

Universidad Católica de Santa María
Escuela de Postgrado
Doctorado en Ciencias de la Salud



**Evaluación de la capacidad inhibitoria del miRNA-133b en la activación del
inflammasoma NLRP3 en monocitos humanos expuestos a SARS-CoV-2**

Tesis presentada por:

Sanchez Guillen, Johany Cecilia

ORCID: 0000-0002-8565-6353

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud

Asesor:

PhD Villanueva Salas, José Antonio

ORCID: 0000-0001-6050-0101

Arequipa Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSTGRADO
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 29 de Junio del 2025

Dictamen: 004870-C-EPG-2025

Visto el borrador del expediente 004870, presentado por:

2021001942 - SANCHEZ GUILLEN JOHANY CECILIA

Titulado:

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DEL MIRNA-133B EN LA ACTIVACIÓN DEL
INFLAMASOMA NLRP3 EN MONOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A SARS-COV-2**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29285302 - GUTIERREZ ARANIBAR ROXANA JACQUELINE CANDELARIA
DICTAMINADOR**



**00476696 - BERNABE ORTIZ JULIO CESAR
DICTAMINADOR**



**30401320 - FARFAN DELGADO MIGUEL FERNANDO
DICTAMINADOR**



**29698155 - MIRANDA PINTO ALEJANDRO RUTHBALDO
DICTAMINADOR**



**16423061 - FERNANDEZ FERNANDEZ FERNANDO ALBERTO
DICTAMINADOR**



EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DEL MIRNA-133B EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN MONOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A SARS-COV-2

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

INDICE DE SIMILITUD

13%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	www.acin.org Fuente de Internet	1%
3	docta.ucm.es Fuente de Internet	1%
4	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%
5	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	<1%
6	doi.org Fuente de Internet	<1%
7	www.jove.com Fuente de Internet	<1%
8	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%

DEDICATORIA

A mi madre,

Con profundo amor y gratitud, dedico este logro a la mujer que ha sido mi pilar y mi mayor inspiración. Has estado a mi lado en cada momento, brindándome apoyo, fortaleza y esperanza, incluso en los días más oscuros. Has sido mi roca en los momentos de debilidad, dándome la fuerza para seguir adelante cuando las dificultades parecían insuperables.

En los días de tristeza, su sonrisa y su amor se convirtieron en mi alegría, recordándome que siempre hay luz al final del camino. Tus palabras sabias, tu paciencia infinita y tu confianza en mí han sido el impulso necesario para superar cada obstáculo y alcanzar esta meta.

Cada paso que doy hacia el futuro lleva consigo el amor y los valores que me has inculcado. Este logro es tanto mío como tuyo, porque sin su constante presencia, nada de esto habría sido posible.

Gracias, mamá.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. José Antonio Villanueva,

Con profunda gratitud, dedico estas palabras al Dr. José Antonio Villanueva, cuyo conocimiento, paciencia y apoyo constante han sido fundamentales para el desarrollo de esta tesis. Su guía no solo me permitió avanzar con seguridad en este camino, sino también aprender valiosas lecciones que trascienden el ámbito académico. Gracias por su confianza y por ser una fuente inagotable de inspiración.

Al Vicerrectorado de Investigación,

Expreso mi más sincero agradecimiento al Vicerrectorado de Investigación por brindarme el financiamiento y los recursos necesarios para la realización de esta tesis. Su compromiso con el desarrollo académico y científico ha sido esencial para alcanzar este logro. Gracias por creer en mi proyecto y por fomentar un entorno que impulsa el avance del conocimiento.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis ha sido financiada por el Concurso Interno de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, con la Resolución 29387-R-2023, en el marco del Concurso de Fondos para la Investigación 2021-II, modalidad Tipo 1: Iniciación en Investigación, bajo el proyecto titulado "Evaluación de la capacidad inhibitoria del miRNA 133b en la activación del inflammasoma NLRP3 en monocitos humanos expuestos a SARS-CoV-2".

Agradecemos el apoyo recibido para llevar a cabo esta investigación, que contribuye al entendimiento de los mecanismos moleculares en la respuesta inmune frente al SARS-CoV-2.

RESUMEN

La enfermedad COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2, ha generado una emergencia sanitaria mundial debido a su rápida propagación y significativa mortalidad, especialmente en pacientes con inflamación severa mediada por el inflammasoma NLRP3. Este estudio evalúa el potencial terapéutico del miRNA-133b para inhibir la activación del inflammasoma NLRP3 en monocitos infectados con SARS-CoV-2. Utilizando técnicas de cultivo celular, lipofección y análisis inmunológico, se demostró que el miRNA-133b reduce significativamente la producción de caspasa-1, marcador clave de la inflamación y piroptosis celular.

En un modelo experimental, se logró aislar monocitos humanos de sangre periférica, los cuales fueron infectados *in vitro* con SARS-CoV-2. Posteriormente, se evaluó la efectividad de la transfección mediante un plásmido portador del miRNA-133b, alcanzando un 40% de éxito. La medición de la caspasa-1 mediante ensayos de quimioluminiscencia mostró una marcada reducción en monocitos tratados con miRNA-133b, con diferencias estadísticamente significativas respecto al control positivo ($p=0.001$). Estos resultados corroboran la capacidad inhibitoria del miRNA-133b sobre la inflamación mediada por el inflammasoma NLRP3, con una respuesta comparable a la de monocitos no infectados ($p=0.642$).

Adicionalmente, se identificó que el gen reportero del plásmido de transfección podría interferir parcialmente en la medición de fluorescencia, sugiriendo la necesidad de estudios futuros para optimizar el diseño experimental. Sin embargo, los datos obtenidos evidencian un prometedor efecto terapéutico del miRNA-133b en la modulación de procesos inflamatorios severos, lo que podría extenderse a otras enfermedades caracterizadas por la hiperactivación del inflammasoma NLRP3.

Este trabajo contribuye significativamente al entendimiento de los mecanismos inflamatorios en COVID-19 y sugiere nuevas estrategias de tratamiento dirigidas a reducir la mortalidad asociada a la inflamación exacerbada.

Palabras clave: Inflammasoma NLRP3, SARS-CoV-2, miRNA-133b

ABSTRACT

COVID-19, caused by SARS-CoV-2, has led to a global health crisis due to its rapid spread and significant mortality, particularly among patients with severe inflammation driven by the NLRP3 inflammasome. This study investigates the therapeutic potential of miRNA-133b in inhibiting NLRP3 inflammasome activation in SARS-CoV-2-infected human monocytes. Employing cell culture, lipofection, and immunological assays, the study demonstrates that miRNA-133b significantly reduces caspase-1 production, a critical marker of inflammation and pyroptosis.

Human peripheral blood monocytes were isolated and infected in vitro with SARS-CoV-2. Transfection with a miRNA-133b-carrying plasmid achieved a 40% efficiency. Caspase-1 levels, measured using chemiluminescent assays, revealed a significant decrease in treated monocytes compared to the positive control ($p=0.001$), indicating the inhibitory effect of miRNA-133b on NLRP3 inflammasome activation. Notably, treated monocytes exhibited caspase-1 levels comparable to non-infected monocytes ($p=0.883$), reinforcing the miRNA's modulatory potential.

However, fluorescence from the reporter gene in the transfection plasmid partially interfered with measurement accuracy, underscoring the need for optimized experimental designs in future studies. Despite this limitation, the results highlight the therapeutic promise of miRNA-133b in mitigating severe inflammatory responses, with potential applications extending to other diseases marked by NLRP3 hyperactivation.

This research advances understanding of the inflammatory mechanisms underlying COVID-19 and proposes innovative therapeutic strategies to reduce mortality associated with excessive inflammation.

Key words: NLRP3 inflammasome, SARS-CoV-2, miRNA-133b

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
FINANCIAMIENTO	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	4
1.1. El virus SARS-CoV-2	4
1.1. El inflammasoma NLRP3	10
1.2. Monocitos humanos	13
1.3. El miRNA-133b.....	15
CAPÍTULO II.....	19
METODOLOGÍA.....	19
2.1. Ubicación espacial y temporal.....	19
2.2. Unidades de estudio	19
2.3. Metodología.....	19
CAPÍTULO III	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1. Aislamiento y cultivo primario de monocitos humanos:.....	25
3.2. Aislamiento, cultivo y mantenimiento de virus SARS-CoV-2.....	27
3.3. Evaluación de la expresión de ACE2 y Spike por inmuno-fluorescencia indirecta (IFI):.....	29
3.4. Transfección de linfocitos humanos con el miRNA 133-b por medio de lipofección:	30

3.5. Evaluación de la activación del inflammasoma NLRP3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos.	33
3.6. Evaluación de la actividad inhibitoria del miRNA-133b en la activación del inflammasoma NLRP3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos.....	36
CAPÍTULO IV	41
CONCLUSIONES.....	41
RECOMENDACIONES	42
REFERENCIAS	43

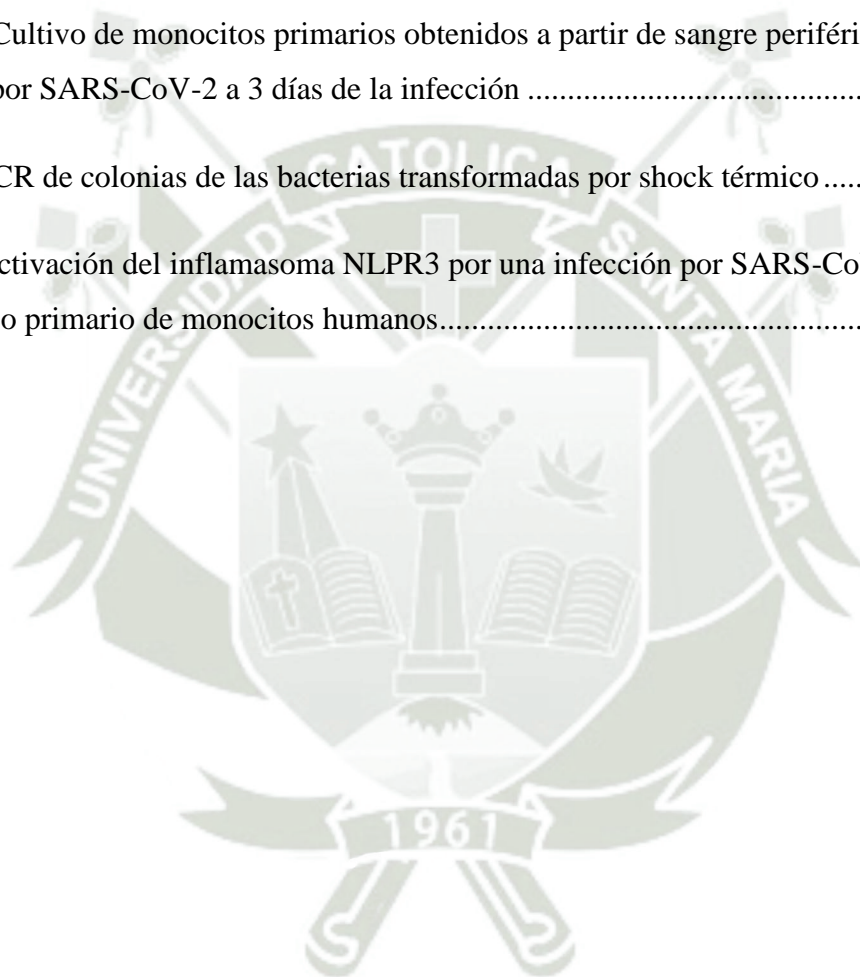


ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Análisis estadístico de los parámetros de optimización para la extracción de monocitos primarios a partir de sangre periférica	25
Tabla 2: Optimización de la transfección con lipofectamina	32
Tabla 3: Evaluación de la activación del inflammasoma NLPR3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos	34
Tabla 4: Análisis estadístico de la activación del inflammasoma NLPR3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos.	35
Tabla 5: Evaluación de la actividad inhibitoria del miRNA-133b en la activación del inflammasoma NLPR3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos	37
Tabla 6: Análisis estadístico de la actividad inhibitoria del miRNA-133b en la activación del inflammasoma NLPR3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Línea de tiempo de la aparición de desarrollo de la COVID-19.....	5
Figura 2: Comparación de volúmenes de siembra de monocitos primarios.....	26
Figura 3: Comparación de medios de extracción para monocitos primarios	27
Figura 4. : Cultivo de monocitos primarios obtenidos a partir de sangre periférica infectados por SARS-CoV-2 a 3 días de la infección	30
Figura 5: PCR de colonias de las bacterias transformadas por shock térmico.....	31
Figura 6: Activación del inflammasoma NLPR3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos.....	36



ABREVIATURAS

1. **AngII:** Angiotensina II – Un péptido que desempeña un papel clave en la regulación de la presión arterial y el equilibrio de líquidos y electrolitos.
2. **ATP:** Adenosín Trifosfato – Una molécula energética crucial para las funciones celulares.
3. **CARD:** Domain de Activación de Caspasa – Parte de las proteínas involucradas en la señalización y activación de la caspasa.
4. **CDC:** Centers for Disease Control and Prevention – Agencia de salud pública de Estados Unidos encargada de proteger la salud de la población.
5. **CSG:** Grupo de Estudio Clínico – Un equipo organizado para realizar investigaciones clínicas sobre enfermedades y tratamientos.
6. **ECA2:** Enzima Convertidora de Angiotensina 2 – Receptor celular que sirve de punto de entrada al virus SARS-CoV-2 en las células humanas.
7. **FBS:** Suero fetal bovino – Suero derivado de sangre fetal bovina usado en cultivos celulares.
8. **HMNM:** Hiperplasia Micronodular Neumocitaria Multifocal (HMNM) – condición pulmonar caracterizada por el crecimiento anormal y disperso de células neumocíticas tipo II en múltiples nódulos dentro del pulmón. Este trastorno puede interferir con la función respiratoria y contribuir al daño pulmonar, comúnmente asociado a infecciones o enfermedades pulmonares crónicas
9. **IL-1 β :** Interleucina 1 beta – Una citoquina proinflamatoria involucrada en la respuesta inmune.
10. **IL-18:** Interleucina 18 – Citoquina proinflamatoria involucrada en la activación del inflammasoma.
11. **LRR:** Repetición rica en leucina – Motivo estructural en proteínas implicado en la interacción proteína-proteína.
12. **MERS-CoV:** Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio – Un virus que causa una enfermedad respiratoria grave, similar al SARS.
13. **MiRNA-133b:** MicroRNA-133b – Un microRNA que regula la expresión génica involucrada en varios procesos biológicos, incluido el control de la inflamación.

