

TRABAJO DE FIN DE GRADO

EVALUACIÓN DEL PERFIL EPIGENÉTICO DEL PACIENTE LONG COVID CON DOLOR MUSCULOESQUELÉTICO CRÓNICO: ESTUDIO DE METILACIÓN DEL ADN.



Autor: Gonzalo Diez Cadenas

Tutores: Juan José Tellería Orriols y
Raquel Almansa Mora

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1. Diseño del estudio y selección de pacientes.....	9
4.2. Variables clínicas.....	10
4.3. Análisis estadístico de las variables clínicas.....	11
4.4. Análisis de metilación diferencial.....	11
4.4.1. Extracción y evaluación de la concentración y pureza del ADN.....	11
4.4.2. Secuenciación con bisulfito de representación reducida (RRBS).....	11
4.4.3. Análisis bioinformático.....	12
4.4.4. Análisis de la metilación diferencial y anotaciones funcionales.....	13
5. RESULTADOS.....	14
5.1. Caracterización de la cohorte.....	14
5.2. Análisis de metilación del ADN.....	17
6. DISCUSIÓN.....	20
7. CONCLUSIONES.....	24
8. REFLEXIONES FINALES.....	25
9. AGRADECIMIENTOS.....	25
10. BIBLIOGRAFÍA.....	26
11. ANEXOS.....	30

1- RESUMEN

Introducción y objetivos: El Long-COVID es un síndrome multisistémico que afecta a pacientes tras infección por SARS-CoV-2, con síntomas persistentes como fatiga, disfunción cognitiva o dolor crónico. Entre ellos, el dolor musculoesquelético crónico es uno de los más prevalentes e incapacitantes. Diversos estudios sugieren que alteraciones epigenéticas, como la metilación del ADN, podrían estar involucradas en su desarrollo y en la persistencia del dolor. Por ello, el objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado fue analizar los patrones diferenciales de metilación del ADN en pacientes Long-COVID con dolor musculoesquelético crónico, comparándolos con individuos sanos, así como caracterizar el tipo, gravedad y duración del dolor.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio de casos y controles emparejados, reclutando 25 mujeres diagnosticadas con Long-COVID y dolor musculoesquelético crónico y 25 voluntarios sanos post-COVID sin secuelas. Se extrajeron muestras de sangre venosa en tubos EDTA para purificar el ADN y analizar la metilación mediante secuenciación por bisulfito de representación reducida (RRBS). Esta técnica permite medir la metilación en regiones ricas en sitios CpG. Tras el procesamiento bioinformático y los controles de calidad, se realizó un estudio preliminar con los datos disponibles hasta la fecha, identificando promotores con diferencias significativas en porcentajes de metilación ($p < 0,05$; cambio $\geq 0,1$) entre grupos. Finalmente, usando DAVID Bioinformatics, se seleccionaron genes asociados a funciones biológicas y rutas de señalización enriquecidas.

Resultados y discusión: La mayoría de las pacientes cursaron COVID-19 leve-moderada, con solo un 24 % de hospitalizaciones, confirmando que el Long-COVID puede desarrollarse incluso tras infecciones leves. El 80 % de las mujeres mostraban un dolor generalizado, siendo el 60 % de intensidad moderada y el 32 % grave. El dolor afectaba en promedio más de la mitad del cuerpo, especialmente muslos, zona lumbar, manos, cuello, pies y brazos, impactando notablemente su calidad de vida. Dada la complejidad del análisis bioinformático, se obtuvieron datos de metilación de 4 casos y 11 controles, lo que permitió realizar un análisis preliminar completo, identificando 68 promotores de genes codificantes de proteínas con diferencias de metilación entre grupos. Algunos genes identificados parecen estar relacionados con la percepción del dolor y/o la COVID-19. Aunque el tamaño muestral fue limitado, los resultados preliminares sientan una base sólida para futuros estudios ampliados y validaciones en otras poblaciones de pacientes.

1- ABSTRACT

Objectives: Long COVID is a multisystemic syndrome that affects patients after SARS-CoV-2 infection, with persistent symptoms such as fatigue, cognitive dysfunction, or chronic pain. Among these, chronic musculoskeletal pain is one of the most prevalent and disabling. Several studies suggest that epigenetic alterations—such as DNA methylation—may be involved in the development and persistence of this pain. Therefore, the main objective of this Final Degree Project was to analyze differential DNA methylation patterns in Long COVID patients with chronic musculoskeletal pain, comparing them to healthy individuals, as well as to characterize the type, severity, and duration of pain.

Materials and Methods: A matched case-control study was conducted, recruiting 25 women diagnosed with Long COVID and chronic musculoskeletal pain, and 25 healthy post-COVID volunteers with no sequelae. Venous blood samples were collected in EDTA tubes to purify DNA and analyze methylation using Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS). This technique allows quantification of DNA methylation in CpG-rich regions. After bioinformatic processing and quality control, a preliminary analysis was performed with the available data, identifying promoters with significant differences in methylation percentages ($p < 0.05$; change ≥ 0.1) between groups. Finally, the DAVID Bioinformatics platform was used to identify genes associated with enriched biological functions and signaling pathways.

Results: Most patients experienced mild to moderate COVID-19, with only 24% requiring hospitalization, confirming that Long COVID can develop even after mild infections. Eighty percent of the women reported widespread pain, with 60% experiencing moderate and 32% severe intensity. On average, pain affected more than half of the body, particularly the thighs, lower back, hands, neck, feet, and arms, significantly impacting their quality of life. Due to the complexity of the bioinformatic analysis, methylation data were obtained for 4 cases and 11 controls, enabling a complete preliminary analysis. A total of 68 promoters of protein-coding genes were identified with differential methylation between groups. Some of the identified genes appear to be related to pain perception and/or COVID-19. Although the sample size was limited, these preliminary results provide a solid foundation for future expanded studies and validation in other patient populations.

