,02$).

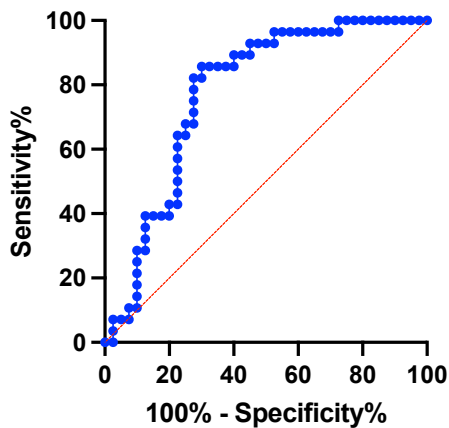


Figura 8. Curva ROC para miR-1246

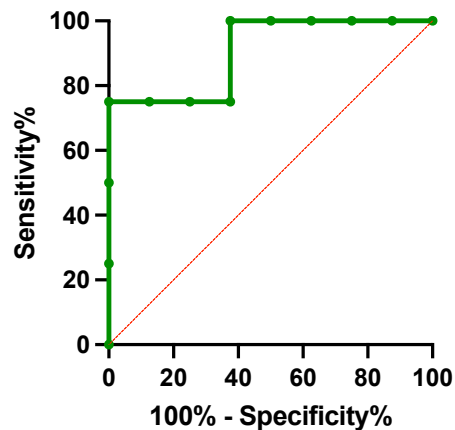


Figura 9. Curva ROC para miR-1395

6 DISCUSIÓN.

- ***Extracción de miRNAs de muestras de suero y saliva. Retrotranscripción.***

En relación con rendimiento de extracción se consiguieron cantidades similares de miRNAs en los dos tipos de muestra. En cuanto al índice de pureza, todos los valores obtenidos fueron inferiores a 1,5-1,8, y ligeramente mayor en muestras de saliva en comparación con las de suero. Se ha mencionado en algunos estudios que la espectrofotometría suele sobreestimar la cantidad de miARNs detectando otros ácidos nucleicos o proteínas derivadas del proceso de extracción (12). Además, relacionaron los niveles de pureza obtenidos con la cantidad de células presentes, por lo que el bajo índice de absorbancia 260/280 puede deberse a una baja concentración de miARNs. Por ello, el uso de Nanodrop se utiliza como un método orientativo para determinar la cantidad y pureza de la extracción de microARNs. No obstante, tras la RT los resultados obtenidos de la cuantificación de ADNc muestran valores óptimos de absorbancia a 260/280nm, esto indica que los índices de absorbancia no se deben a contaminación de las muestras, en cambio, son producto de la baja concentración de miARNs.

No obstante, a pesar de los resultados satisfactorios en la RT, algunas muestras de saliva no amplificaron los miARNs estables en la reacción de qPCR, mientras que todas las muestras de suero amplificaron correctamente. La presencia de componentes como proteínas, enzimas y lípidos en muestras de saliva, pueden saturar la membrana de la columna durante la extracción, y, de no ser eliminados correctamente pueden actuar como inhibidores. Con lo cual, su utilidad está influenciada por estos factores y afectará al rendimiento de la reacción. Para superar este inconveniente, se podrían utilizar métodos que incluyan procesos de eliminación de inhibidores antes de la extracción de microARNs. De la misma manera, la utilización de un kit de extracción de microARN específico para muestras de saliva permitiría maximizar el rendimiento, sin embargo, aún son escasos en el mercado. Otro factor limitante que puede influir en el rendimiento es la colecta y conservación de la muestra.

- ***Validación por qPCR de miRNAs desregulados, potenciales biomarcadores.***

Los resultados revelaron perfiles de expresión diferencial para los microARNs analizados en cada tipo de muestra, lo que sugiere una posible implicación de estas moléculas en la respuesta biológica frente al virus. Estas diferencias pueden ser reflejo de

las características fisiológicas, la composición celular y sobre todo la respuesta inmunitaria de los individuos infectados.

En el caso de las muestras de suero, se encontraron diferencias significativas en el perfil de expresión del miR-1246, estando sobreexpresado entre los casos con COVID-19 en comparación con los sujetos control sin infección. El miR-1246 se ha estudiado en el contexto de diversas enfermedades, y se ha documentado su repercusión en varios tipos de cáncer (13). También se ha relacionado con la modulación de la expresión del receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), el cual está implicado en la patogénesis del virus SARS-Cov-2. Diferentes estudios *in silico* han observado que la sobreexpresión del miR-1246 disminuye la expresión del receptor ACE2; éste actúa como diana celular y permite el ingreso del virus en la célula. Por consiguiente, una menor expresión del receptor ACE2 puede disminuir la infectividad del SARS-CoV2 limitando su vía de entrada a la célula, influyendo, probablemente, en la gravedad y/o progresión de la enfermedad, lo que podría correlacionarse con la severidad de la sintomatología en los pacientes infectados (14,15). Además, según los resultados preliminares, el análisis de las curvas ROC de este microARN muestra criterios de sensibilidad y especificidad que lo avalan como una potencial herramienta de diagnóstico. No obstante, a pesar de que esta hipótesis está soportada por otras publicaciones, se deben realizar estudios funcionales *in vitro* para confirmar su mecanismo de acción, así como evaluar su expresión en cohortes más amplias.