14. **NADPH:** Fosfato de nicotinamida adenina – Coenzima involucrada en reacciones de reducción en procesos metabólicos.
15. **NLRP3:** NLR Family Pyrin Domain Containing 3 – Proteína involucrada en la activación del inflammasoma y la respuesta inflamatoria.
16. **NF- κ B:** Factor Nuclear Kappa B – Un complejo de proteínas que regula la expresión génica en respuesta a diversas señales.
17. **NOD:** Domain de oligomerización de nucleótidos – Estructura de proteínas que participa en la respuesta inmune innata.
18. **OMS:** Organización Mundial de la Salud – Agencia de la ONU encargada de la salud pública internacional.
19. **PBMCs:** Células Mononucleares de Sangre Periférica – Células sanguíneas que incluyen linfocitos y monocitos, fundamentales en la respuesta inmune.
20. **PRR:** Receptor de Reconocimiento de Patógenos – Receptores celulares que detectan patógenos y activan respuestas inmunes.
21. **RBD:** Dominio de Unión al Receptor – Parte de una proteína viral que se une a su receptor en la célula huésped.
22. **ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno – Moléculas altamente reactivas que pueden dañar las células y tejidos.
23. **SARS-CoV:** Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo – Virus causante de una enfermedad respiratoria grave, predecesor del SARS-CoV-2.
24. **SARS-CoV-2:** Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 – Virus causante de la pandemia de COVID-19.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad COVID-19 es producida por el virus SARS-CoV-2, el cual fue recientemente descubierto en la localidad de Wuhan, China. Desde entonces, se ha producido una diseminación acelerada de la enfermedad, alcanzando niveles de pandemia. En respuesta al alto número de infectados y el creciente porcentaje de muertos, varios países han optado por establecer una emergencia sanitaria y unir esfuerzos para encontrar estrategias para erradicar la enfermedad. (1) En reportes internacionales, el COVID-19 tiene una letalidad del 4%; las personas consideradas de alto riesgo desarrollan un proceso marcado por un daño severo a nivel pulmonar, así como por la aparición de una inflamación exacerbada; la insuficiencia respiratoria, acompañada por los daños causados por dicha respuesta inmune, es lo que puede llevar a la mortalidad del paciente (2). Estudios recientes muestran que un proceso inflamatorio agudo descontrolado está relacionado con la severidad de la enfermedad, incluyendo procesos de respuesta inmune como el inflammasoma NLPR3; que se ha visto también involucrado en otras enfermedades con un desbalance inmunológico, como las alergias, arteriosclerosis, esclerosis múltiple y algunas enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2. (3) Por lo tanto, la posibilidad de controlar la expresión y activación de dicha vía de inflamación sería una alternativa de tratamiento importante para reducir la tasa de severidad en pacientes hospitalizados.

Los miRNAs son moléculas pequeñas que son generadas por un organismo para controlar la expresión de un gen, por medio de la unión complementaria de dicho miRNA al mRNA del gen expresado y en consecuencia reclutando la maquinaria que moderará su degradación. Este mecanismo es utilizado actualmente para tratar diversas enfermedades; como el cáncer de mama (4), osteosarcomas (5), enfermedades genéticas como la distrofia muscular (6), y enfermedades inflamatorias (7). Las ventajas del uso de un tratamiento genético por miRNA son varias; en el caso del cáncer, evita el uso repetitivo de quimioterapia o radioterapia, que son tratamientos no específicos que pueden dañar células no cancerígenas circundantes. Además, el uso de vectores biológicos como liposomas y nanopartículas, permite una mayor especificidad (8).

El presente trabajo busca determinar si es posible controlar la activación del inflamasoma NLRP3 por medio de la expresión del miRNA133-b en monocitos de sangre periférica infectados con el virus SARS-CoV-2. Este estudio tiene impacto académico y social, ya que contribuye a construir el conocimiento respecto a los mecanismos inflamatorios del COVID-19 y enfermedades con mecanismos similares. De igual manera; su validación representará una alternativa de tratamiento para pacientes con patologías graves asociadas a una inflamación crónica.



HIPÓTESIS

Dado el inflammasoma NLRP3 está involucrado en la exacerbación de la inflamación en una infección por SARS-CoV-2; es posible que la expresión del miRNA 133-b en monocitos humanos infectados con el virus inhiba su activación *in vitro*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la capacidad inhibitoria del miRNA 133-b en la activación del inflammasoma NLRP3 de monocitos humanos, activado por una infección *in vitro* de SARS-CoV-2.

Objetivos específicos

PRIMERO: Medir la activación del inflammasoma NLRP3 en monocitos humanos frente a una infección *in vitro* de SARS-CoV-2, por medio de la expresión de Caspasa-1.

SEGUNDO: Evaluar la efectividad de ingreso del miRNA-133b a los monocitos humanos por medio de una lipofección.

TERCERO: Medir la activación del inflammasoma NLRP3 inducido por una infección *in vitro* de SARS-CoV-2 en presencia de un tratamiento con el miRNA-133b.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. El virus SARS-CoV-2

1.1.1. Etiología

El beta-coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2), es el agente infeccioso responsable de la COVID-19, la cual fue reportada por primera vez en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China; en el año 2019. Su nombre fue acuñado basándose en sus características biológicas y moleculares por el Grupo de Estudio de Coronavirus (CSG) del Comité Internacional de Taxonomía de Virus, siendo considerado como un beta-coronavirus. (9)

Los beta-coronavirus son uno de los cuatro géneros de la subfamilia *Orthocoronaviridae*, familia *Nidovirales* de los coronavirus. Su genoma corresponde a una molécula de RNA de hebra simple, protegido por una cápside formada por su proteína de superficie, organizada en forma de corona. Los primeros organismos pertenecientes a este género fueron el alfa-coronavirus 229E, y el beta-coronavirus OC43; ambos causantes de una infección del tracto respiratorio superior de baja severidad, con características patológicas similares a una gripe común. (10) Aunque la mayoría de los coronavirus que infectan a humanos están asociados a infecciones leves en personas con sistemas inmunológicos débiles; se han registrado recientemente tres brotes considerados de severidad alta, los cuales son: SARS-CoV, MERS-CoV y finalmente SARS-CoV-2. (11)

El inicio de la pandemia tuvo lugar en diciembre del año 2019, cuando se reportaron múltiples casos de neumonía de orígenes desconocidos en centros hospitalarios en Wuhan, en la provincia de Hubei, China. De acuerdo a las observaciones por los profesionales médicos, los síntomas presentados habían sido descritos antes en la enfermedad causada por el SARS-CoV, y el MERS-CoV. Posteriormente, se comprobó la asociación del virus a la familia de los coronavirus por medio del secuenciamiento de

muestras de lavado pleural de pacientes con neumonía, y en enero del 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la emergencia internacional debido a la expansión del brote infeccioso. Un mes después, la CSG nombró al nuevo coronavirus. El nivel de casos aumentó rápidamente debido a los viajes internacionales y las festividades por fin de año, lo que llevó a una diseminación global. Finalmente, en el mes de marzo del 2020, la OMS declaró la COVID-19 como una pandemia. (12) La línea de tiempo correspondiente a los hechos clave en el brote infeccioso se muestran en la Figura 1.

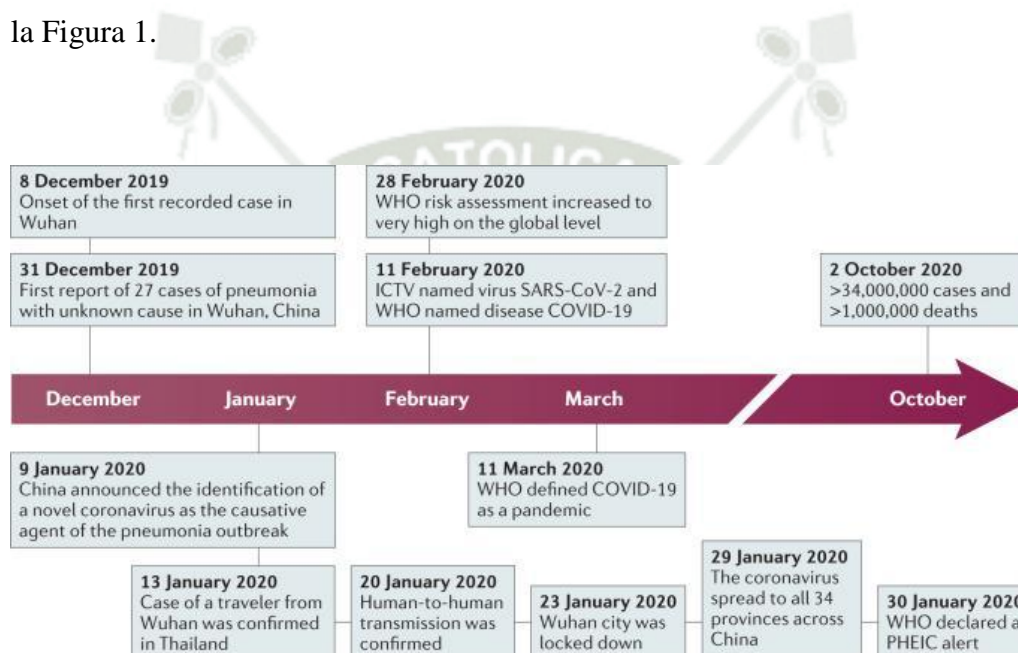


Figura 1: Línea de tiempo de la aparición de desarrollo de la COVID-19.

Obtenida de: Ben Hu, et al. (2020): doi: 10.1038/s41579-020-00459-7.

Si bien a la fecha el origen evolutivo del virus y su zoonosis al ser humano es desconocida, el secuenciamiento y análisis bioinformático del genoma del microorganismo dan pistas de su posible origen. Inicialmente, se dividió a las muestras de SARS-CoV-2 analizadas en el linaje A y el linaje B, por sus diferencias genéticas. El alineamiento de las secuencias mostró que, a pesar de compartir el mismo nombre, el SARS-Co-2 solo presenta una similitud con el SARS-CoV en un 90%, y en su lugar, se tenía mayor coincidencia similitud al virus RaTG13, un coronavirus encontrado en murciélagos. (11) Aunque el linaje B fue encontrado en animales de granja, y teorizado de proceder igualmente del murciélago como huésped primario, las mutaciones que

posee facilitaron su reproducción y transmisión, siendo el linaje B el que se tiene en la actualidad, reemplazando al linaje A. En consecuencia, si bien el origen natural es la teoría más aceptada, la rápida diseminación a animales de granjas y humanos, posiblemente de forma simultánea en diferentes localidades, dificulta su identificación. (13)

1.1.2. Epidemiología

Como se mencionó anteriormente, no es posible conocer con certeza al paciente 0 o punto de origen, sin embargo, existen estimaciones epidemiológicas y los reportes clínicos del momento que pueden dar una idea del origen y trayectoria de la enfermedad. Inicialmente, se tiene un reporte de 27 casos, dentro de los cuales se relacionaba un mercado de alimentos marinos en Huanan, Wuhan, donde también manejaban otros productos vivos, tanto domésticos como salvajes. Por este motivo, se sospechó de dicho centro de abasto como foco inicial de contagio. Sin embargo, muchos otros pacientes dentro de los primeros 27 no habían tenido contacto con el mercado de Huanan, lo que sugería que la enfermedad había iniciado en otra parte. (10) Posteriormente, se identificaron de forma oficial 933 casos, los cuales fueron separados en tres etapas de infección. La primera etapa corresponde a 317 casos de los cuales 29 no presentan récords oficiales. Para la segunda etapa, 99% de los casos eran importados, principalmente de Europa. Finalmente, en la tercera etapa, adicionalmente a los casos domésticos, 296 casos fueron reportados fuera de China. (13) Estos valores solamente consideran casos confirmados y diagnosticados, por lo que es posible que el valor sea mayor considerando a los pacientes asintomáticos.

Por otro lado, la infección por SARS-CoV-2 es auto limitante, pudiendo presentarse en una forma asintomática, moderada, severa y crítica. De estas categorías, la forma sintomática moderada es la más frecuente (80.9%), mientras que la menos frecuente es la crítica (4,7%). (10) Gracias a los estudios subsecuentes, se sabe que la edad media de infección es de 50 años. Los niveles de severidad antes descritos también dependen de la edad, siendo las personas mayores de 60 años y con enfermedades crónicas o comorbilidades las más susceptibles a desarrollar las formas severas y críticas de la enfermedad. (12)

A partir de los primeros pacientes reportados, se encontró que los síntomas más comunes son fatiga, tos, fiebre y mialgia; acompañado de una posible producción de esputo y hemoptisis. Un pequeño porcentaje presentó diarrea (3%) y algunos pacientes reportaron la pérdida de olfato y gusto. (10, 12) Adicionalmente, se calcula que el tiempo promedio de incubación se encuentra en las 5.2 semanas. Otros signos significativos son una leucopenia, siendo más marcada la linfocitopenia. una gran mayoría de pacientes (98%) mostró compromiso bilateral de los pulmones; y pacientes en UCI mostraron áreas subsegmentadas y consolidación.(10) Zhu y colaboradores reportaron la característica opacidad “tipo vidrio” en la parte superior de los pulmones en pacientes con sintomatología moderada, convirtiéndose así en un método de diagnóstico de la enfermedad. (14)

Respecto a su infectividad; se estimó un R_0 de 2.5 en promedio, un valor cercano al R_0 de 3 presentado para SARS-CoV. Sin embargo, la transmisión no fue principalmente nosocomial; esto podría relacionarse a la apta transmisibilidad para el SARS-CoV-2, el cual podría deberse a sus cambios genéticos y estructurales. Por ejemplo, en el caso del virus reportado en 2002, su transmisión ocurre principalmente después del inicio de la enfermedad y llega a un ápice junto con su severidad. A diferencia de este, las muestras obtenidas del tracto respiratorio superior mostraron que la infectividad del SARS-CoV-2 se presenta mayoritariamente durante la primera semana de síntomas. (12) De hecho, fue reportado que pacientes asintomáticos podrían liberar virus infecciosos, y que pacientes recuperados aún presentan una respuesta positiva a la prueba de RT-PCR; es decir, una carga viral considerada como positiva para una persona enferma. (10)

1.1.3. Características biológicas

1.1.3.1. Estructura

El virus SARS-CoV-2, al pertenecer al género de los coronavirus, posee una forma esférica, donde su cápside está recubierta de su proteína de unión a la célula, la proteína Spike (S), dando la apariencia de una corona. Cada partícula vírica tiene un diámetro de 100 nm, el cual contiene un RNA de cadena simple de aproximadamente 29,8 kb. Su genoma codifica proteínas estructurales, proteínas no estructurales, y marcos de lectura abiertos de los cuales aún se desconoce su función. 14 marcos abiertos de lectura o