2- INTRODUCCIÓN

Long-COVID y dolor musculoesquelético crónico

El Long COVID (LC) es una entidad diagnóstica nacida en el seno de la pandemia por SARS-CoV-2, de modo que ya desde sus inicios y de forma paulatina ha ido surgiendo evidencia de su relevancia así como sus características principales (1). Esta afección, llamada así por los propios pacientes, tiene otras denominaciones como “Secuelas post-agudas de COVID-19 o PASC” (National Institutes of Health, NIH y Centers for Disease Control, CDC) o “Afección post-COVID-19” (Organización Mundial de la Salud, OMS); y no cuenta con una definición comúnmente aceptada que facilite un consenso en la actividad asistencial, la investigación o el apoyo laboral (2).

Según los CDC, el LC se puede considerar una serie de problemas de salud nuevos, continuos o remitentes experimentados después de la infección aguda (IA), bien sea de forma sintomática o bien de forma asintomática. Como la mayor parte de las infecciones se resuelven en las primeras semanas, se considera que los síntomas pueden comenzar al menos 4 semanas después de la infección aguda y deben persistir al menos 3 meses (3). La definición de la OMS de octubre de 2021 declara que esta afección post-COVID es presentada en individuos con infección confirmada o sospechada dentro de los 3 primeros meses desde la infección aguda y con una duración de los síntomas de al menos 2 meses y que no puedan explicarse con un diagnóstico alternativo. Entre los síntomas destaca fatiga, disfunción cognitiva, disnea, mialgias y otros más que influyen en la calidad de vida del paciente (4). No obstante se han llegado a analizar hasta 203 síntomas distintos posibles (5). La amplia variedad fenotípica dentro del LC ha llevado a la dificultad para dar con biomarcadores estandarizados y todavía se hace necesario más investigación para dar con moléculas que permitan clasificar a estos pacientes en función de la gravedad, el pronóstico y el tratamiento del que puedan beneficiarse (6).

Hay numerosas teorías fisiopatológicas al respecto no excluyentes entre sí (7). Entre ellas se encuentra la de la “persistencia viral”, según la cual el reservorio de la infección en órganos o en sangre así como ciertos remanentes secundarios a la misma pueden desencadenar una respuesta inmunitaria innata que explique los síntomas típicos (8). Por ejemplo, se ha determinado la presencia de ARN codificante de la proteína Spike en biopsias de la lámina propia de rectosigma en pacientes estudiados hasta dos años después de la infección aguda (9). Otra hipótesis es la de la “inflamación prolongada”, por la cual la persistencia de la misma puede ir vinculada a una mayor duración de los síntomas (10). Una revisión sistemática observó que 113 biomarcadores tenían una asociación estadística con la enfermedad. De estos, IL-6, TNF- α y en especial la

proteína C reactiva se mantenían en niveles más elevados en pacientes LC con respecto a los controles tanto sanos como recuperados completamente y se han propuesto como potenciales marcadores serológicos inflamatorios de esta entidad (11,12). Se ha observado también una disregulación de la respuesta inmunitaria y autoinmunidad tanto en la línea B con producción de autoanticuerpos específicos, como en la línea T con respuesta aumentada de CD4 e infiltración de CD8 en los tejidos de los enfermos (13,14). Otra teoría apoya que la reactivación de infecciones víricas latentes como el VHH-6 o el VEB, favorecida por la infección por COVID, puede favorecer la presentación de síntomas típicos como fatiga o niebla mental (8). Asimismo, se ha relacionado el daño en las células endoteliales y el daño vascular cerebral a la disfunción cognitiva (15). También se ha hipotetizado que los efectos gastrointestinales del COVID pueden favorecer un estado de disbiosis de la microbiota en el que una mayor prevalencia de cepas patógenas productoras de sustancias neuroinflamatorias unido a una barrera intestinal debilitada, favorecen la aparición de síntomas constitucionales como la fatiga crónica (16)

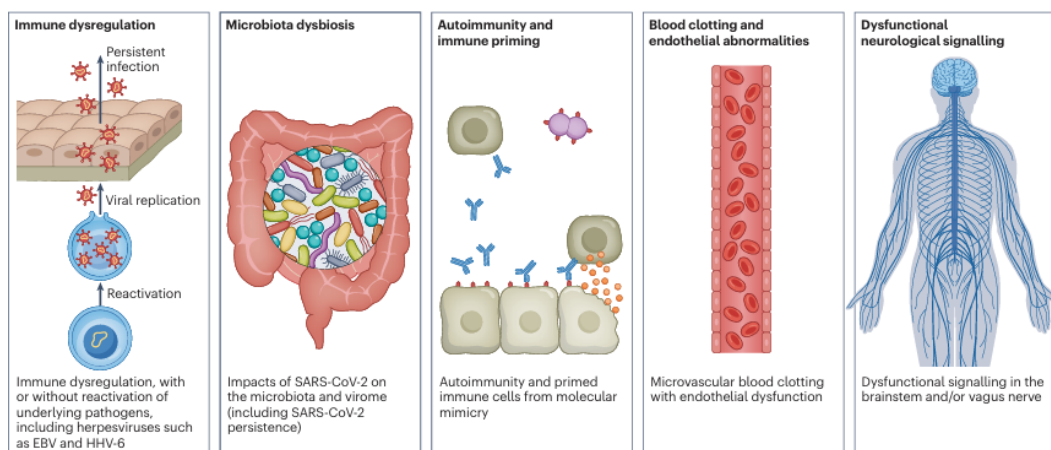


Figura 1: Diferentes teorías fisiopatológicas acerca de la patología del LC (17)

La revisión de la literatura muestra que el dolor crónico es el tercer síntoma más prevalente después de la fatiga y la disnea, en especial la mialgia y el dolor articular; incluso en aquellos con síntomas agudos leves (18). Los pacientes con COVID de larga evolución tienden a experimentar un patrón heterogéneo de dolor, en su mayoría de distribución generalizada, que se asemeja al de otras afecciones como la fibromialgia o la encefalomielitis miálgica/síndrome de fatiga crónica (19). Un estudio de aleatorización mendeliana (MR) que permite establecer la relación entre la exposición a diferentes afecciones a COVID-19 y el dolor en distintas regiones del cuerpo a través del uso de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), describió un mayor riesgo de dolor articular (sobre todo en las rodillas) con respecto a los controles sanos y sugirió una relación

entre los pacientes hospitalizados y el dolor localizado en el cuello u hombro y en todo el cuerpo (20).