Por otro lado, los resultados obtenidos en las muestras de saliva demuestran que la expresión del miR-3195 se encontró incrementada en los casos con COVID-19 frente a los controles. La sobreexpresión de este microARN se ha asociado con cáncer de próstata (16) y con la severidad en casos de daño cerebral (17). Sin embargo, el miR-3195 es un microARN poco estudiado, por lo que aún no se comprende completamente su función. No obstante, los resultados preliminares obtenidos en el análisis ROC su uso como biomarcador que refleja la presencia del virus en vías respiratorias superiores. Aun así, se deberían de realizar más estudios para validar su expresión en cohortes de mayor tamaño, así como para conocer con precisión la función de este microARN y su posible relación con la patogénesis del virus.

7 CONCLUSIONES.

- La extracción microARNs a partir de muestras de suero y saliva por el método descrito, resultaron en un rendimiento adecuado, principalmente en suero, que permitieron su posterior análisis por RT y qPCR. Respecto a la pureza, se concluye que su medición por espectrofotometría tiene un carácter orientativo debido a la poca cantidad de estos pequeños ARNs en este tipo de fluidos.
- La falta de amplificación de los miARNs de referencia, en ciertas muestras de saliva nos lleva a recomendar una mejora de los métodos de colecta y/o protocolos de extracción de estas moléculas en este fluido.
- La concentración y pureza obtenidas tras la retrotranscripción indican que la RT presentó un alto rendimiento en ambos tipos de muestras.
- Se confirmó mediante qPCR que los microARNs estables amplificaron en todas las muestras de suero, estos resultados respaldan la estabilidad y la idoneidad de los miARNs seleccionados como genes de referencia para la normalización de los datos.
- La expresión diferencial del miR-1246 observada en muestras de suero, el cual se relaciona directamente con el mecanismo patogénico de SARS-COV-2, sugieren este miARN como potencial biomarcador diagnóstico en la progresión de la infección.
- En relación con el miR-3195 en muestras de saliva, se concluye que este microARN mostró una expresión significativa y potencial utilidad en el diagnóstico de la COVID-19. Esto sugiere que el miR-3195 puede desempeñar un papel importante en la regulación de la expresión génica y podría tener implicaciones en la patogénesis viral.
- Estudios posteriores a nivel funcional y de validación en cohortes más amplias son necesarios para corroborar los presentes hallazgos.

8 BIBLIOGRAFÍA.

1. Reina J. El SARS-CoV-2, una nueva zoonosis pandémica que amenaza al mundo. Elsevier Vacunas [Internet]. 2020 [citado el 16 de abril de 2023];21(1):17–22. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-vacunas-72-articulo-el-sars-cov-2-una-nueva-zoonosis-S1576988720300042>
2. PASTRIAN-SOTO G. Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. Int J Odontostomatol [Internet]. 2020 [citado el 16 de abril de 2023];14(3):331–7. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2020000300331
3. MALIK, Yasmin A. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. Malaysian J Pathology [Internet] 2020 [citado el 16 de abril de 2023];42(1):3-11. Disponible en: <http://mjpath.org.my/2020/v42n1/properties-of-coronavirus.pdf>
4. PALACIOS CRUZ M., SANTOS E, VELÁZQUEZ CERVANTES MA, LEÓN SUAREZ M. COVID-19, una emergencia de salud pública mundial. Rev Clin Esp [Internet]. 2020 [citado el 9 de junio de 2023];221 (1):55-61. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014256520300928>
5. SANCHEZ-CASTRO EE, PAJUELO-REYES C. Importance of genetics as a science in relation to the COVID-19 pandemic. Revista Facultad Medicina Humana [Internet]. 2020 [citado el 16 de abril de 2023];20(4):690–5. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2308-05312020000400690&script=sci_arttext
6. PABÓN-MARTÍNEZ YV. MicroARNs: una visión molecular. Rev Univ Ind Santander Salud [Internet]. 2011 [citado el 6 de mayo de 2023];43(3):289–97. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072011000300010
7. GINER M, MONTOYA MJ, VÁZQUEZ MA, MIRANDA C, MIRANDA MJ, PÉREZ-CANO R. ¿Qué son los microARNs?: posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica. Rev Osteoporos Metab Miner [Internet]. 2016 [citado el 16 de abril de 2023];8(1):40–4. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1889-836X2016000100007&script=sci_arttext&tlng=pt