ORFs, y hasta 29 proteínas virales. Contando desde el extremo 5', se tiene el inicio del RNA del virus, en el cual se encuentran dos secuencias que se superponen entre ellas, denominadas pp1a y p1ab. Estas lipoproteínas son cortadas, y dan lugar a 16 proteínas no estructurales o NSPs, que son esenciales para la replicación viral y proceso de transcripción. El material restante del genoma corresponde a los genes estructurales: Las proteínas Spike (S), de membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N); adicionalmente, se presentan las proteínas HE, 3 a/b y 4 a/b. (15) A continuación se mencionan las funciones de las proteínas estructurales más importantes:

1.1.3.1.1. Proteína Spike: es una glicoproteína que se une al receptor de la Enzima Convertidora de Angiotensina 2 (ECA2); que es el punto de anclaje necesario para la internalización del virus en la célula huésped. la estructura primaria de Spike está compuesta por los dominios N terminal (NTD), el dominio de unión al receptor (RBD), el motivo de unión al receptor (RBM), el sub-dominio 1 (SD1), el subdominio 2 (SD2), el péptido de fusión (FS), la reacción de conexión (CR), la hepta-repetición (HR1), una hélice central (CH), una horquilla beta (BH), el subdominio 3 (SD3), la hepta-repetición 2 (HR2), el dominio transmembrana (TM) y la cola citoplasmática (IC). (11)

1.1.3.1.2. Proteína de membrana: constituida por tres hélices transmembrana y un dominio C terminal intravírico. Esta sirve de anclaje para el reclutamiento de otras proteínas estructurales una vez el virus haya internalizado en la célula y se encuentre en proceso de ensamblaje de las nuevas partículas virales. Además, la unión específica de las proteínas M y N es esencial para la formación correcta de las partículas virales, así como el empaquetado del genoma de RNA. (16)

1.1.3.1.3. Proteína de envoltura: es otro componente clave en la estructura del virus. Está formada por 75 aminoácidos y tiene carga positiva; su estructura primaria aún no ha sido dilucidada. Dentro de la célula la proteína E forma un canal a través del aparato de Golgi,

mediante la vesiculación de las partículas virales y su liberación al exterior. (17)

1.1.3.1.4. Proteína de nucleocápside: es el componente proteico más prominente de la envoltura vírica. La proteína N es la responsable de la unión entre el genoma del virus y su encapsulamiento dentro del complejo de ribonucleoproteínas (RNP). Adicionalmente, estudios han encontrado que la proteína N interfiere con los RNA de interferencia, como un supresor de la respuesta antiviral celular. Respecto a su estructura, la proteína N consiste de tres regiones: el extremo N terminal, la relación de unión central (LKR), el dominio estructural N (NTD), el dominio estructural C (CTD) y la terminación C. (17)

1.1.3.2. Ciclo de vida y patología

El SARS-CoV-2 es altamente infeccioso; su número de reproducción básica (R_0), oscila entre 1.4 y 3.9; lo que indica que, por cada persona infectada, hasta 3 o 4 personas pueden contagiarse con la enfermedad. Además, el periodo de incubación se extiende hasta los 8 primeros días después del contacto y su presencia no genera síntomas visibles en personas jóvenes. A pesar que se han reportado estudios donde se observa que el SARS-CoV-2 podría transmitirse por medio de heces, o flujo aéreo; el medio más efectivo de ingreso es el tracto aéreo-digestivo superior. (10)

El coronavirus tiene dos formas de ingresar a las células del huésped. La primera es a través de la interacción directa con las células huésped por medio del receptor ECA2. El segundo mecanismo involucra la interacción entre la proteína de unión del virus y el receptor de superficie humano ECA2; este proceso inhibe vías inflamatorias innatas, deteniendo el proceso de reclutamiento de células inmunes y disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1. Al mismo tiempo, el bloqueo de la vía renina-angiotensina a la que está asociado ECA2 impide la regulación de los niveles de Angiotensina II, lo que induce a daño pulmonar, fibrosis e hipertensión. El dominio RBD de la proteína Spike es el punto de anclaje, que se une al receptor ECA2 y permite el ingreso del virus a la célula huésped. Una vez en el interior, el RNA viral

se une a los ribosomas del huésped, los cuales son traducidos en dos poliproteínas. El corte posterior de las mismas por medio de las proteínas tipo papaína (PLpro) y la proteasa principal (Mpro) permite la separación de las proteínas estructurales, y la replicación viral. (11)

Patológicamente, el virus tiene un desarrollo diferenciado en pacientes dependiendo de su condición física, enfermedades subyacentes, sexo y edad. En sus etapas tempranas, asintomáticas, o poco sintomáticas; se presentan una serie de cambios inespecíficos dentro de los cuales pueden observarse: edema pulmonar, hiperplasia micronodular neumocitaria multifocal (HMNM) e infiltrado inflamatorio. A medida que la severidad aumenta, se ha observado la formación de una membrana hialina a nivel de los alvéolos pulmonares, evidencia del daño tisular. Sin embargo, son los exudados fibro-mucoides con la obstrucción mucosa de los bronquiolos la que ha sido observada en pacientes con terapia de oxígeno. Los casos más severos presentan un Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (ARSD), síndrome de disfunción múltiple de órganos y alta mortalidad. (2)

1.1. El inflammasoma NLRP3

1.1.1. Definición y estructura

La inflamación es parte de los mecanismos de defensa del organismo, necesario para la activación de respuestas inmunológicas celulares y humorales. Sin embargo, un estado de inflamación continua puede llevar a daño tisular y fibrosis de tejidos, por lo que el sistema inmunológico buscará la desinflamación del sistema pasado el proceso agudo de la enfermedad. Por este motivo, diversas enfermedades están asociadas a una inflamación crónica. Dentro de la respuesta inmunológica, la inmunidad innata es activada inicialmente por el contacto de patrones asociados al patógeno con células inmunes como los macrófagos y las células dendríticas. La respuesta inflamatoria inicial conlleva a la activación de la inmunidad adaptativa. Esta activación es mediada por la producción de citocinas y quimiocinas, que activan a otras células inmunitarias circundantes y reclutan más leucocitos al sitio de infección. (19)

Dentro de los mecanismos de inflamación se encuentra el Inflammasoma proteína 3 con dominios NOD, LRR y pirina (NLRP3). El inflammasoma NLRP3 pertenece a los

receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) de la inmunidad innata. Este complejo pertenece a la familia de los receptores tipo NOD (NLR) y promueve la respuesta inmunológica contra infecciones microbianas. NLRP3 es un mediador del procesamiento y maduración de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β y de la Caspasa-1, la cual induce la muerte celular como respuesta a patógenos intracelulares. (20) Aunque existen diversos tipos de inflamasoma, el inflamasoma NLRP3 es uno de los más estudiados y también de los más específicos e importantes en la mediación de la respuesta del huésped ante una infección viral.

Estructuralmente, el inflamasoma NLRP3 está formado por tres proteínas: la NLRP3, la proteína ASC y la procaspasa-1. La proteína NLRP3 presenta tres dominios: PYD-NOD-LRRs, los cuales son indispensables para la formación del inflamasoma. El proceso se desarrolla de la siguiente manera: primero se forma un homo-oligomero durante su activación a través de su dominio NOD, seguidamente interactúa con la proteína ASC por medio de su dominio PYD. La proteína ASC interactúa seguidamente con el precursor de la caspasa-1 activa, la procaspasa-1, por medio de su dominio CARD, formando el inflamasoma NLRP3 completo. La activación del inflamasoma se logra a partir de dos señales: la primera es la activación transcripcional de NLRP3, procaspasa-1, y de los genes que codifican los precursores de IL-1 β e IL-18. La segunda señal se da en respuesta a una infección, o señales de estrés asociadas a un daño tisular o celular. También se ha encontrado que NLRP3 puede ser activado por especies reactivas de oxígeno (ROS) o NADPH; o por la liberación de cathepsina B debido a la ruptura de lisosomas celulares. (18)

1.1.2. Vías de Activación

Actualmente, se conocen tres vías de activación del inflamasoma NLRP3: la vía canónica, la vía no canónica y la vía alternativa.

La vía canónica involucra dos pasos: una señal inicial inducida por la estimulación de los macrófagos alveolares mediante las citoquinas IL-1 β o TNF α , los cuales son reconocidos por el receptor tipo Toll (TLR) de macrófago, induciendo la activación de NF- κ B, promoviendo la expresión de NLRP3. Igualmente, la señal inicial induce

modificaciones post-transduccionales de NLRP3, necesarias para su activación. Posteriormente, el inflamasoma es activado por diversos estímulos: ATP, nigericina, gramicidina, toxinas bacterianas y materia inorgánica. La regulación iónica es un punto clave en la activación del NLRP3 por vía canónica; el flujo de potasio es inducido por casi todos los estímulos activadores del inflamasoma, y una liberación del mismo al medio extracelular conduce a un cambio conformacional del NLRP3 inactivo. Otro cambio iónico es el influjo intracelular de sodio, aunque por sí solo no activa el inflamasoma.

Por otro lado, la vía no canónica es indicada por lipopolisacáridos intracelulares (LPS), que son reconocidos por la caspasa-4 y caspasa-5 en humanos. Esta activación es producto de la liberación de potasio intracelular, como en el caso de la vía canónica. Finalmente, la vía alternativa se inicia por la estimulación con ligandos de los TLRs. Sin embargo, la vía alternativa se diferencia de las otras ya que la activación del inflamasoma NLRP3 es independiente del eflujo de iones de potasio. Igualmente, esta estimulación parece ser selectiva. Por ejemplo, la estimulación de los receptores TLR2 y 4, induciendo la secreción de IL-1 β , lo cual no ocurre en macrófagos o células detríticas. La activación de NLRP3 por la vía alternativa también es activada en infecciones virales vía la Caspasa-8. (19)

1.1.3. Rol en enfermedades

Como mencionado al inicio de este apartado, una inflamación crónica conlleva a daño tisular; y, en consecuencia, muchas enfermedades crónicas están asociadas a una inflamación persistente. Una activación incorrecta del inflamasoma NLRP3 puede contribuir a la aparición y progresión de enfermedades asociadas con cuadros inflamatorios crónicos como las alergias, arteriosclerosis, esclerosis múltiple y enfermedades metabólicas como la diabetes de tipo 2. (3)

1.1.4. Rol en infección por SARS-CoV-2

Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos de patogenicidad del COVID es el daño tisular a nivel del pulmón, y la disminución de la producción de citoquinas inflamatorias al bloquear receptores celulares como ECA2. Si bien en un principio el Virus SARS-CoV-2 busca evitar la activación de la inmunidad innata, estudios

demuestran que la severidad de la enfermedad está asociada a una inflamación descontrolada que causa daño en el tejido pulmonar en síndromes como ARDS y ALI. Uno de los mecanismos asociados es la tormenta de citoquinas, la cual es la sinergia de varias vías inflamatorias que en consecuencia llenan su proceso exacerbado y . Se caracteriza por una alta producción de IL-6 o TNF- α ; a través de las vías metabólicas asociadas. Una de ellas es El inflammasoma NLRP3, el cual está asociado a la inflamación excesiva durante un síndrome de distrés respiratorio (20) e investigaciones recientes proponen tres vías de activación del inflammasoma en una infección por SARS-CoV-2: el flujo de iones de calcio por medio de la proteína E, el eflujo de potasio y producción de ROS activada por ORF3a, la acumulación de Angiotensina 2 debido al bloqueo del receptor ACE2, la activación vía la cascada del complemento inducida por la proteína N y la posible interacción directa del ORF8b con el inflammasoma vía su dominio LRR.

Por ejemplo, en el caso de la proteína ORF3a, estudios han demostrado su actividad transportadora de iones como el potasio. En la célula huésped, provoca la disfunción de la actividad lisosomal e inicia la producción de Caspasa-1 vía la liberación de iones de potasio. Adicionalmente, se ha observado que la actividad de esta proteína conlleva a la producción de IL-1 β e inducción de la apoptosis, los cuales son resultados de la activación del inflammasoma NLRP3.

De igual manera, la acumulación de AngII es producida por el bloqueo de la actividad de ACE2, el cual es secuestrado y utilizado para la internalización del virus en la célula huésped vía su proteína S, como explicado en un aparato anterior. La acumulación de AngII conlleva a la activación de ATR1, daño pulmonar, y liberación de patrones de daño mitocondrial, los cuales activan al inflammasoma NLRP3. (21)

1.2. Monocitos humanos

1.2.1. Definición

Los monocitos son una población de glóbulos blancos, diferenciados a partir de células progenitoras linfoides y producidos en la médula ósea. Posee un citoplasma pobre en granulocitos, y tiene un diámetro de entre 12 y 20 micrómetros. Se caracterizan por ser mononucleares, tener un núcleo prominente y en forma de riñón. (22) En sangre

periférica, los monocitos no son abundantes, presentándose como máximo 1000 células por microlitro en condiciones fisiológicas normales. (23) Dentro de sus funciones, los monocitos están asociados a la respuesta innata del sistema inmune y son capaces de fagocitar a patógenos y procesarlos para ser presentados a células secundarias como linfocitos. Sus niveles pueden variar a causa de infecciones, trauma, ciertos medicamentos, enfermedades autoinmunes y neoplasias asociadas a la fracción linfoide. Los marcadores de diferenciación en clúster (CD) específicos para monocitos incluyen al CD4, CD11B, CD14, CD16 Y CD33. (22)

1.2.2. Rol Inmunológico

Los monocitos son componentes claves de la inmunidad innata, y tienen funciones fagocíticas y activadoras de otras células inmunológicas. Los monocitos poseen TLRs, los cuales reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de patógenos como microorganismos invasores. Esta activación puede llevar a la diferenciación en macrófagos, los cuales son capaces de fagocitar y procesar a los patógenos circundantes y presentar sus antígenos a linfocitos. Igualmente, migran a la médula ósea para activar otros monocitos, entrar en circulación sanguínea e infiltrar tejidos. La acción de los monocitos se da desde las primeras 12 horas post-infección. Igualmente, los monocitos son capaces de producir citoquinas proinflamatorias que activan la respuesta de otras células de la inmunidad innata como neutrófilos, y células de la inmunidad adaptativa como linfocitos. Al mismo tiempo, tienen capacidad reguladora, ya que pueden producir citoquinas antiinflamatorias durante el proceso de resolución de la inflamación y homeostasis. (22)

1.2.3. Monocitos y su activación en la infección por SARS-CoV-2

La infección por SARS-CoV-2 induce una hiperactivación del sistema inmunológico, caracterizada por una sobreproducción de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF, IL-1 β , entre otras) y quimioquinas (CCL2, CCL3, CXCL10), contribuyendo a un perfil inflamatorio similar a la "tormenta de citocinas". Los monocitos y macrófagos alveolares (MNP) desempeñan un rol central en esta respuesta. Reconocen patrones asociados a daño (DAMP) o patógenos (PAMP) a través de receptores como TLR2, TLR4 y lectinas, activando la producción de citocinas inflamatorias sin permitir replicación viral efectiva.