Actualmente hay pocas publicaciones disponibles sobre los posibles mecanismos fisiopatológicos relacionados con el desarrollo de dolor crónico en pacientes con LC. Se postula que el dolor crónico y difuso de estos pacientes se puede deber a una sensibilización de las fibras nerviosas por la inflamación sostenida. También se teoriza que puede influir la activación de las células gliales del Sistema Nervioso Central con la consecuente liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas que aumentan la excitabilidad neuronal. (21,22)

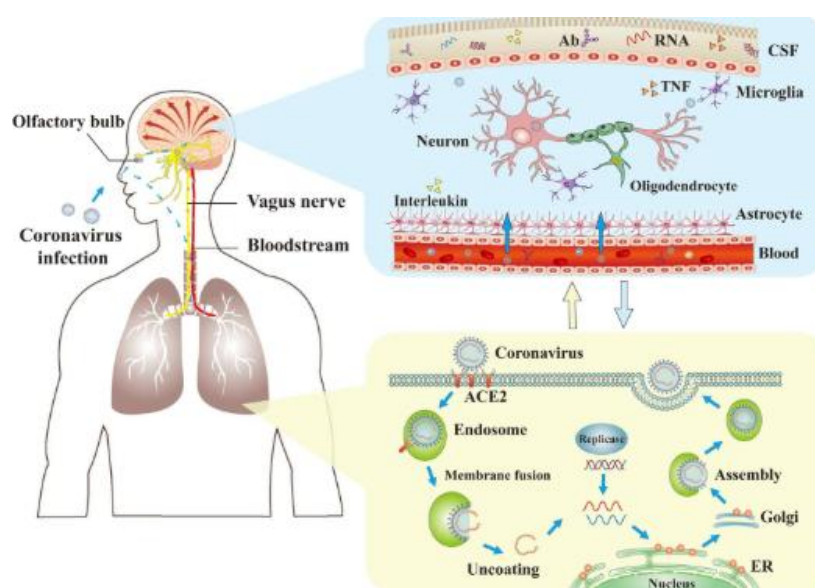


Figura 2: El SARS-CoV-2 puede acceder al tejido neuronal directamente a través del nervio olfatorio o a través de la circulación sanguínea. Una vez allí puede favorecer la mayor sensibilidad neuronal desencadenando un cuadro de dolor neuropático (21)

La alteración de la expresión génica de receptores neuronales, canales iónicos y citocinas y quimiocinas proinflamatorias se ha asociado a modificaciones epigenéticas de los tejidos lesionados (23). Es por ello que el estudio de los mecanismos epigenéticos en los pacientes LC con dolor crónico resulta interesante.

La epigenética es el estudio de los cambios hereditarios en la expresión genética no debidos a la alteración de la secuencia del ADN. Esto es debido a una variedad de mecanismos como la metilación del ADN, la modificación de histonas, el empaquetamiento del ADN, los ARN no codificantes, etc.

La metilación del ADN es la modificación genética que mejor se conoce, ya que interviene en la regulación de muchos procesos celulares normales (el desarrollo

embrionario, la transcripción, la estructura de la cromatina, la inactivación del cromosoma X, la impronta genética y la estabilidad cromosómica (24).

A nivel molecular, este mecanismo epigenético implica la adición de un grupo metilo al quinto carbono de los residuos de citosina del ADN, lo que da lugar a la formación de 5-metilcitosinas. La metilación del ADN ocurre mayormente en regiones ricas en citosina y guanina conocidas como islas CpG. El epigenoma cuenta con alrededor de 28 millones de sitios CpG, de los cuales el 60-70% se encuentran en los sitios promotores de la transcripción (25).

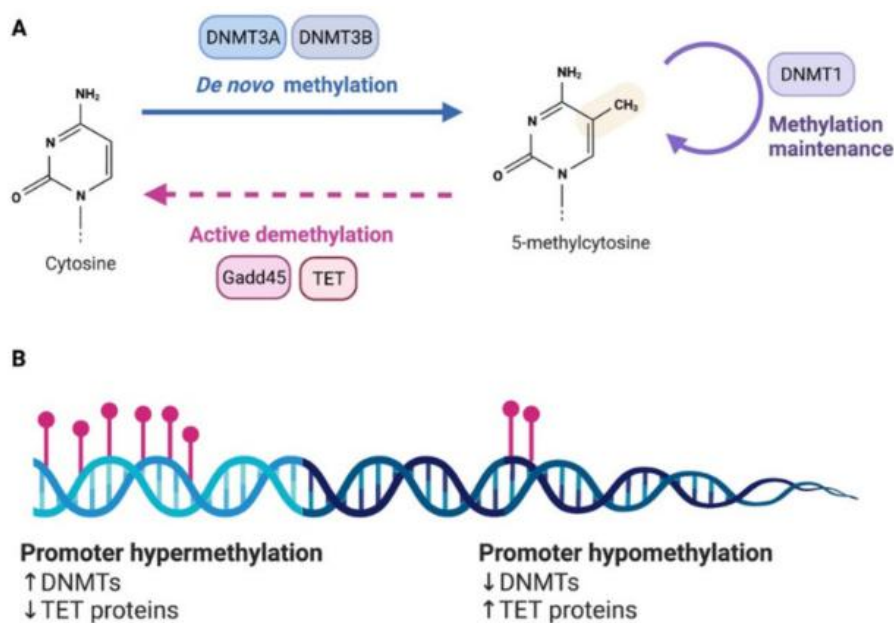


Figura 3. La metilación y desmetilación del ADN está a cargo de múltiples enzimas y generalmente se da en regiones promotoras aumentando (hipometilación) o reduciendo (hipermetilación) la expresión génica(23) .