8. Chávez Alfonso CO, Centurión OA. Biogenesis and mechanism of action of MicroRNAs as serum biomarkers in cardiovascular diseases. *Rev salud pública Parag* [Internet]. 2020; 10(1):74–9 [citado el 16 de abril de 2023]. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2307-33492020000100074
9. Rico-Rosillo M G, Vega-Robledo G B, Olivia-Rico D. Importancia de los microARN en el diagnóstico y desarrollo de enfermedades. *Rev Med Inst Mex Secur Soci* [Internet] 2014 [citado el 16 de abril de 2023] ;52(3):302-7. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4577/457745482014.pdf>
10. Hum C, Loiselle J, Ahmed N, Shaw TA, Toudic C, Pezacki JP. MicroRNA mimics or inhibitors as antiviral therapeutic approaches against COVID-19. *Drugs* [Internet]. 2021;81(5):517–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-021-01474-5>
11. Método delta delta Ct - Labster Theory [Internet]. Labster.com. [citado el 6 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://theory.labster.com/delta-delta-ct-es/>
12. Urbizu A, Arnaldo L, Beyer K. Obtaining miRNA from saliva-comparison of sampling and purification methods. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 [citado el 28 de junio de 2023];24(3):2386. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/2386>
13. Kucher AN, Koroleva IA, Zarubin AA, Nazarenko MS. MicroRNAs as the potential regulators of SARS-CoV-2 infection and modifiers of the COVID-19 clinical features. *Mol Biol* [Internet]. 2022 [citado el 22 de junio de 2023];56(1):29–45. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1134/S0026893322010034>
14. Calderon-Dominguez M, Trejo-Gutierrez E, González-Rovira A, Beltrán-Camacho L, Rojas-Torres M, Eslava-Alcón S, et al. Serum microRNAs targeting ACE2 and RAB14 genes distinguish asymptomatic from critical COVID-19 patients. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 2022 [citado el 26 de junio de 2023];29:76–87. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2162253122001585>
15. Cazorla-Rivero S, Mura-Escorche G, Gonzalvo-Hernández F, Mayato D, Córdoba-Lanús E, Casanova C. Circulating miR-1246 in the progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in patients from the BODE

- cohort. *Int J Chronic Obstruct Pulmon Dis* [Internet]. 2020 [citado el 8 de junio de 2023]; 15:2727–37. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2147/COPD.S271864>
16. Rönnau CGH, Fussek S, Smit FP, Aalders TW, van Hooij O, Pinto PMC, et al. Upregulation of miR-3195, miR-3687 and miR-4417 is associated with castration-resistant prostate cancer. *World J Urol* [Internet]. 2021 [citado el 26 de junio de 2023];39(10):3789–97. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00345-021-03723-4>
17. Qin X, Li L, Lv Q, Shu Q, Zhang Y, Wang Y. Expression profile of plasma microRNAs and their roles in diagnosis of mild to severe traumatic brain injury. *PLoS One*. 2018 Sep [citado el 28 de junio de 2023] 18;13(9):e0204051. doi: 10.1371/journal.pone.0204051

ANEXO 1

Los resultados de la cuantificación de ADNc después de realizar la retrotranscripción.

Se detallan los valores de concentración y pureza.

Tabla 1. Resultados obtenidos tras la RT en muestras de suero

Muestras COVID-19		
<i>Nº de muestra</i>	Concentración (ng/uL)	Pureza (abs 260/280)
204	215,5	1,8
205	204,4	1,8
207	197,4	1,82
211	196,6	1,85
223	213,8	1,81
224	206,8	1,71
225	206,7	1,62
226	202,7	1,75
228	214,6	1,91
230	225,9	1,93
233	216,9	1,87
236	217,2	1,96
237	201,1	1,89
239	204,9	1,8
241	208,8	1,87
244	207,5	1,84
246	214,3	1,63
Muestras control		
<i>Nº de muestra</i>	Concentración (ng/uL)	Pureza (abs 260/280)
7255	194,6	1,78
7258	191	1,78
7464	201,8	1,79
7465	208,2	1,86
7470	192	1,77
8023	200,9	1,84
8024	206	1,8
8524	202	1,8
4259	193,8	1,66

Tabla 2. Resultados obtenidos tras la RT en muestras de saliva

Muestras COVID-19		
<i>Nº de muestra</i>	Concentración (ng/uL)	Pureza (abs 260/280)
204	195	1,83
205	198	1,85
207	203,1	1,86
211	222,1	1,88
223	210,3	1,84
224	210,5	1,93
225	203,2	1,9
226	199,5	1,9
228	213,7	1,83
230	203,7	1,88
233	212	1,88
236	217,8	1,96
237	214,4	1,97
239	216	2
241	215,7	1,97
244	203,5	1,91
246	206,5	1,85
Muestras control		
<i>Nº de muestra</i>	Concentración (ng/uL)	Pureza (abs 260/280)
5512	178	1,78
5664	176,5	1,75
1001	197,1	1,86
1002	200,9	1,88
1003	205,3	1,89
1004	203,9	1,88
1005	200,4	1,79
1006	178,2	1,76
1007	185,6	1,78