En casos graves de COVID-19, los monocitos activados y movilizados por las quimiocinas infiltran los pulmones, reemplazando macrófagos residentes por derivados inflamatorios. Este cambio agrava la inflamación, promoviendo infiltración de células inmunes y daño tisular. Dentro de los cambios observados en monocitos periféricos, se observa una reducción en la expresión del HLA-DR, y la expresión de fenotipos inflamatorios (CD14+ y CD16+), los cuales han sido asociados con supresión inmune y aumento de mediadores inflamatorios.

Adicionalmente, estudios en ciencias transcriptómicas revelaron patrones específicos: pérdida de monocitos no clásicos, expresión elevada de genes inflamatorios en macrófagos pulmonares (IL1 β , IL6, TNF) y un estado hiperactivo en monocitos circulantes. Además, cambios metabólicos, como glicólisis elevado y acumulación lipídica, favorecen la replicación viral y producción de citocinas. Estos datos destacan la relevancia de las interacciones huésped-patógeno y abren vías para intervenciones terapéuticas dirigidas al control de la inflamación y metabolismo de las MNP. (24)

1.3. El miRNA-133b

1.3.1. Definición

Los miRNAs son un tipo de RNA no codificante, que fueron descritos por primera vez en *Caenorhabditis elegans* como reguladores endógenos de genes, los cuales controlaban el desarrollo embrionario. Posteriormente, se descubrió que estas secuencias se encontraban de manera general en organismos eucariotas, como plantas y mamíferos, y que existían múltiples variantes con secuencias diferentes (25). En la actualidad, se sabe que los miRNAs representan al menos el 1% de los genes predichos en especies como nematodos, insectos y mamíferos (26).

La estructura de los miRNAs es dinámica. En el genoma, son secuencias que pueden extenderse hasta los 300 pb, siendo su forma activa de unos 25 pb de largo aproximadamente (27). De manera similar, la ubicación de las secuencias de miRNA en el genoma es variable, pudiendo encontrarse separadas en regiones no codificantes o dentro de genes en la región intrónica. Esto implica que los miRNAs son capaces de

expresarse con o sin la presencia de un promotor, sin necesidad de duplicarlo cerca de su secuencia (25). Los miRNAs son capaces de regular la expresión de genes y de otros miRNAs. Al mismo tiempo, un mRNA puede ser regulado por diferentes miRNAs dependiendo del estímulo que haya inducido la expresión de un determinado miRNA. De igual manera, un solo miRNA puede modular la expresión de diversos mRNA. Esto se debe a que el sitio de reconocimiento del complejo de corte para los mRNA consiste en motivos conservados evolutivamente, ubicados en la región no traducida (UTR) de los extremos 3' y 5' del gen (26). Algunos de estos motivos son denominados Kbox, Brd box, GY box, entre otros. Además, se ha encontrado que los genes con regiones UTR3' largas tienen una alta densidad de sitios de unión para los miRNAs y están involucrados en regulaciones fundamentales del desarrollo (27).

El mecanismo de activación de los miRNAs comprende la expresión, el plegamiento y la modificación postranscripcional de las secuencias para que sean funcionales. Inicialmente, el miRNA se transcribe igual a un RNA mensajero, generando una caperuza 5' y una cola de poliadenilación. Posteriormente, se lleva a cabo el proceso de maduración, donde el miRNA adquiere una forma bidimensional o plegada, y es cortado por una ribonucleasa llamada Drosha. La estructura resultante se denomina pri-miRNA, el cual recibirá un segundo corte en la horquilla terminal de la estructura, dando como resultado una estructura doble cadena de emparejamiento incompleto denominada Dicer. Finalmente, la secuencia doble de miRNA se separa para formar un complejo con otras proteínas, denominado el complejo miRISC, el cual se encarga de la degradación del RNAm blanco, evitando su traducción y modulando la expresión del gen asociado (25).

A pesar de su importancia en procesos biológicos y patológicos, los miRNAs no son fáciles de predecir o ubicar dentro de una región del genoma (28), y su potencial uso como mecanismo terapéutico ha llevado al diseño de diferentes mecanismos de inclusión y expresión celular por ingeniería genética, en tejidos donde aparentemente un determinado miRNA no se produce (29). Actualmente, existen mecanismos bioinformáticos para predecir la posible generación de miRNAs para un grupo determinado de genes; sin embargo, su pequeño tamaño da lugar a una alta tasa de falsos positivos. Además, los mecanismos de activación de la generación de estas moléculas

corresponden a una red compleja de estímulos y proteínas, la cual aún está en estudio (27).

1.4.2. Estructura del miRNA 133b

Este microRNA se encuentra codificado de forma natural a nivel del cromosoma 6, orientado del centrómero hacia el telómero, tiene una secuencia precursora de 119 pares de bases y una secuencia madura de 22 pares de bases; y pertenece a la familia de microRNA 13e. Dentro de los cuales también tenemos a miRNA133a1 y miRNA133a2. (30) Igualmente, es parte de los denominados myomiR, miRs canónicos que tiene funciones cruciales en la regulación del desarrollo muscular a través de diferentes especies. (31)

1.4.3. Funciones

La expresión del miRNA-133b ha sido relacionada con diversos procesos patológicos, tanto en su progresión como en su inhibición, lo que implica una función dual de este miRNA, dependiendo de los genes blanco y sus respectivas funciones. Diversos estudios reportan que la expresión del miRNA-133b se encuentra inhibida en la poliposis adenomatosa (32), cáncer pulmonar (33; 34), osteosarcomas (35), carcinoma hepatocelular (36), cáncer colorrectal (37), cáncer esofágico (38), cáncer de próstata (39) y carcinoma renal (40). Adicionalmente, el miRNA-133b ha sido descrito en estos estudios como un potencial biomarcador de severidad, malignidad y como un posible supresor tumoral (41). De igual manera, se ha relacionado la sobreexpresión de este miRNA con la proliferación celular, especialmente en pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos terapéuticos como hepatectomía (42), trasplante de células mononucleares de médula ósea para el tratamiento de paro isquémico (43), así como con la modulación de la expresión de hormonas como la testosterona (44).

Por otro lado, el miRNA-133b ha sido asociado con la regulación de procesos inflamatorios patológicos, modulando la expresión de proteínas relacionadas con procesos de inflamación. Por ejemplo, mientras se ha encontrado que el miRNA-133b contribuye a la patogénesis de la esclerosis sistémica (45), la expresión de miRNA-133b

mediante estrategias de ingeniería genética ha demostrado mejorar los síntomas asociados a enfermedades inflamatorias como patologías asmáticas (46), fibrosis cardiaca (47) y rinitis alérgica (48), lo que sugiere que, en el contexto de inflamación, el miRNA-133b podría tener actividad inmunomoduladora.



CAPÍTULO II METODOLOGÍA

2.1. Ubicación espacial y temporal

2.1.1. Ubicación espacial:

Laboratorio H-400 en la Universidad Católica de Santa María – Arequipa.

2.1.2. Ubicación temporal:

El estudio se realizó entre los años 2022 y 2024

2.2. Unidades de estudio

Monocitos de sangre periférica provenientes de voluntarios sanos, cultivados en laboratorio; transfectados para la producción del miRNA 133-b, e infectados con el virus SARS-CoV-2, para observar su respuesta inflamatoria.

2.3. Metodología

2.3.1. Aislamiento, cultivo y mantenimiento de virus SARS-CoV-2

2.3.1.1. Consideraciones de bioseguridad:

El aislamiento, cultivo y manipulación del virus SARS-CoV-2, fueron realizados dentro del área BSL3 del laboratorio H-301 de la Universidad, siguiendo las consideraciones de bioseguridad de acuerdo a los lineamientos de la OMS. Brevemente, los materiales de cultivo humano y trabajos de biología molecular se realizaron fuera del ambiente BSL-3. Para el aislamiento y cultivo de los monocitos primarios, la transfección celular y el ensayo del inflammasoma, se trabajó en esterilidad, utilizando una cabina de bioseguridad Nivel 2. Para el cultivo, aislamiento y tratamiento, se trabajó en un ambiente de seguridad nivel 3, en el cual

se buscó proteger al operario completamente, utilizando un respirador con filtro, presión negativa y los equipos de protección necesarios para una amenaza biológica. El virus fue tratado y neutralizado antes de que pudiera salir del ambiente BSL-3 para los estudios de IFA, la lectura de placas fluorescentes y lectura de playas de lisis con Hipoclorito de sodio al 5% o Paraformaldehído al 4%, dependiendo del protocolo.

2.3.1.2. Aislamiento del virus SARS-CoV-2:

Para la obtención del virus SARS-CoV-2, se tomó la muestra nasofaríngea de un paciente con diagnóstico positivo para COVID-19, la cual fue inoculada en el cultivo primario de células pulmonares obtenidas a partir de una muestra de líquido pleural, e incubadas en medio de cultivo (DMEM, FBS 10%) a 37°C, 5% CO₂. Se mantuvo a las células infectadas en observación constante, hasta evidenciar los daños histopatológicos asociados a la enfermedad. La presencia de virus se verificó por RT-qPCR, y el virus se mantuvo activo mediante la lisis de las células y pasaje a un cultivo nuevo. (48)

2.3.1.3. Obtención de stock viral:

Para la creación del stock viral, se tomó el lisado de células pulmonares infectadas. Para la separación del debris celular, se realizó una centrifugación a 7000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se realizaron alícuotas de 500 uL del sobrenadante y se colocaron en tubos Eppendorff de 1,5 mL de capacidad estériles, los cuales fueron conservados a -80°C hasta la determinación de MOI o su uso en los ensayos subsiguientes. (34)

2.3.1.4. Determinación de MOI:

Para el uso del virus, es necesario establecer la cantidad de partículas infecciosas en relación al número de células, o MOI. El MOI fue determinado por una titulación viral, utilizando la técnica de playas de lisis. (31) Para ello, se tomó una de las alícuotas de stock viral, se descongeló en un thermoblock a 37°C y se realizaron diluciones seriadas ($1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$, $1/10^6$, $1/10^7$) con medio DMEM, FBS 5%.

Luego, 100 uL de las diluciones fueron colocadas en una placa de 24 pozos con un cultivo de células pulmonares a una confluencia del 90%. Para el ensayo, se tomó 100 uL del stock viral como control positivo y dejó una placa sin infectar como control negativo. Las placas infectadas fueron incubadas por 1 hora a 37°C, CO₂ 5%. Luego de la incubación se procedió a eliminar el medio de infección, y fue reemplazado por medio DMEM, suplementado con FBS al 10%, y agarosa al 3%; seguidamente, la placa se dejó incubar por 4 días. Para la observación de las placas de lisis, se tomó la placa y se agregó formaldehído (PAF) al 4%, se incubó por 30 minutos y se eliminó la capa de medio gelificada. Luego se tiñó el fondo de los pozos con una solución de cristal violeta en PBS al 5%. Las placas de lisis o vacíos de color observados fueron contados, se aplicó la fórmula para hallar el número de unidades formadoras de colonias (PFU) y el MOI correspondiente. (32)

2.3.2. Activación del inflammasoma NLRP3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos.

2.3.2.1. Aislamiento y cultivo primario de monocitos humanos:

Para la obtención de monocitos humanos de sangre periférica se tomaron muestras de sangre humana por punción venosa a un volumen total de 7 mL en un tubo Vacutainer con heparina. Las muestras de sangre fueron diluidas con PBS en una ratio de 3:6. Luego, las muestras fueron colocadas en un tubo falcon de 50mL con 8 mL de Ficoll-Paque (Healthcare) estéril; luego fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Luego, las capas de glóbulos blancos se separaron en un tubo de 15 mL y se lavaron con PBS estéril. Las células fueron contadas utilizando una cámara de NewBauer y luego colocadas en placas de cultivo de 6 pozos y cultivadas con medio RMPI-1640 (Gibco) sin FBS durante 2 a 4 horas. Seguidamente, se realizaron lavados con PBS estéril para eliminar otras células no adheridas y se conservó en cultivo de monocitos en medio DMEM (Gibco), suplementado con 10% FBS inactivado por calor y Estreptomicina durante un máximo de 48 horas. (20)

2.3.2.2. Infección por SARS-CoV-2:

Para la infección, tanto de las placas de 6 pozos para el IFI y las placas de 96 pozos para la determinación de producción de caspasa-1, se utilizó un MOI de 0,01 para un promedio de 2.0×10^6 células. Seguidamente se verificó el proceso de infección a través de la observación de efectos citopatológicos y por medio de IFI en caso de las placas de 6 pozos. (49)

2.3.2.3. Evaluación de la expresión de ACE2 y Spike por inmunofluorescencia indirecta (IFI):

Otros autores han demostrado que los monocitos pueden ser infectados por el virus SARS-CoV-2, ya que expresan la proteína ACE2 en su superficie. (24) En ese sentido, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta para el marcaje del ACE2 perteneciente a los monocitos, así como la proteína Spike1 al momento del ingreso y proliferación del virus. Para ello, se cultivaron monocitos humanos sobre láminas portaobjetos dentro de una placa de 6 pozos. Seguidamente, estos fueron infectados por SARS-CoV-2 a un MOI de 0.1 con una incubación escalonada de 1 a 2 horas. El proceso de ingreso se detuvo agregando PAF al 4%, se dejó incubar por 30 minutos y luego se lavó con PBS.

Las láminas fijadas fueron extraídas del BSL-3 y marcadas inmunológicamente. Las láminas se incubaron en primer lugar con una solución de permeabilización, luego con una mezcla de anticuerpos primarios específicos para cada proteína; finalmente, se hizo un marcaje con anticuerpos conjugados con una molécula fluorescente para su observación al microscopio ZOE de BioRad.