Existe un número creciente de enfermedades humanas que están asociadas a una metilación aberrante del ADN, de manera que los perfiles de metilación del ADN se están comenzado a emplear como marcadores pronósticos, diagnósticos y terapéuticos en determinadas patologías

Por esta razón, no es descabellado pensar en la posibilidad de dar con biomarcadores epigenéticos precisos que permitan predecir la gravedad o la presencia de PASC en pacientes LC

Se sabe que la infección por SARS-CoV-2 altera el perfil de metilación del ADN de diversas subpoblaciones leucocitarias circulantes, lo cual a su vez correlaciona con la gravedad de la enfermedad (26). Se han identificado “regiones metiladas

diferencialmente" (RMD) en pacientes con COVID-19 aguda y controles; esencialmente hipometilación en regiones promotoras de genes de actividad de citocinas/quimiocinas, de transducción de señales y los genes estimulados por interferón (IFIT27 y OAS2) (27). Un estudio de asociación de todo el epigenoma (EWAS) determinó una hipometilación diferencial 3 meses después de la infección aguda en tres regiones CpG entre pacientes COVID positivo y controles sanos, aunque no halló diferencias entre pacientes graves y leves y entre pacientes LC y en remisión. Destaca la hipometilación del gen IFI44L, relacionado con la respuesta innata inducida por interferón, el cual es un biomarcador propuesto en enfermedades autoinmunes como el LES o el síndrome de Sjögren y que puede guardar relación con una disregulación inmunitaria. También se halló hipometilación de ANKRD9, que codifica para IMPDH2, enzima citosólica que es diana terapéutica del antiviral ribavirina (28). Por otro lado también se ha demostrado que en pacientes con mayor gravedad y mortalidad hay una mayor tasa de metilación en genes relacionados con la respuesta inmune, lo que podría explicar el bloqueo de proliferación de células T y de la inmunidad innata en sangre evidenciada en pacientes LC (27).

Tampoco se descarta que la infección por el virus pueda inducir un patrón de metilación aberrante en células huésped como se ha observado en células epiteliales respiratorias con la infección del virus influenza H5N1 o el coronavirus MERS-CoV (29). En este aspecto, podría inducir una hipometilación de los promotores de ACE2, haciendo que se sobreexpresen en tejido pulmonar y cardíaco, aumentando el riesgo cardiovascular (30). Este riesgo se ha visto que puede verse incrementado por mecanismos de acetilación de histonas reguladoras de TNF-alfa y IL-6 (31). Un estudio a través de matrices de metilación del ADN en leucocitos de la sangre, evidenció 1373 RMD, de las cuales, al cabo de un año, solo 77 regiones, relacionadas la respuesta al interferón, regresaron a su estado basal, mientras que 1296 regiones, relacionadas con la activación linfocítica y vías inmunes, mantuvieron su patrón metilado. Esto quiere decir que mientras las vías de respuesta viral parecen normalizarse con el tiempo, la disregulación de ciertos linajes de células B y T puede persistir en sangre (32).

En relación al dolor, diversos estudios han demostrado que los mecanismos epigenéticos se han implicado tanto en el dolor agudo como en el crónico. En modelos animales de dolor neuropático crónico se han observado cambios en el estado de metilación global del ADN semanas después de la lesión, apoyando que la metilación podría ser un actor importante en el dolor persistente. se ha observado en modelos animales alteraciones epigenéticas que predisponen al mismo. También se detectaron cambios en el perfil de expresión de DNMT (ADN metiltransferasa) en regiones de médula espinal y ganglio espinal dorsal (23).

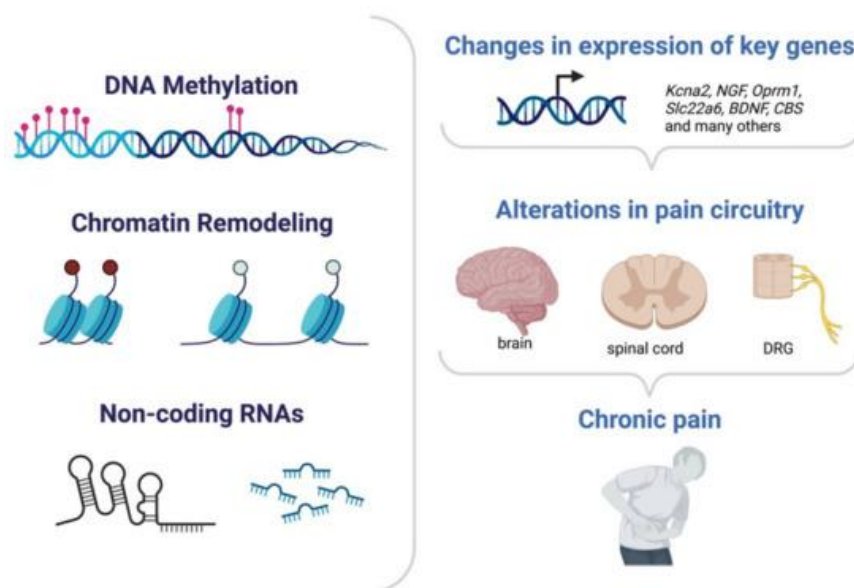


Figura 4: Mecanismo epigenético en el dolor crónico. Los cambios en el nivel de metilación del ADN, la estructura de la cromatina o los ARNnc pueden afectar a la expresión génica de varios genes diferentes, permitiendo una plasticidad duradera del circuito del dolor tanto a nivel central como periférico y, en última instancia, posibilitando el dolor crónico(23)

No obstante, aunque se ha descrito una relación entre la infección por SARS-CoV-2, el dolor y los cambios en los patrones de metilación del ADN, aún se desconoce cuál es el papel concreto de estas alteraciones epigenéticas en el desarrollo del LC y su vinculación con el dolor crónico que experimentan los pacientes.

3- OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es la identificación de patrones de metilación del ADN, asociados al desarrollo de dolor musculoesquelético crónico en el paciente con LC, mediante la secuenciación de bisulfito de representación reducida (RRBS). Esto permitirá, en primer lugar, mejorar la comprensión sobre los mecanismos biológicos subyacentes al dolor crónico el paciente LC y, en segundo lugar, identificar biomarcadores potenciales para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad.

Como objetivos secundarios, este trabajo pretende evaluar la utilidad de la técnica RRBS y el desarrollo de un pipeline bioinformático para la determinación de perfiles de metilación diferenciales en muestras de sangre de pacientes con LC y caracterizar el dolor, evaluando su intensidad, expansión, localización y duración.

4- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1) Diseño del estudio y selección de pacientes

Este estudio de casos y controles se llevó a cabo siguiendo las directrices “*Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology*” (STROBE). La investigación recibió el dictamen favorable del Comité de Ética de la investigación con Medicamentos de las Áreas de Salud de Valladolid, Código CEIm: PI-25-83-C

Los pacientes fueron reclutados entre mayo de 2022 y noviembre de 2023 de dos hospitales públicos (hospital clínico Universitario de Valladolid y Hospital Universitario Río Hortega) y varios centros de Atención Primaria. Se reclutó una cohorte de voluntarios sanos, de la misma edad y sexo, que habiendo sido infectados por el virus SARS-CoV-2, no desarrollan secuelas. La inscripción fue voluntaria y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado antes del inicio de la recogida de datos (**Ver Anexo 2**). En total, se cuenta con 25 casos y 25 controles.

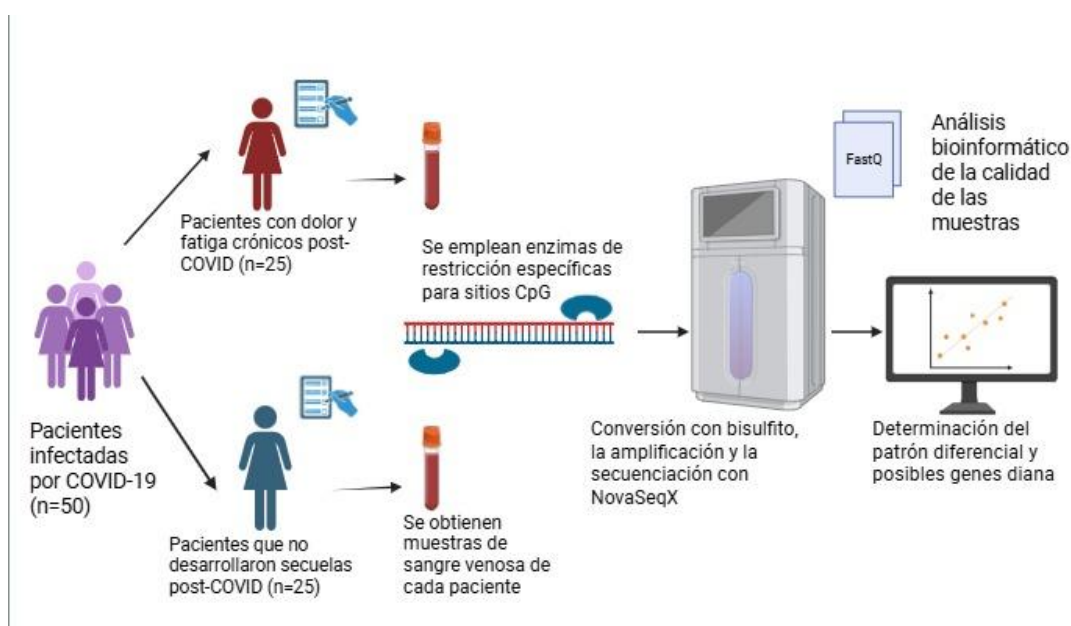


Figura 4. Esquema de la toma de muestras y análisis procedimental del estudio. Elaboración propia.

En relación a los casos, los criterios de inclusión consistían en que fueran individuos de entre 18 y 70 años que hubieran padecido una infección confirmada de SARS-CoV-2 mediante PCR (*Polymerase chain reaction*) o test de antígenos, registrada en sus historias clínicas. También debían tener dolor musculoesquelético con una duración de más de 12 semanas desde la infección aguda y que persistiera en el momento de la evaluación.

Por otro lado, se consideraron los criterios de exclusión tanto para los casos como para los controles: historia de dolor musculoesquelético crónico de más de 12 semanas antes de la infección aguda, diagnóstico de depresión mayor o fibromialgia, dolor oncológico, fractura o cirugía de la columna en el último año, embarazo, incontinencia fecal o urinaria, anestesia en silla de montar y toda enfermedad genética o autoinmune previa que pudiera explicar la clínica.

4.2) Variables clínicas:

Cada paciente se citó en la Unidad de Afrontamiento Activo del dolor de Atención Primaria (SACYL) donde se recogiendo las siguientes variables y muestras biológicas.

Variables sociodemográficas, clínicas y relacionadas con la infección de COVID:

Sexo, nacionalidad, edad, IMC, situación de empleo, formación académica, estado civil, hábito tabáquico, ola de COVID, comorbilidades, severidad del COVID-19, hospitalización, reinfecciones, dosis de vacunación y síntomas específicos (cansancio, disnea, cefalea, pérdida de memoria, confusión, mialgias, anosmia). IPAQ es un cuestionario con 7 preguntas acerca de la duración, frecuencia e intensidad de la actividad física realizada en los últimos 7 días, así como caminar y el tiempo sentado. La actividad semanal se registra en Mets ("*Metabolic Equivalent of Taks*" o Unidades de Índice Metabólico) y se obtiene de multiplicar valores asociados a una actividad física concreta por el tiempo en minutos y por el número de días a la semana.

Variables relacionadas con el dolor: Intensidad del dolor mediante la "escala EVA" (Escala Visual Analógica), donde un extremo representa la ausencia de dolor y el extremo contrario, el máximo dolor posible. Dicha escala abarca de 0 a 100 mm y los valores son aportados subjetivamente por el paciente. En dicha escala se pueden obtener subclasificaciones de: dolor leve (0-29), dolor moderado (30-69) y dolor grave (70-100). "Total de Áreas de Dolor" es una variable cuantitativa que hace referencia al número de áreas corporales donde se sitúa el dolor y que suelen tener un valor máximo de 18 a 28 áreas distintas. "Porcentaje de Áreas de Dolor" (PAP) deriva de la anterior y consiste en la proporción porcentual del cuerpo afectada por el dolor. "Meses con dolor" hace referencia al tiempo en meses con dicho síntoma en estos pacientes. El "dolor generalizado" es dolor difuso en al menos 4 o 5 regiones corporales y está asociado con importante estrés emocional o disfuncionalidad (33). Puede ser simple si no hay síntomas asociados y no genera limitación funcional, o compleja si se acompaña de otras afecciones como cefalea, trastornos del sueño o fatiga.