2.3.2.4. Determinación de la activación del Inflamasoma NLRP3:

Con el objetivo de definir la activación del inflamasoma NLRP3, se contabilizó la producción de caspasa-1 a partir de la procaspasa-1, el cual es un producto del proceso de inflamación y participa en el proceso de piroptosis y muerte celular. Esta medición se realizó por medio de una prueba de ELISA. En primer lugar, los monocitos humanos se aislaron y cultivaron en una placa de 96 pozos, se hizo una infección con SARS-CoV-2 por 2 horas, y una incubación por 12, y 24 horas. La

medición de ELISA fue realizada de acuerdo al protocolo correspondiente al sistema Glo 1-inflammasome assay (Promega) y leído en el lector de placas Varioscan-Lux (Thermofisher). (42) Se utilizó la activación por ATP+LPS como control positivo. (50)

2.3.3. Evaluación del efecto del miRNA-133b en la activación del inflammasoma NLRP3 causada por una infección por SARS-CoV-2

2.3.3.1. Preparación del miRNA 133-b:

La secuencia del miRNA 133-b fue obtenida de la base de datos NCBI. Se diseñaron primers para la obtención de múltiples copias del mismo por PCR. El producto de PCR fue entonces purificado y tratado con enzimas de restricción, y con la ligasa T4, para su adecuación e ingreso en el plásmido pCMV-MIR (51), el cual contiene un promotor de alta expresión, así como el sistema de expresión para miRNAs, acoplado a una etiqueta fluorescente verde (iRES-GFP). El plásmido fue transformado por thermoshock en bacterias E. coli TOP-10 competentes, y luego se hizo una selección de clones positivos que contengan el plásmido correctamente ensamblado. La selección se realizó por una resistencia a kanamicina, y la verificación de clones positivos se realizó por PCR de colonias. (52) Seguidamente, el plásmido fue concentrado por medio de una MiniPrep: se realizó un cultivo de una cepa positiva ideal y se extrajo el plásmido por extracción de DNA plasmídico (53).

2.3.3.2. Transfección de linfocitos humanos con el miRNA 133-b por medio de lipofección:

Para la transfección de los monocitos humanos se utilizó la técnica de lipofección. (54) Se incubaron macropartículas lipídicas (Lipofectamine ThermoFisher) con el plásmido que contiene la maquinaria de expresión del miRNA 133-b. Se hizo un cultivo primario de monocitos como descrito anteriormente. Se realizó una mezcla entre el 0,5 ug del plásmido con 5 uL de la Lipofectamina en 50 uL de medio de cultivo sin FBS, se agregó un adicional de 200 uL para la transfección. Se agregó

los 200 uL de la mezcla de transfección a las células e incubar las células durante 4 horas. En una primera instancia, se verificó la transfección exitosa por la presencia de la etiqueta GFP, se realizó una optimización para obtener al menos un 80% de células transfectadas.

2.3.3.3. Infección de linfocitos transfectados con SARS-CoV-2 y medición de Caspasa-1:

Finalmente, para determinar la efectividad del miRNA 133-b en la activación del inflammasoma NLRP3, se hizo una infección de las células transfectadas con el virus SARS-CoV-2 a un MOI de 0,01. Después de una incubación de 12 y 14 horas, se realizó una medición de la producción de la Caspasa-1 por medio de una lectura de ELISA descrita anteriormente. Los datos obtenidos se compararon con los datos obtenidos ante una infección sin la presencia del miRNA 133-b.

2.3.4. Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron recolectados como unidades de fluorescencia, las cuales se compararon con los valores del control positivo y negativo por medio de la prueba estadística Mann-Whitney para pruebas no paramétricas (55), con un nivel de significancia del 95% en el programa estadístico SPSS v.25 (IBM, USA).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento y cultivo primario de monocitos humanos:

El aislamiento de monocitos a partir de sangre periférica se basa en la separación de PBMCs por su baja densidad frente a un gradiente de Ficoll. Para separar los monocitos primarios viables se hizo uso de su capacidad de adhesión (37), se sembraron por 2 horas en placas de cultivo y se realizaron lavados hasta eliminar los eritrocitos y linfocitos remanentes. Adicionalmente, se realizó una optimización del proceso de extracción y lavado a partir de la viabilidad de las células obtenidas. Se evaluó el volumen de siembra para una placa de 96 pozos; volumen de 100 y 200 μ L; y la solución de extracción: PBS 1X y medio RPMI sin FBS. La viabilidad se evaluó utilizando azul de trypan en células fijadas por PAF al 4% como descrito por (40). Se compararon dos parámetros: volumen de lavado y solución de sustracción para aumentar la viabilidad.

A partir de esos resultados, se realizó el análisis estadístico para la optimización del proceso de extracción en función de la viabilidad (Tabla 1). Para determinar la naturaleza normal de los datos, se realizó el test de normalidad de Shapiro Wilk (42) dando como resultado un valor P de 0.062, el cual es mayor al valor límite de 0.05, por lo que se demuestra que la población tiene una distribución normal. Seguidamente se realizó una prueba de t-student para comparar los parámetros de extracción.

Tabla 1: Análisis estadístico de los parámetros de optimización para la extracción de monocitos primarios a partir de sangre periférica. Fuente: elaboración propia

Datos	Normalidad Estadístico	Normalidad Valor-p	Significancia
Volumen	0.936	0.062	No significativo

Medio	0.938	0.075	No significativo
Comparaciones	t-student	Valor P	Significancia
100 uL x 200 uL	2.34	0.026	Significativo
PBS x RMPI	-3.61	0.001	Muy significativo

Para la comparación entre los volúmenes de siembra de las células, se obtuvo un valor P de 0.026 por lo que se determinó que existía una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad de los monocitos primarios en función del volumen de siembra. El volumen de siembra de 100 uL por pozo presentó un promedio de viabilidad mayor, por lo que se consideró como el parámetro optimizado (Figura 1).

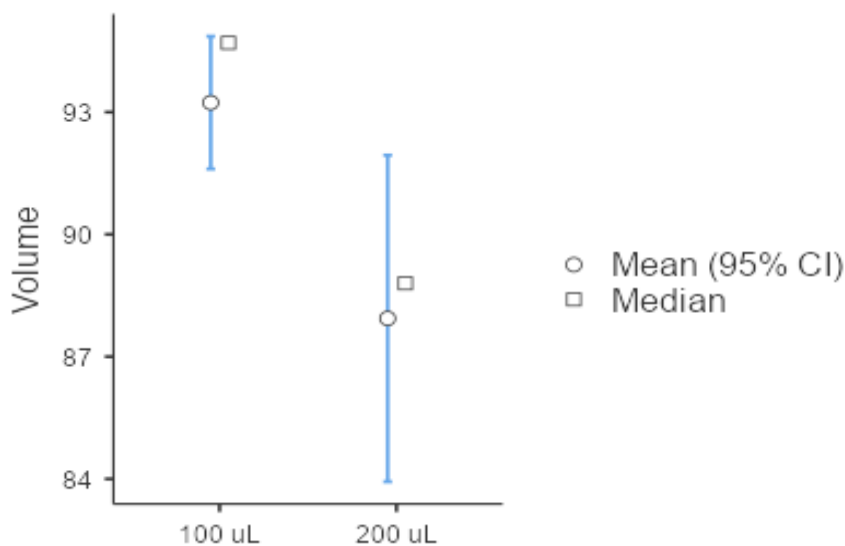


Figura 2: Comparación de volúmenes de siembra de monocitos primarios Fuente: elaboración propia

Para la comparación entre los medios de extracción, se obtuvo un valor p de 0.001 por lo que se determinó que existía una diferencia significativa en la viabilidad de monocitos primarios en función del medio de extracción. La solución de PBS 1X presentó un promedio mayor que el medio RPMI incompleto, por lo que se consideró como el parámetro optimizado (Figura 2).

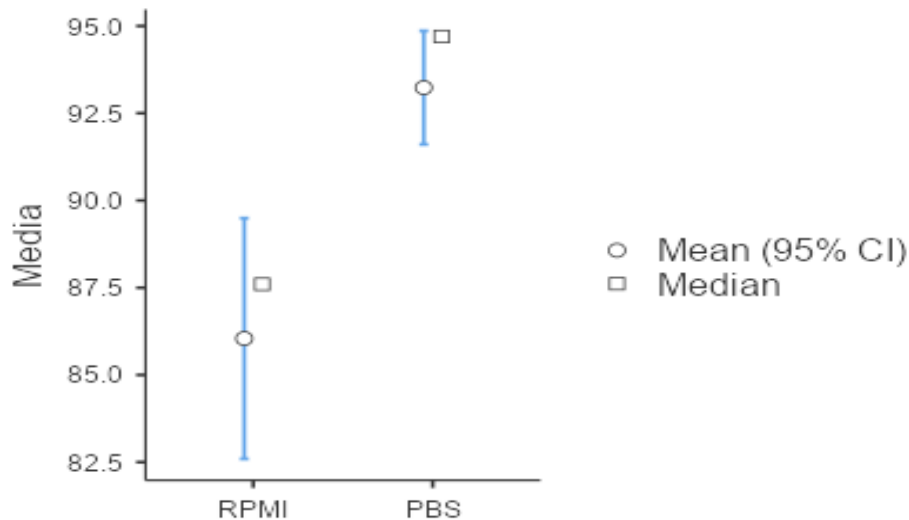


Figura 3: Comparación de medios de extracción para monocitos primarios Fuente: elaboración propia

3.2. Aislamiento, cultivo y mantenimiento de virus SARS-CoV-2

3.2.1. Obtención de stock viral:

Para la obtención del Stock viral de Sars-CoV-2, se requirió de un cultivo celular susceptible para infección, traspase y mantenimiento. Debido a que la línea celular VeroE-6 es una línea de origen animal la cual es regulada estrictamente por disposiciones de DIGESA (43); por lo que solamente se consideraron líneas celulares a partir de muestras humanas que expresan el gen ACE2 y hayan mostrado signos citopatológicos ante una infección de SARS-CoV-2. El estudio de Bartolomeo et al; evaluó diferentes líneas celulares en las cuales se pudiera cultivar el virus SARS-CoV-2. Se encontró que la línea MCF-7, derivada del cáncer de mama tenía una respuesta positiva a la infección (56); por lo que se decidió usar dicha línea por su disponibilidad. En la figura 3, puede observarse la comparación entre un cultivo sano (Figura 3.A) y un cultivo infectado por SARS-CoV-2 con signos de patogenicidad (Figura 3.B).

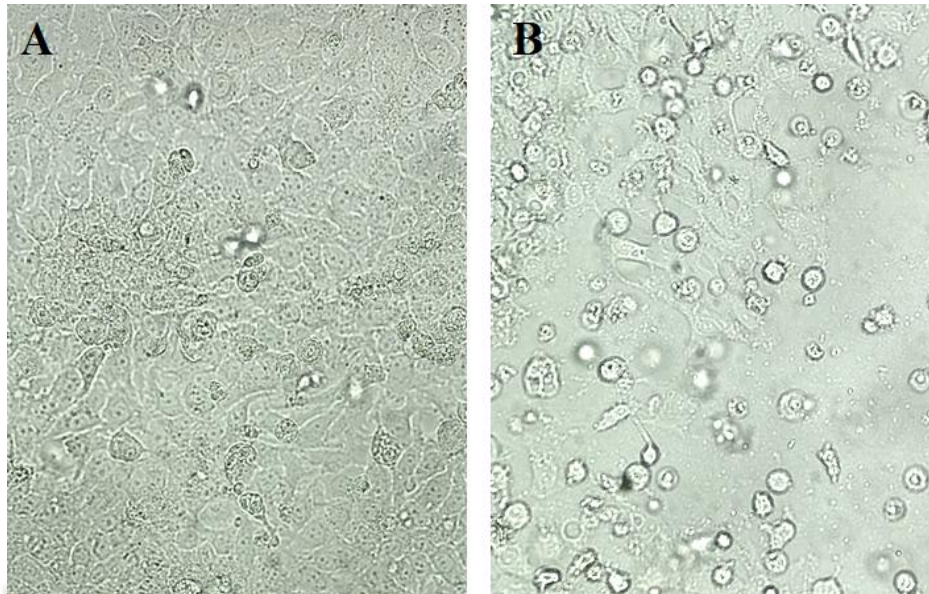


Figura 3: A. Cultivo de MCF-7 normal. B. Cultivo de MCF-7 infectado por SARS-CoV-2 a 3 días de la infección. Fuente: elaboración propia

Para la obtención de los stocks rivales, se cultivó una cepa aislada previamente en el laboratorio de trabajo a partir de un paciente positivo para COVID-19. El stock viral previo se descongeló a 37 °C y se inoculó en una placa de MCF.7 con una confluencia del 80%. Al observar signos citopatológicos se recuperaron las células por raspado y se congelaron en un medio de conservación con glicerol al 15%. Después de congelamiento de stock viral, se procedió a la determinación de MOI por ensayo de placas.

3.2.2. Determinación de MOI:

Para la determinación de MOI, se realizó una infección en una placa de 6 pozos con células MCF-7 con una confluencia del 90% utilizando uno de los viales de stock viral obtenido anteriormente, seguidamente se realizaron diluciones seriadas 1:10 para la inoculación de cada pozo. Después de la fijación y tinción, se realizó el conteo de placas de lisis de las cuales se obtuvieron 47 placas en la dilución de 10^{-5} . Con este resultado se pudo calcular la concentración de PFU/mL y el MOI con las fórmulas descritas para su efecto en literatura (57).

Fórmula 1: Determinación de PFU/mL

$$\frac{PFU}{mL} = \frac{\# \text{ de playas de lisis} \times \text{Factor de Dilución}}{\text{Volumen de inoculación}}$$

$$\frac{PFU}{mL} = \frac{47 \times 10^5}{1}$$

$$\frac{PFU}{mL} = 4\,500\,000 \frac{PFU}{mL}$$

Fórmula 2: Determinación de MOI

$$MOI = \frac{PFU}{\# \text{ de células inoculadas}}$$

$$MOI = \frac{4\,500\,000}{1\,200\,000}$$

$$MOI = 3.75$$

Para el stock viral realizado, se obtuvo una concentración de PFU de 4 500 000 PFU/mL; tomando este valor y sabiendo que se tienen un aproximado de 1.2×10^6 células por pozo se tiene un valor de MOI de 3.75. Los ensayos subsiguientes se trabajarán con un MOI de 0.1.