4.3) Análisis estadístico de las variables clínicas:

Se realizó un análisis descriptivo de las variables demográficas y clínicas de las pacientes incluidas en el estudio. La normalidad de las variables cuantitativas se analizó con el test de Shapiro-Wilk. Si las variables seguían una distribución normal, se expresaron como media y desviación estándar, y se compararon mediante pruebas paramétricas t de Student. En caso contrario, se expresaron como mediana y rango intercuartílico, y se compararon mediante pruebas no paramétricas como el test U de Mann-Whitney. Las variables cualitativas se expresaron con porcentajes y sus respectivos intervalos de confianza del 95%, y se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado. En todos los casos el límite de significación se fijó con un valor de $p < 0,05$. Todos estos análisis se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics (versión 30).

4.4) Análisis de la metilación del ADN por RRBS:

Extracción y evaluación de la concentración y pureza del ADN:

Se extrajeron muestras de sangre venosa periférica de todos los participantes en tubos con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), que se almacenaron inmediatamente a -20°C para evitar la degradación del ADN. Posteriormente, el ADN genómico fue extraído de las células sanguíneas y purificado mediante el kit “High Pure PCR *Template Preparation* Kit” de Roche (método de columnas de sílice), siguiendo las instrucciones del fabricante (detallado en el anexo 1). Finalmente, el ADN se eluyó en 110 μL del buffer de elución, para asegurar una concentración suficiente de ADN.

Una vez obtenido el ADN de cada muestra, se midió la concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$) utilizando un espectrofotómetro Nanodrop. La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm, donde el ADN absorbe la luz de manera más intensa. La cantidad de luz absorbida es proporcional a la cantidad de ADN en la muestra. Además, la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} se utiliza para determinar la pureza de la muestra. De manera que un ADN puro típicamente tiene un valor de A_{260}/A_{280} entre 1,8 y 2,0. Solo aquellas muestras que tenían más de 100 ng de ADN y una pureza óptima (próxima a 1,8) se emplearon en el análisis de metilación.

Secuenciación por bisulfito de representación reducida (RRBS):

El estudio de la metilación del ADN se llevó a cabo en la empresa Sequencing Multiplex S.L. (Seqplexing), una Spin-off del INCLIVA (Instituto de Investigación Sanitaria Clínico de Valencia). Allí, las muestras de ADN se volvieron a someter a un control de calidad con la plataforma “Bioanalyzer” antes de proceder a su análisis por RRBS.

El análisis de RRBS, del inglés “*Reduced Representation Bisulfite Sequencing*” es una técnica que se enfoca principalmente en el estudio de metilación de regiones específicas del genoma que son ricas en sitios CpG. El objetivo de la preparación de la librería es la generación de un conjunto de fragmentos de ADN que representen de manera reducida y específica las regiones metiladas del genoma. Brevemente, una vez comprobada la calidad del ADN, éste es sometido a una digestión enzimática utilizando enzimas de restricción que cortan el ADN en sitios específicos, generalmente en regiones ricas en CpG. Posteriormente, se realiza un tratamiento con bisulfito, convirtiendo las citosinas no metiladas en uracilos (que posteriormente se leen como timinas en la secuenciación), mientras que las citosinas metiladas se mantienen estables.

Tras esto se llevó a cabo la amplificación por PCR y purificación de los fragmentos tratados y la creación de librerías con fragmentos de ADN representativos de las regiones genómicas de interés. Se empleó el sistema QIAxcel Advanced System (Qiagen) para procesar un subconjunto de muestras y evaluar y verificar el tamaño medio y concentración de los fragmentos de las librerías. Posteriormente se procedió a la secuenciación mediante la plataforma de Illumina NovaSeq X de todas las muestras.

Análisis bioinformático:

El procesamiento de datos se llevó con la ayuda de una bioinformática colaboradora del grupo de investigación. El pipeline del análisis se muestra en la figura 4. Primero, se realizó un Control de calidad mediante la herramienta FastQC, que evalúa ciertos parámetros: número de lecturas, calidad media (Phred) de las bases en cada posición, valores de calidad media de cada lectura, proporción de cada nucleótido en cada posición de lectura, porcentaje de GC promedio de cada lectura, secuencias duplicadas o contenido de adaptadores. Los adaptadores son pequeñas secuencias artificiales que se asocian a los fragmentos de ADN y permiten su unión a la plataforma de secuenciación y su posterior secuenciación y amplificación gracias a regiones de unión para *primers*. El adaptador universalmente empleado en la plataforma de secuenciación Illumina es AGATCGGAAGAG.

A continuación, con Trim Galore, herramienta bioinformática, se llevó a cabo el proceso de “*trimming*”, el cual consiste en el recorte de bases de baja calidad o adaptadores que contaminan la secuencia. En este tipo de secuenciación en el que la longitud de los fragmentos suele ser menor que la longitud del marco de lectura programado, es frecuente la lectura de adaptadores junto a la secuencia diana y esto puede alterar la calidad del análisis, haciendo necesario el proceso de *trimming*.

Después de esto se realizó el alineamiento con un genoma de referencia mediante Bismark en formato FastQc, generando archivos BAM. A continuación, se ordenaron mediante Samtools y con Deduplicate_Bismark se eliminaron las lecturas duplicadas generadas en la PCR o la secuenciación.

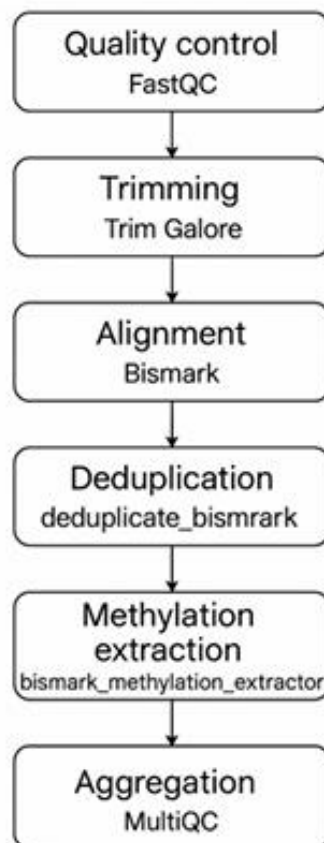


Figura 6. Flujo de trabajo (pipeline) del análisis de calidad y procesamiento de la muestra. Fuente: Cortesía de la Amaia Tellería, bioinformática colaboradora

Posteriormente, Bismark_methylation_extractor extrae la información de metilación como proporción de bases metiladas con respecto al total de bases en un sitio específico del genoma. Por último, se generaron archivos MultiQC de cada paciente, que aglutinan la información derivada de todo el procesamiento bioinformático en un único documento que facilita la comparación de los datos de calidad y de metilación.