3.3. Evaluación de la expresión de ACE2 y Spike por inmuno-fluorescencia indirecta (IFI):

De acuerdo a los trabajos realizados por (58, 59); el virus SARS-Cov-2 puede infectar a monocitos primarios obtenidos de sangre periférica. Esto se verificó a través de una tinción de inmuno-fluorescencia indirecta (IFI). Para la tinción de SARS-CoV-2, se utilizó el anticuerpo primario Spike-P en una concentración de 1:500, y un anticuerpo secundario AlexaFuor 594 a una concentración a 1:1000; la tinción de los núcleos celulares se dio con el colorante Hoechst a una concentración 1:2000. En la Figura 4; puede observarse monocitos primarios marcados con el colorante nuclear junto con el color rojo que evidencia la presencia de virus SARS-CoV-2 dentro de los monocitos. Estos resultados se asocian

positivamente con el trabajo de Junquera et al (60), por lo que se asegura el uso de los monocitos partir de sangre periférica.

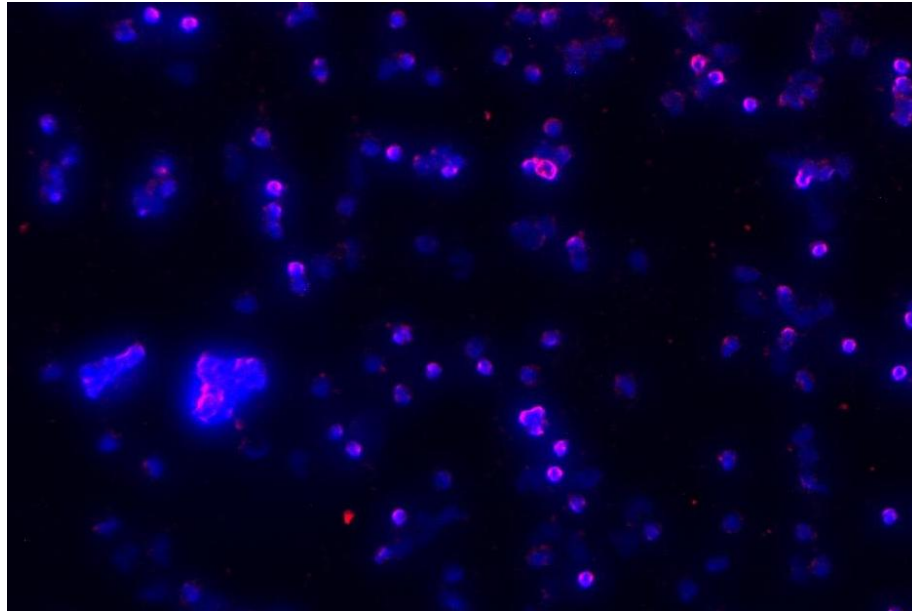


Figura 4. : Cultivo de monocitos primarios obtenidos a partir de sangre periférica infectados por SARS-CoV-2 a 3 días *de la infección*. Fuente: elaboración propia

3.4. Transfección de linfocitos humanos con el miRNA 133-b por medio de lipofección:

3.4.1. Características del plásmido pCMV-MIR 133B:

El plásmido pCMV-MIR 133B es un vector desarrollado para la expresión del MIR-133b en células animales, descrito por primera vez por Zeng et al. (61). Este vector tiene un tamaño aproximado de 7 Kb incluyendo la secuencia precursora del miRNA-133b. La expresión y replicación en células animales es posible gracias al promotor CMV y SV40 ori respectivamente. La replicación en bacterias se da gracias al origen de replicación Fi ori, lo que permite la clonación del plásmido para su uso en la transfección de las células animales. Finalmente, se tienen los antibióticos de selección kanamicina en bacterias, y neomicina en células animales.

3.4.2. Clonación del Plásmido en Bacterias E. coli competentes

Para la obtención de mayor cantidad de copias del plásmido pCMV-MIR 133b, se realizó una clonación en bacterias *E. coli* competentes. Se utilizó una cepa de *E. coli* TOP-10 las cuales se sometieron al proceso de competencia por cloruro de calcio (Referencia); seguidamente fueron transformadas por Shock térmico en presencia de 0.1 ug/uL de plásmido. Las bacterias transformadas se sembraron en un agar nutritivo suplementado con kanamicina a una concentración de 25 ug/mL y se incubó por dos días a 37°C. Las colonias obtenidas fueron seleccionadas y sometidas a una PCR de colonias utilizando los primers VP1.5 (GGACTTTCCAAAATGTCG), y XL39 (GGACAAGGCTGGTGGG) para determinar las colonias positivas. En la figura 5 se puede observar los resultados donde el fragmento de amplificación que incluye al inserto formado por el precursor del miRNA-133b está a 1500 pares de bases en comparación con el marcador de peso molecular.



Figura 5: PCR de colonias de las bacterias transformadas por shock térmico. Fuente: elaboración propia

3.4.3. Optimización de la transfección con lipofectamina

Para la optimización del proceso de transfección se consideraron los dos volúmenes de lipofectamina por muestra sugeridos en el extracto dado por el proveedor (Thermofisher), los cuales fueron 0.15 uL y 0.3 u por pozo para una placa de 96 pozos.

Tomando en cuenta este parámetro, se evaluó la efectividad de la transfección considerando un valor constante de 50 ng de plásmido por pozo. El % de células positivas se determinó contando el número de células fluorescentes gracias al fragmento EGFP presente en el plásmido pCMV-MIR133b. De esta manera, una selección con neomicina a 100 ug/mL permitió conocer las células que internalizan el plásmido obtenido. El análisis estadístico mostró que la población de resultados era de tipo normal (Test Shapiro-Wilk, valor p: 0.44) por lo que se procedió a realizar un test de ANOVA para las muestras. En el caso de la comparación de 0.15 uL y 0.4 uL de volumen de lipofectamina se obtuvo un valor p de 0.788, por lo cual se concluyó que no existía diferencia estadística en la transfección de monocitos periféricos utilizando estos volúmenes. Finalmente se optó por utilizar el menor volumen como optimización. Adicionalmente se evaluaron otros parámetros como el tiempo de incubación entre 24 y 48 horas; y el estado de los monocitos aislados entre suspensión y adhesión a la placa de cultivo. En estos dos últimos ensayos se encontró que no existía diferencia significativa en sus comparaciones, por lo que se concluyó utilizar los métodos con mayor eficiencia de trabajo, siendo en este caso una incubación a 24 horas en células adheridas a los pozos. Los resultados en conjunto pueden visualizarse en la tabla 2.

Tabla 2: Optimización de la transfección con lipofectamina. Fuente: elaboración propia

Datos	Normalidad Estadístico	Normalidad Valor-p	Significancia
24 horas (0.3 y 0.15 uL)	0.951	0.442	No significativo
48 horas (0.3 y 0.15 uL)	0.951	0.448	No significativo
Comparaciones	ANOVA	Valor P	Significancia
0.3 uL x 0.15 uL	0.075	0.788	No significativo

Suspensión adhesión	x	3.054	0.102	No significativo
Incubación 24 horas	x	0.318	0.755	No significativo

3.5. Evaluación de la activación del inflamasoma NLRP3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos.

Para el análisis de la activación del inflamasoma ante una infección con el virus SARS-CoV-2 y posteriormente la evaluación de la capacidad inhibitoria del miRNA133-b se utilizó el kit de detección de inflamasoma Caspase Glo de Promega (Promega, USA) el cual se basa en la medición de un substrato químico luminiscente en función de su corte por la Caspasa-1, producto directo de la activación del inflamasoma.

En primer lugar, los monocitos aislados de sangre periférica y cultivados en placas de 96 pozos con cobertura opaca fueron infectados con 20 uL del Stock viral SARS-CoV-2 a un MOI de 0.01 e incubados por 2 horas antes de la remoción del medio de cultivo (DMEM, 10% de SFB), y reemplazo por medio nuevo. Posteriormente se procedió a la incubación de 24 y 48 horas. Para la medición de Caspasa-1. se siguieron las instrucciones del fabricante. El medio fue reemplazado y se procedió a agregar la mezcla del inhibidor MG-132 y YVAD-CHO a un volumen por pozo de 100 mL. seguidamente, este se agregó a los pozos y se incubó a oscuridad durante 30 minutos para la lectura. Se realizaron tres mediciones cada 30 minutos, escogiendo la medición más estable de controles positivos y negativos como medición final. Los valores obtenidos por el blanco, compuesto únicamente por medio de cultivo y reactivos de detección, se restó de los valores de medición.

Dentro de la medición obtenida, se observó actividad en los pozos con el inhibidor YVAD-CHO (Figura 6), por lo que se procedió a restar este valor a los obtenidos en los pozos de análisis. Los resultados de la activación del NLRP3 por infección de SARS-CoV-2 en linfocitos humanos se evidencian en la Tabla 3. Se observa una producción de luminiscencia alta para el control positivo compuesto por LPS y ATP. (50) Por otro lado, se conserva una producción baja en el control negativo y una producción media para la infección por SARS-

CoV-2. Un análisis estadístico fue realizado para corroborar que la generación de luminiscencia en los monocitos infectados era diferente de aquella del control negativo, pero similar a la del control positivo. El test se realizó con la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney, debido al tamaño de la muestra. Los resultados se observan en la tabla 4, donde se observa que la producción de luminiscencia en el control positivo es estadísticamente diferente al control negativo y a la infección por SARS-CoV-2 a las 24 y 48 horas de incubación ($p=0.021$). Sin embargo, al haber diferencia significativa entre el control negativo y la infección ($P=0.021$) se puede afirmar que hay una activación del inflammasoma NLRP3 y producción de caspasa-1 en los monocitos infectados, pero que es inferior a la activación producida por la mezcla de LPS y ATP; esto puede deberse al valor de MOI utilizado para la infección, por lo que se decidió a proceder con el siguiente experimento a un MOI de 0.1. Estos resultados guardan congruencia con los encontrados en otros trabajos donde se evaluó la activación de la Caspasa-1 en inflamaciones asociadas a SARS-CoV-2, utilizando el Kit Caspase Glo. Kucia et al reportaron una generación de 6000 unidades relativas de luminiscencia (RLU) (62), mientras que de Almeida et al reportaron 8000 RLU (63), y Rodrigues et al 1300 RLU. (64) Finalmente, contrario a estos resultados, en el trabajo realizado por Zeng et al; se reportó 800 RLU. Sin embargo, al ser estadísticamente diferente al control negativo, se consideró como una activación del inflammasoma NLRP3. (65) De Por otro lado, la comparación estadística entre los resultados obtenidos para la infección de 24 y 48 horas de incubación no es estadísticamente significativa ($p=0.083$) por lo que se consideró para los análisis posteriores solamente la incubación a 24 horas para preservar la viabilidad de los monocitos a transfectar.

Tabla 3: Evaluación de la activación del inflammasoma NLRP3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos. Fuente: elaboración propia

Variable	Control positivo		Control negativo		Infección por SARS-CoV-2			
	LPS+ATP				24 horas		48 horas	
Blanco	11027.5	8643.4	3156.0	2039.0	6363.0	9249.0	10292.0	10529.0

100.7	8701.9	7180.9	3496.0	2443.0	8454.0	6497.0	7038.0	7556.0
YVAD-CHO	3465.0	2374.0	2044.0	1707.0	2840.0	2433.0	2038.0	2900.0
Valores ajustados	7562.5	6269.4	1112.0	332.0	3523.0	6816.0	8254.0	7629.0
	5236.9	4806.9	1452.0	736.0	5614.0	4064.0	5000.0	4656.0

Tabla 4: Análisis estadístico de la activación del inflammasoma NLPR3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos. Fuente: elaboración propia

Variable	Media	Mediana	Prueba de Mann Whitney			
			P-value			
			LPS+ATP	Control Negativo	Infección 24hr	Infección 48 hr
Control positivo LPS- ATP	8596.47	8380.7	---	0.021	0.021	0.021
Control negativo	908.5	924.5	0.021	----	0.021	0.021
Infección 24 hr	5004.25	4839.00	0.021	0.021	----	0.083
Infección 48 hr	7879.75	7941.5	0.021	0.021	0.083	----

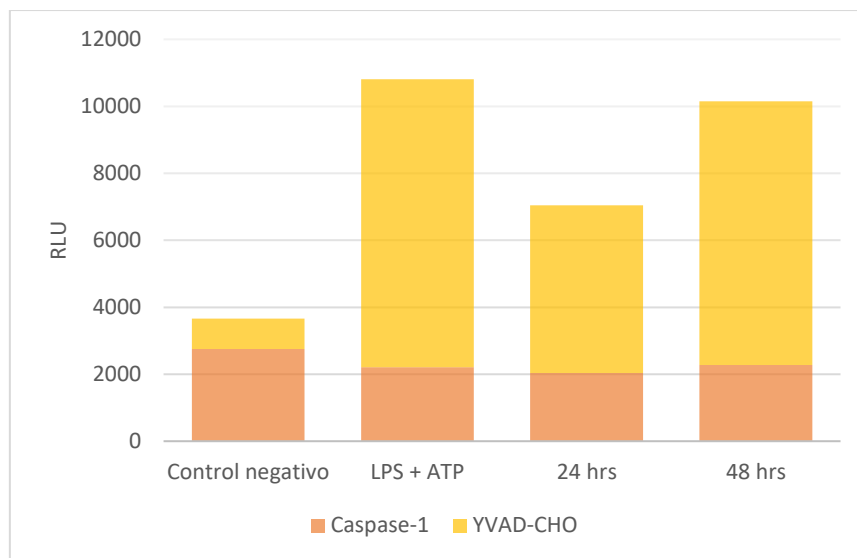


Figura 6: Activación del inflammasoma NLPR3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos. Fuente: elaboración propia

3.6. Evaluación de la actividad inhibitoria del miRNA-133b en la activación del inflammasoma NLPR3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos.

Para el experimento se consideró como control positivo una infección por SARS-CoV-2, y como controles negativos el cultivo de monocitos de sangre periférica sin tratamiento, y los monocitos de sangre periférica transfectados con el plásmido pCMV-MIR133b. El ensayo se realizó con los cambios en el periodo de incubación y la concentración MOI de infección de acuerdo a los hallazgos de la Tabla 3 y 4. El experimento se realizó en dos repeticiones y para la obtención de datos de luminiscencia se realizaron 3 mediciones de las cuales se tomó aquella con mayor luminiscencia. Seguidamente, a los valores obtenidos se restó el promedio del blanco, así como la medición obtenida en los pozos con YVAD-CHO, dando como resultado valores ajustados que fueron comparados por medio de la técnica estadística no paramétrica de Mann Whitney para determinar la diferencia o semejanza estadística entre los grupos de infección y los controles. Los resultados del ensayo se desglosan en la Tabla 5. Al respecto, se observa que existe una menor quimioluminiscencia y por lo tanto menor producción de caspasa-1 en presencia del miRNA-133b. Además, se observa la generación de quimioluminiscencia en el control que contiene únicamente a monocitos transfectados,

por lo que se sospecha que el gen reportero del plásmido utilizado, que contiene una molécula fluorescente verde para la selección de clones positivos, interfiera en cierta medida con la detección de luz en la muestra.