Determinación de los porcentajes de metilación diferenciales y anotaciones funcionales.

El análisis de metilación de cada gen se llevó a cabo de manera independiente para el promotor del gen por un lado y para el cuerpo del gen por otro. La β de metilación es el valor obtenido de la proporción de lecturas metiladas sobre el total de lecturas de cada muestra. Una vez calculada, se determinó la media de β en cada grupo de casos (DCC)

y controles (DCE) y se estimó la diferencia entre ambas ($\Delta\beta$). La significancia estadística se calculó con un t-test no emparejado (varianzas desiguales). El nivel de significación se fijó en un valor p inferior a 0.05. Además, solo se tuvieron en cuenta los resultados significativos cuyo cambio biológico, medido con el $\Delta\beta$ fuera superior a 0.1 o inferior a -0.1.

Para facilitar el análisis se centró en la región promotora de genes codificantes de proteínas, de manera que una vez identificados aquellos promotores cuyos porcentajes de metilación cumplían los filtros establecidos, se realizó una anotación funcional de los mismos empleando la herramienta bioinformática “*DAVID bioinformatics*” del NIH (*National Institutes of Health*).

DAVID permite integrar lista de genes, codificados en nuestro caso con el identificador ENSEMBL_GENE_ID, y realizar un análisis de enriquecimiento mediante los términos GO (Gene Ontology). Estos términos son tres: “Procesos Biológicos”, “Función molecular”, y “Componente Celular”. Además, permite obtener los mapas de rutas bioquímicas con herramientas como KEGG y BioCarta, que muestran las vías en las que los genes están integrados. También permite acceder a bases públicas como WikiPathways o Human Protein Atlas. Este estudio se centró en el análisis de los “Procesos Biológicos”, rutas KEEG y de vías moleculares con WikiPathways.

5- RESULTADOS

5.1) Caracterización de la cohorte.

Tal y como se especificó en los criterios de inclusión, la cohorte está formada por mujeres mayores de edad. La edad media y desviación de la cohorte fue de 47.48 ± 6.87 años. Tal y como cabía esperar por el diseño del estudio, no se encontraron diferencias estadísticas en la edad entre casos y controles (Tabla 1). Tampoco en la nacionalidad ni el estado civil. Por otro lado, las pacientes con LON-COVID presentaban un porcentaje de desempleo del 64%, muy superior al grupo Control.

Datos socio-demográficos	Grupo control (n=25)	Grupo casos (n=25)	P-valor
Edad (años; mediana y SD)	47.08 \pm 7.45	47.88 \pm 6.36	0.453
Etnia			0.363
Caucásica	25 (100%)	23 (92%)	
Romaní	0 (0%)	1 (4%)	
Eslava	0 (0%)	1 (4%)	

Datos socio-demográficos	Grupo control (n=25)	Grupo casos (n=25)	P-valor
Estado civil			0.741
Soltera	2 (8%)	2 (8%)	
Casada	20 (80%)	18 (72%)	
Separada	3 (12%)	4 (16%)	
Viuda	0 (0%)	1 (4%)	
Situación de desempleo	1 (4%)	16 (64%)	>0.001*

Tabla 1. Características socio-demográficas.

Respecto a la infección aguda, se detecta una mayor incidencia de casos de LC en las tres primeras olas con respecto a la cuarta en adelante y en relación a la severidad de la infección aguda inicial. También hay una mayor incidencia significativa en relación a la hospitalización previa y a la sintomatología en fase aguda como es la fatiga, la disnea, la cefalea, la pérdida de memoria, la confusión y las mialgias; no hallando esa significación con la anosmia. No se ha encontrado una relación significativa entre las reinfecciones y el LC y aunque tampoco se ha hallado en relación a las vacunas, Si que se puede observar que los controles cuentan con mayores dosis (**Tabla 2**)

Datos de infección COVID	Grupo control (n=25)	Grupo casos (n=25)	p-valor
Ola de COVID-19			<0.001*
1ª-3ª Ola	4 (16%)	16 (64%)	
4ª Ola en adelante	21 (84%)	9 (36%)	
Severidad de COVID-19 (según criterios de la OMS)			<0.001*
Leve	21 (84%)	7 (28%)	
Moderada	3 (12%)	15 (60%)	
Severa	1 (4%)	3 (12%)	
Hospitalización	1 (4%)	6 (24%)	0.042*
Sintomatología			
Fatiga	18 (72%)	25 (100%)	0.004*
Disnea	4 (16%)	16 (64%)	<0.001
Cefalea	13 (52%)	25 (100%)	<0.001*
Pérdida de memoria	0 (0%)	16 (64 %)	<0.001*
Confusión	0 (0%)	9 (36%)	<0.001*

Datos de infección COVID	Grupo control (n=25)	Grupo casos (n=25)	p-valor
Mialgias	14 (16%)	23 (92%)	0.004*
Anosmia	9 (36%)	15 (60%)	0.089
Reinfecciones			0.544
1 Infección	18 (72%)	16 (64%)	
2 Infecciones o más	7 (28%)	9 (36%)	
Dosis de vacunación			0.069
No vacunada	1 (4%)	2 (8%)	
1 Dosis	2 (8%)	6 (24%)	
2 Dosis	7 (28%)	11 (44%)	
3 Dosis o más	15 (60%)	6 (24%)	

Tabla 2: Variables relacionadas con la fase aguda de la infección por SARS-CoV2:

Acerca de las características clínicas, hay una clara relación entre las comorbilidades y el LC, no siendo así con los hábitos tabáquicos ni con el IMC. Por otro lado, sí que hay una asociación significativa entre las comorbilidades de los pacientes, de las cuales, las que se han visto más frecuentes son el asma y el hipotiroidismo con 6 casos cada una de ellas. En relación al cuestionario IPAQ, se observa que aquellos controles sanos son capaces de llevar a cabo casi el doble de actividad física semanal que los casos.