Tabla 5: Evaluación de la actividad inhibitoria del miRNA-133b en la activación del inflammasoma NLPR3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos. Fuente: elaboración propia

	Control negativo	Control positivo	Control miRNA 133b	Infección por SARS-CoV-2			
				Rep1		Rep2	
Blanco 108.15	1918.0	7314.2	5400.0	2333.0	2638.0	2308.1	1709.0
	1921.1	6949.2	2340.0	1858.1	1794.1	2135.4	1589.0
	2709.0	7466.2	5153.0	2427.0	2751.1	2133.0	1863.1
	2009.0	7053.2	2356.0	1978.0	2019.0	2140.2	1513.1
				1456.0	1978.0	1460.0	2318.0
YVAD-CHO	1588.0	464.2	2187	1584.0	1617.0	1535.0	1370.0
Valores ajustados	330.0	6850.0	3213.0	749.0	1021.0	773.1	339.0
	333.0	6485.0	153.0	274.1	177.1	600.4	219.0
	1121.0	7002.0	2966.0	843.0	1134.1	598.0	493.1
	421.0	6589.0	169.0	394.0	402.0	605.2	143.1
				86.0	361.0	0	948.0

Tabla 6: Análisis estadístico de la actividad inhibitoria del miRNA-133b en la activación del inflammasoma NLPR3 por una infección por SARS-CoV-2 en un cultivo primario de monocitos humanos. Fuente: elaboración propia

Variables	Ensayos Media	Mediana	Mann Whitney (p-value)		
			Valor U	p-value	Combinación

Control negativo	551.25	377.00	8.000	1.000	Control miRNA-133b
Control positivo	6731.5	6719.5	0.000	0.021	Control miRNA-133b
Control miRNA-133b	1625.25	1567.50	N.A.		
Tratamiento	524.85	545.50	34.00	0.642	Control miRNA-133b
			40.00	1.000	Control negativo
			0.000	0.002	Control positivo

Con estos resultados se procedió al análisis estadístico, el cual se evidencia en la tabla 6. En primer lugar, se presenta una diferencia significativa entre los monocitos infectados por SARS-CoV-2 únicamente, y aquellos transfectados para expresar el miRNA133-b ($p=0.002$); lo que indica un efecto inhibitor en la generación de la molécula producto de la activación del inflammasoma NLRP3. Estos resultados guardan relación con la comparación entre los monocitos infectados productores del miRNA y el control negativo, con el cual no presenta diferencia significativa ($p = 0.642$). Este resultado indica una similitud entre los valores de monocitos no infectados y aquellos en tratamiento, evidenciando la capacidad inhibitoria del miRNA 133-b. Como descrito en el trabajo de Xiao y colaboradores, el miRNA 133b mostro capacidades inhibitorias en procesos alérgicos, en los cuales la activación del inflammasoma NLRP3 es importante para el proceso inmunológico. (33)

Sin embargo, es necesario resaltar la producción de quimioluminiscencia en el control miRNA133b, el cual corresponde a monocitos transfectados únicamente. El análisis estadístico muestra una diferencia significativa entre dicho control y el control positivo. Sin embargo, no presenta diferencia significativa con los monocitos transfectados. Esto podría indicar una señal de interferencia correspondiente a la fluorescencia generada por el gen reportero del plásmido de transfección. A pesar de ello, se observa que no hay diferencia significativa entre los valores obtenidos en el control negativo y aquellos de los monocitos

transfectados ($p=1.000$), por lo que esta generación de luminiscencia no tendría un impacto en los resultados. No se han encontrado trabajos con un diseño experimental similar, por lo que este resultado podría ser explorado con mayor profundidad por medio de una transfección que permita la recombinación del cassette de expresión del miRNA133b en el monocito en lugar de una expresión transitoria, con el objetivo de eliminar el gen reportero de la célula y observar los resultados sin dicha interferencia.

Por otro lado, se observa una quimioluminiscencia leve causada por YVAD. La molécula YVAD es un inhibidor de Caspasa-1 ampliamente utilizado en literatura (66). Su función en el kit de Caspase-Glo es determinar si el corte del sustrato quimio luminiscente se debe a la acción de Caspasa-1 en caso de que toda la luminiscencia sea inhibida. De acuerdo al proveedor, el inhibidor de proteasas MG-314, es utilizado junto con el sustrato para impedir el corte del mismo por otras enzimas que cumplan dicha función. En el caso de los resultados observados en la tabla 3, se tiene que los controles presentan luminiscencia con o sin YVAD, lo que sugiere la activación de más de una caspasa en el proceso. Existen otras investigaciones las cuales utilizaron el kit de quimioluminiscencia para determinar la producción de Caspasa-1 y activación de NLRP3. En el trabajo de Kim et al; se observan resultados similares, cercanos a las 600 unidades relativas de quimioluminiscencia (RLU) para el inhibidor YVAD-CHO. (67) Los otros trabajos, sin embargo, no mencionan el uso del inhibidor. De acuerdo al fabricante, su uso podría obviarse en caso de utilizar cultivos celulares o líneas transfectadas y caracterizadas, donde la producción de Caspasa-1 es deliberada y no requiere de una calibración. (68) Como en este estudio se utilizó monocitos como cultivo primario, es que no se puede obviar el uso del inhibidor, y la activación residual de otras caspasas es congruente con otros estudios.

Dentro de los hallazgos del proveedor al crear el kit de detección, demostró que la mayor expresión de luminiscencia se daba en caso de la caspasa-1, pero otras caspasas como la caspasa-5 de inflamación, y las caspasas 3 y 6 de apoptosis lograban cortar el sustrato, y no eran afectadas por YVAD, dando valores similares de luminiscencia, aunque inferiores. (69)

Numerosas investigaciones han encontrado asociación entre la activación de caspasas diferentes a la caspasa-1 frente a una infección por SARS-CoV-2. El estudio de Ye et al,

muestra la activación de la caspasa-3 generando una apoptosis mediada por JNK en función de la expresión de la proteína de SARS-CoV-2 ORF-6 (70). De igual manera, otra vía apoptótica en células infectadas con SARS-CoV-2 es la de la caspasa-6, la cual corta parte de la nucleocápside en antagonistas del INF- λ , prolongado el ciclo de vida del virus y promoviendo procesos de inflamación. (71). Igualmente, la activación del inflammasoma NLRP3 y la producción de Caspasa-1, conlleva a su vez a la activación de la vía apoptótica de la Caspasa-3 en células deficientes en Gasdermina D (69), lo que explicaría los resultados encontrados en el presente trabajo. Cabe resaltar que en estudios anteriores relacionando la activación del inflammasoma NLRP3, se utilizaron técnicas enfocadas en la detección directa de Caspasa-1 como Western Blot (72), por lo que no se pudo verificar en esos trabajos la presencia o ausencia de otras vías de inflamación y/o apoptosis derivadas de la infección y mediadas por la generación de Caspasa-1. En ese sentido, este trabajo sugiere la presencia de más vías relacionadas que pudieran tener un papel importante en la formación de la tormenta de citoquinas que conlleva a una inflamación exacerbada.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES

PRIMERA:

Se concluye que existe una activación del inflammasoma NLRP3 en monocitos humanos obtenidos a partir de sangre periférica infectados con el virus SARS-CoV-2, el cual se evidencia en la producción y medición de la Caspasa-1.

SEGUNDA:

Se concluye que se tuvo una efectividad del 40% en la transfección de los monocitos humanos obtenidos a partir de sangre periférica con el plásmido pCMVMIR-133b utilizando la técnica de lipofección.

TERCERA:

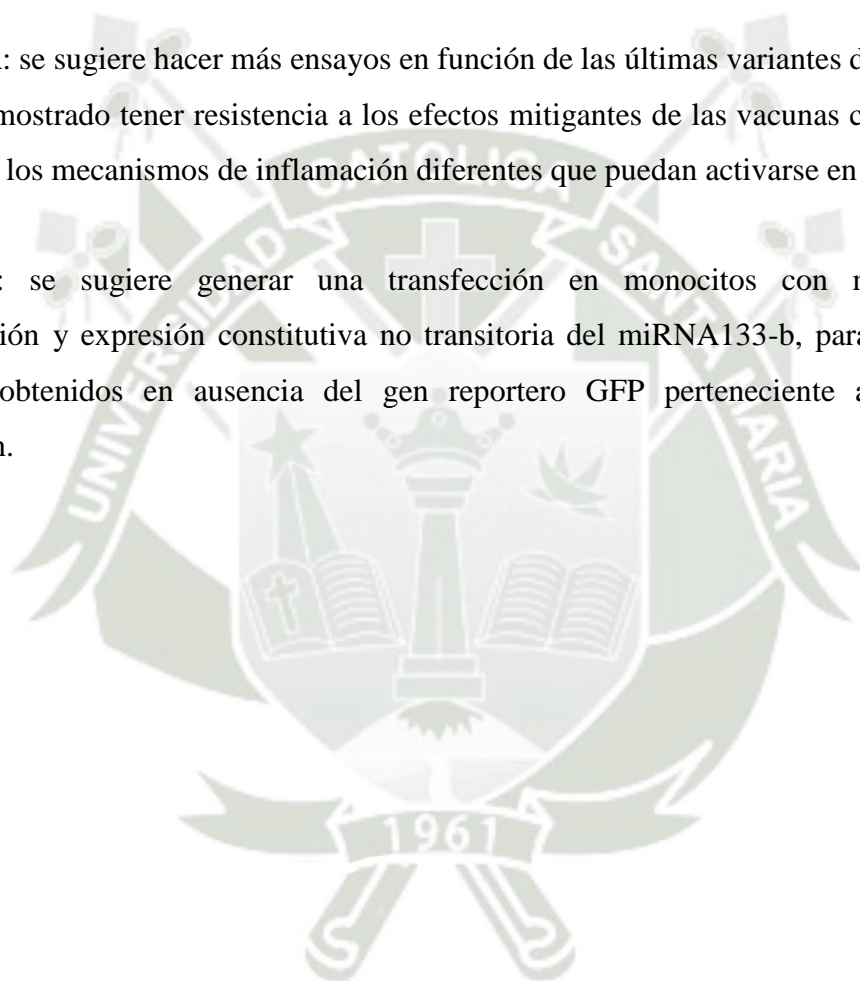
Se concluye que la expresión del miRNA-133b en monocitos humanos transfectados por lipofección ejerce un efecto inhibitorio en la activación del inflammasoma NLRP3 debido a una infección por SARS-CoV-2 en función de la medición de Caspasa-1

RECOMENDACIONES

PRIMERA: se sugiere realizar estudios asociados a encontrar de forma aislada o específica la activación de las otras caspasas presentes en los resultados de quimioluminiscencia, ya sea por WesternBlot o un método similar, para determinar la relación entre la activación del inflammasoma NLRP3 y otras vías de inflamación o vías apoptóticas.

SEGUNDA: se sugiere hacer más ensayos en función de las últimas variantes de SARS-CoV-2 que han demostrado tener resistencia a los efectos mitigantes de las vacunas contra la misma, para definir los mecanismos de inflamación diferentes que puedan activarse en esos casos.

TERCERA: se sugiere generar una transfección en monocitos con mecanismos de recombinación y expresión constitutiva no transitoria del miRNA133-b, para evidenciar los resultados obtenidos en ausencia del gen reportero GFP perteneciente al plásmido de transfección.



REFERENCIAS

1. CDC-MINSA. Situación del COVID-19 en el Perú. 2021. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/covid-19/situacion-del-covid-19-en-el-peru/>
2. Baumann V, Winkler J. miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents. *Future Med Chem.* 2014;6(17):1967-84. doi:10.4155/fmc.14.116.
3. Fusco R, et al. Focus on the role of NLRP3 inflammasome in diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):4223. doi:10.3390/ijms21124223.
4. McGuire A, Brown JAL, Kerin MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer Metastasis Rev.* 2015;34:145–55. doi:10.1007/s10555-015-9551-7.
5. Wang J, et al. The role of miRNA in the Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Osteosarcoma. *Cancer Biother Radiopharm.* 2019;34(10):605-13. doi:10.1089/cbr.2019.2939.
6. Hrach HC, Mangone M. miRNA Profiling for Early Detection and Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci.* 2019;20:4638. doi:10.3390/ijms20184638.
7. Hassan T, McKiernan PJ, McElvaney NG, Cryan SA, Greene CM. Therapeutic modulation of miRNA for the treatment of proinflammatory lung diseases. *Expert Rev Anti-infect Ther.* 2013;10(3):359-68. doi:10.1586/eri.11.175.
8. Mittal A, Chitkara D, Behrman SW, Mahato RI. Efficacy of gemcitabine conjugated and miRNA-205 complexed micelles for treatment of advanced pancreatic cancer. *Biomaterials.* 2014;35(25):7077-87. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.053.
9. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536-44.
10. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses.* 2020;12(4):372.

11. Ning S, Yu B, Wang Y, Wang F. SARS-CoV-2: Origin, Evolution, and Targeting Inhibition. *Front Cell Infect Microbiol* (Internet). 2021 (citado 2025);11:676451. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8248807/>
12. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* (Internet). 2021 (citado 2025);19(3):141-54. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>.
13. Lv JX, Liu X, Pei YY, Song ZG, Chen X, Hu SJ, et al. Evolutionary trajectory of diverse SARS-CoV-2 variants at the beginning of COVID-19 outbreak. *Virus Evol* (Internet). 2024 (citado 2025);10(1):veae020. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ve/veae020>.
14. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* (Internet). 2021 (citado 2025);19(11):685-700. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00630-8>.
15. Zhang Z, Nomura N, Muramoto Y, Ekimoto T, Uemura T, Liu K, et al. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat Commun* (Internet). 2022 (citado 2025);13(1):4399. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-32019-3>.
16. Hardenbrook NJ, Zhang P. A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Curr Opin Virol* (Internet). 2022 (citado 2025);52:123-34. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625721001516>.
17. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol*. 2010;11(5):404-10.
18. Xu J, Núñez G. The NLRP3 inflammasome: activation and regulation. *Trends Biochem Sci* (Internet). 2023 (citado 2025);48(4):331-44. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000422002730>.
19. Grailer JJ, Canning BA, Kalbitz M, Haggadone MD, Dhond RM, Andjelkovic AV, et al. Critical Role for the NLRP3 Inflammasome during Acute Lung Injury. *J Immunol* (Internet). 2014 (citado 2025);192(12):5974-83. Disponible en: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/192/12/5974/92786/Critical-Role-for-the-NLRP3-Inflammasome-during>.
20. Zhao N, Di B, Xu L. The NLRP3 inflammasome and COVID-19: Activation, pathogenesis and therapeutic strategies. *Cytokine Growth Factor Rev* (Internet). 2021 (citado 2025);61:2-15. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135961012100054X>.

21. Espinoza VE, Emmady PD. Histology, Monocytes. En: StatPearls (Internet). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 (citado 2025). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557618/>.
22. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system. 7th ed. London: Churchill Livingstone; 2023.
23. Knoll R, Schultze JL, Schulte-Schrepping J. Monocytes and Macrophages in COVID-19. *Front Immunol* (Internet). 2021 (citado 2025);12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.720109/full>.
24. Schultz IC, Bertoni APS, Wink MR. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Carrying miRNA as a Potential Multi Target Therapy to COVID-19: an In Silico Analysis. *Stem Cell Rev Rep*. 2021;17:341–56. doi:10.1007/s12015-021-10122-0.
25. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* (Internet). 20 de febrero de 2009 (citado 20 de enero de 2025);136(4):642-55. Disponible en: [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(09\)00083-X](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(09)00083-X)
26. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* (Internet). 1 de diciembre de 2009 (citado 20 de enero de 2025);7(4):147-54. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60044-3](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60044-3)
27. Liu Z, Zhao X, Shan H, et al. microRNA-520c-3p suppresses NLRP3 inflammasome activation and inflammatory cascade in preeclampsia by downregulating NLRP3. *Inflamm Res*. 2019;68:643–54. doi:10.1007/s00011-019-01246-8.
28. Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. *Disease Models & Mechanisms* (Internet). 15 de abril de 2021 (citado 20 de enero de 2025);14(4):dmm047662. Disponible en: <https://doi.org/10.1242/dmm.047662>
29. Dasgupta I, Chatterjee A. Recent Advances in miRNA Delivery Systems. *Methods and Protocols* (Internet). marzo de 2021 (citado 20 de enero de 2025);4(1):10. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2409-9279/4/1/10>
30. Zhang Y, Zhang J, Xu Z, Wang C, Lu L, Wang Z, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome with miR-223-3p alleviates inflammation in acute respiratory distress syndrome. *Int Immunopharmacol*. 2020;87:106800. doi:10.1016/j.intimp.2020.106800.

31. Zhu M, Li J, Zhang Z, Zhang P, Duan H, Zhao Y, et al. miR-223-3p regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages during acute lung injury. *Exp Mol Med*. 2021;53(8):1295-307. doi:10.1038/s12276-021-00566-9.
32. Tang H, Cheng X, Zhang W, Hu Z, Ding X, Zhang H, et al. A miRNA-based approach to suppress the NLRP3 inflammasome activation in sepsis-induced acute lung injury. *Shock*. 2021;55(4):512-21. doi:10.1097/SHK.0000000000001677.
33. Xiao B, Liu H, Gu Z, Ji C. Expression of MicroRNA-133 Inhibits Epithelial–Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells by Directly Targeting FOXQ1. *Archivos de Bronconeumología (English Edition) (Internet)*. 1 de octubre de 2016 (citado 20 de enero de 2025);52(10):505-11. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1579212916000185>
34. Li Y, Wang L, Xu Z, Liu Y, Duan L, Du Y, et al. miR-146a modulates the NLRP3 inflammasome activation and alleviates acute lung injury by targeting TRAF6. *Front Immunol*. 2019;10:903. doi:10.3389/fimmu.2019.00903.
35. Makela J, Papageorgiou K, Kallonen A, Harju M, Mikkonen L, Ilves I, et al. miRNA-155-5p regulates the NLRP3 inflammasome in lung inflammation. *J Immunol*. 2020;205(6):1731-42. doi:10.4049/jimmunol.2000504.
36. Luo Z, Fan Y, Liu X, Liu S, Kong X, Ding Z, et al. MiR-188-3p and miR-133b Suppress Cell Proliferation in Human Hepatocellular Carcinoma via Post-Transcriptional Suppression of NDRG1. *Technol Cancer Res Treat (Internet)*. 1 de enero de 2021 (citado 20 de enero de 2025);20:15330338211033074. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/15330338211033074>
37. Wei L, Ren G, Zhang S, Wang Y, Kong X, Zhao H, et al. Effects of miR-125b on NLRP3 inflammasome in ischemic stroke and potential therapeutic implications. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):334. doi:10.1186/s12974-020-01987-9.
38. Fang P, Zhou J, Li X, Luan S, Xiao X, Shang Q, et al. Prognostic value of micro-RNA 375, 133, 143, 145 in esophageal carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Front Oncol (Internet)*. 13 de septiembre de 2022 (citado 20 de enero de 2025);12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.828339/full>
39. Tao J, Wu D, Xu B, Qian W, Li P, Lu Q, et al. microRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells by targeting the epidermal growth factor

- receptor. *Oncology Reports* (Internet). 1 de junio de 2012 (citado 20 de enero de 2025);27(6):1967-75. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2012.1711>
40. Huergo CC, Luna-Gonzalez A, Sanchez-Torres L, Rodríguez-Luna I, Calderon O, Ledezma-Pérez A, et al. The role of miR-155-5p in the regulation of the NLRP3 inflammasome in COVID-19 patients with severe disease. *Front Immunol.* 2021;12:648375. doi:10.3389/fimmu.2021.648375.
41. Lin Y, Lin F, Anuchapreeda S, Chaiwongsa R, Duangmano S, Ran B, et al. Effect of miR-133b on progression and cisplatin resistance of triple-negative breast cancer through FGFR1-Wnt- β -catenin axis. *Am J Transl Res* (Internet). 15 de junio de 2021 (citado 20 de enero de 2025);13(6):5969-84. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8290659/>
42. Silambanan S, Sudhakar P, Ganapathy S, Prabhakar R, Vasudevan G, Rajagopalan R, et al. Expression of miR-29a and miR-214 in acute lung injury and its implication in NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol.* 2021;41(4):753-64. doi:10.1007/s10875-021-00943-w.
43. Wang Q, Liu X, Zhang M, Hu Z, Yang Y, Liu Q, et al. MicroRNA-30c attenuates NLRP3 inflammasome activation and protects against acute kidney injury. *J Immunol.* 2021;206(7):1560-71. doi:10.4049/jimmunol.2000866.
44. Pan C, Fei Q, Jin J, Zheng J, Wu D, Li H, et al. MicroRNA profiling reveals the role of miR-133b-3p in promoting apoptosis and inhibiting cell proliferation and testosterone synthesis in mouse TM3 cells. *In Vitro CellDevBiol-Animal* (Internet). 1 de enero de 2023 (citado 20 de enero de 2025);59(1):63-75. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11626-022-00745-z>
45. Khedr AMB, Shaker OG, EL-Komy MHM, Badr AM, Erfan R. miRNA-133 and lncRNA-H19 expressions and their relation to serum levels of PKM2 and TGF- β in patients with systemic sclerosis. *Non-coding RNA Research* (Internet). 1 de marzo de 2024 (citado 20 de enero de 2025);9(1):253-61. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468054023000951>
46. Rahbarghazi R, Keyhanmanesh R, Rezaie J, Mirershadi F, Heiran H, Saghaei Bagheri H, et al. c-kit⁺ cells offer hopes in ameliorating asthmatic pathologies via regulation of miRNA-133 and miRNA-126. *Iran J Basic Med Sci* (Internet). marzo de 2021 (citado 20 de

- enero de 2025);24(3):369-76. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8087855/>
47. Li Z, Ye Z, Ma J, Gu Q, Teng J, Gong X. MicroRNA-133b alleviates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis and cardiac fibrosis by targeting PTBP1 and TAGLN2. *International Journal of Molecular Medicine* (Internet). 1 de julio de 2021 (citado 20 de enero de 2025);48(1):1-11. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2021.4958>
48. Chen DY, Turcinovic J, Feng S, Kenney DJ, Chin CV, Choudhary MC, et al. Cell culture systems for isolation of SARS-CoV-2 clinical isolates and generation of recombinant virus. *iScience* (Internet). 10 de abril de 2023 (citado 23 de enero de 2025);26(5):106634. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10083141/>
49. Sinha S, Grewal RK, Roy S. Chapter Three - Modeling Bacteria-Phage Interactions and Its Implications for Phage Therapy. En: Sariaslani S, Gadd GM, editores. *Advances in Applied Microbiology* (Internet). Academic Press; 2018 (citado 23 de enero de 2025). p. 103-41. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216418300054>
50. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci* (Internet). 6 de julio de 2019 (citado 23 de enero de 2025);20(13):3328. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6651423/>
51. Origene. MIR133B Human MicroRNA Expression Plasmid (MI0000822) (Internet). Origene.com. (cited 2025 Jan 24). Available from: <https://cdn.origene.com/datasheet/sc400160.pdf>
52. Azevedo F, Pereira H, Johansson B. Colony PCR. En: Domingues L, editor. *PCR: Methods and Protocols* (Internet). New York, NY: Springer; 2017 (citado 23 de enero de 2025). p. 129-39. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5_8
53. Davis AR, Mascolo PL, Quinn MT. Rapid Minipreparation of Plasmid DNA for Screening Multiple Colonies. *BioTechniques* (Internet). enero de 1999 (citado 23 de enero de 2025);26(1):66-8. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2144/99261bm10>
54. Kaestner L, Scholz A, Lipp P. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Internet). 15 de marzo de 2015 (citado

- 23 de enero de 2025);25(6):1171-6. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X1500030X>
55. MacFarland TW, Yates JM. Mann–Whitney U Test. En: MacFarland TW, Yates JM, editores. *Introduction to Nonparametric Statistics for the Biological Sciences Using R (Internet)*. Cham: Springer International Publishing; 2016 (citado 23 de enero de 2025). p. 103-32. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-30634-6_4
56. Xu H, Wang Y, Wang Z, Ye Q, Li Q, Zhang J, et al. NLRP3 inflammasome and its regulatory pathways in infectious diseases: implications for therapeutic development. *J Immunol Res*. 2020;2020:4723841. doi:10.1155/2020/4723841.
57. Li T, Jiang Y, Zhao Y, Hu M, Zhang X, Zhang J, et al. MiR-146b-5p suppresses the NLRP3 inflammasome in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4):1339. doi:10.3390/ijms21041339.
58. Serrano-Bermúdez D, López-Muñoz D, Sánchez-González O, Ramírez-González J, Pérez-Morales M. Role of NLRP3 inflammasome and miRNA-223 in COVID-19 pathogenesis. *Infect Genet Evol*. 2021;87:104622. doi:10.1016/j.meegid.2020.104622.
59. Sharma S, Kundu R, Kumar M, Mishra P, Dubey VK. miRNA in immune responses and the regulation of NLRP3 inflammasome during viral infections. *Viruses*. 2021;13(7):1301. doi:10.3390/v13071301.
60. Junqueira C, Crespo Â, Ranjbar S, Lewandrowski M, Ingber J, de Lacerda LB, et al. SARS-CoV-2 infects blood monocytes to activate NLRP3 and AIM2 inflammasomes, pyroptosis and cytokine release (Internet). Research Square. 2021 (cited 2023 Dec 19). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8366805/>
61. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A (Internet)*. 2003 (cited 2023 Dec 19);100(17):9779–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1630797100>
62. Kucia M, Ratajczak J, Bujko K, Adamiak M, Ciechanowicz A, Chumak V, et al. An evidence that SARS-Cov-2/COVID-19 spike protein (SP) damages hematopoietic stem/progenitor cells in the mechanism of pyroptosis in Nlrp3 inflammasome-dependent manner. *Leukemia (Internet)*. octubre de 2021 (citado 23 de enero de 2025);35(10):3026-9. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41375-021-01332-z>

63. de Almeida L, da Silva ALN, Rodrigues TS, Oliveira S, Ishimoto AY, Seribelli AA, et al. Identification of immunomodulatory drugs that inhibit multiple inflammasomes and impair SARS-CoV-2 infection. *Science Advances* (Internet). 14 de septiembre de 2022 (citado 23 de enero de 2025);8(37):eabo5400. Disponible en: <https://www.science.org/doi/full/10.1126/sciadv.abo5400>
64. Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *Journal of Experimental Medicine* (Internet). 24 de noviembre de 2020 (citado 23 de enero de 2025);218(3):e20201707. Disponible en: <https://doi.org/10.1084/jem.20201707>
65. Zeng J, Xie X, Feng XL, Xu L, Han JB, Yu D, et al. Specific inhibition of the NLRP3 inflammasome suppresses immune overactivation and alleviates COVID-19 like pathology in mice. *eBioMedicine* (Internet). 1 de enero de 2022 (citado 23 de enero de 2025);75. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(21\)00597-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(21)00597-1/fulltext)
66. Lu Y, Sun Z, Li G, Wang L, Zhou X, Zhang Y, et al. Modulation of the NLRP3 inflammasome pathway in critical COVID-19 patients with severe pneumonia. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(7):774-82. doi:10.1038/s41423-020-00455-w.
67. Kim NE, Kim DK, Song YJ. SARS-CoV-2 Nonstructural Proteins 1 and 13 Suppress Caspase-1 and the NLRP3 Inflammasome Activation. *Microorganisms* (Internet). marzo de 2021 (citado 23 de enero de 2025);9(3):494. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/3/494>
68. Promega. Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay. s.f. (citado 23 de enero de 2025). Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay | NLRP3 | Caspase-1 Assay. Disponible en: https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/inflammation-assay/caspase_glo-1-inflammasome-assay/?catNum=G9951
69. Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, Thi Nguyen D, Hattori T, Manh Le T, et al. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. *Nat Commun* (Internet). 2019 (cited 2023 Dec 19);10(1):1–19. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-09753-2>.

70. Ye Z, Wong CK, Li P, Xie Y. A SARS-CoV protein, ORF-6, induces caspase-3 mediated, ER stress and JNK-dependent apoptosis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* (Internet). 2008;1780(12):1383–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416508001608>
71. Wong L-YR, Perlman S. Proviral role of caspase-6 in coronavirus infections. *Cell Res* (Internet). 2022 (cited 2023 Dec 19);33(1):7–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41422-022-00728-5>
72. Sanz E, Stokes AJ, Giddings MC, Schiavi S. miR-21-5p mediates NLRP3 inflammasome activation and the inflammatory response in allergic asthma. *Front Immunol*. 2020;11:609468. doi:10.3389/fimmu.2020.609468.