Datos clínicos	Grupo control (n=25)	Grupo casos (n=25)	p-valor
IMC (kg/m ²)	25.39 [22.6, 28.2]	27.21 [25.1, 29.32]	0.059
Hábitos tabáquicos			0.191
No fumadora	12 (48%)	17 (68%)	
Fumadora	2 (8%)	3 (12%)	
Ex fumadora	11 (44%)	5 (20%)	
Comorbilidades			0.018*
Sin comorbilidades	20 (80%)	12 (48%)	
Más de una comorbilidad	5 (20%)	13 (52%)	
IPAQ	2874 [1680-5877]	1920 [1310-3460]	0.038*

Tabla 3: Características clínicas en el momento de la entrevista. Siglas utilizadas:

IMC: Índice de Masa Corporal; IPAQ: *International Physical Activity Questionnaire* (Cuestionario Internacional de Actividad Física)

En relación con las variables asociadas al dolor, las pacientes presentaban una intensidad media de 55 sobre 100 en la Escala Visual Analógica (EVA) en el momento de la valoración, y de 63 sobre 100 en las últimas cuatro semanas. El 8% presentaban

una intensidad del dolor leve, el 60% una intensidad moderada y el 32% una intensidad severa del dolor (Figura 7).

Sobre la distribución del dolor, el 80% presentaba dolor generalizado, siendo las regiones más frecuentemente afectadas los muslos (43%), la región lumbar (37.9%), las manos (35.4%), el cuello (34%), los pies (32%) y los brazos (31%). En promedio, el dolor se localizaba en 16 de las 29 áreas corporales evaluadas, lo que representa más del 50% del cuerpo. La mayoría describía el dolor como punzante y constante, no relacionado con el movimiento, predominantemente diurno, y con características de adormecimiento y hormigueo. La duración media del cuadro de dolor fue de 18.84 ± 8.0 meses.

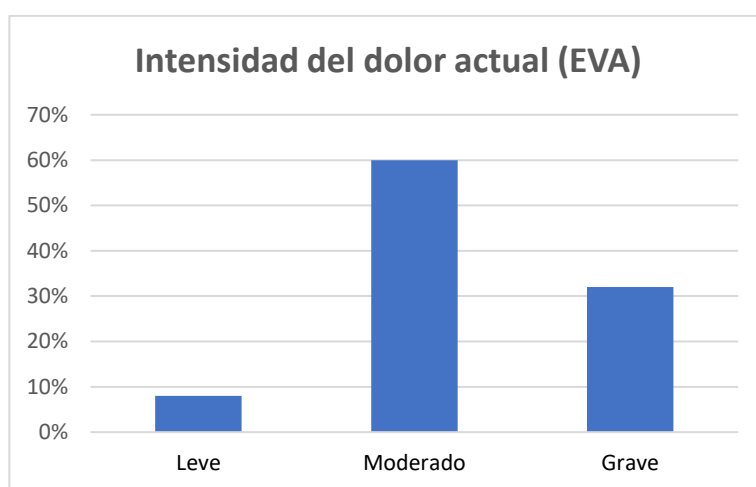


Figura 7: Distribución de los pacientes con LC en función de la intensidad de dolor actual medido con la escala EVA: Escala Visual Analógica

5.2) Análisis de metilación del ADN.

Los valores de concentración y calidad de las muestras de ADN se muestran en la siguiente tabla (tabla 4). Todas las muestras pasaron los umbrales de concentración y calidad requeridos para su análisis por RRBS.

ID	CONCENTRACIÓN (ng/μl)	A260/280	ID	CONCENTRACIÓN (ng/μl)	A260/280
DCC009	28,027	1,81	DCE004	31,418	1,88
DCC016	47,9	1,73	DCE018	41,141	1,87
DCC019	30,822	1,82	DCE029	48,569	1,75
DCC038	53,1	1,80	DCE035	58,2	1,79
DCC041	43,3	1,78	DCE039	78,8	1,79
DCC042	31,9	1,72	DCE042	67,4	1,64
DCC049	64,5	1,77	DCE045	45,2	1,73
DCC053	89,3	1,81	DCE049	51,6	1,76

ID	CONCENTRACIÓN (ng/μl)	A260/280	ID	CONCENTRACIÓN (ng/μl)	A260/280
DCC054	49,8	1,83	DCE052	46,4	1,75
DCC055	26,7	1,80	DCE054	54,7	1,76
DCC056	32,9	1,82	DCE061	56,2	1,78
DCC061	26,4	1,93	DCE064	69,1	1,72
DCC073	41,7	1,73	DCE070	33	1,78
DCC075	38	1,77	DCE081	44,3	1,78
DCC100	43,9	1,74	DCE086	53,1	1,80
DCC111	29,1	1,85	DCE089	43,3	1,78
DCC119	52,8	1,73	DCE096	44,7	1,84
DCC121	44,1	1,82	DCE097	35,7	1,86
DCC124	75,8	1,79	DCE107	74,5	1,79
DCC127	173,4	1,82	DCE109	45,6	1,82
DCC128	41,034	1,75	DCE114	34,4	1,84
DCC130	28,8	1,85	DCE117	38,4	1,84
DCC137	33,2	1,84	DCE118	72,3	1,80
DCC142	73,8	1,75	DCE147	56,2	1,78
DCC148	33,6	1,83	DCE153	40,6	1,74

Tabla 4: Valores de concentración y calidad de muestras

Dada la complejidad del análisis bioinformático, y el tiempo requerido para el procesamiento y generación de resultados de cada paciente, en análisis de la cohorte completa todavía no ha concluido. Hasta la fecha se han generado 22 resultados derivados del preprocesamiento bioinformático. Los MultiQc analizados reflejan que todas las muestras, a excepción de 3, cumplen los requisitos de calidad previamente establecidos. Las causas de exclusión de estas 3 muestras fueron esencialmente debido a un escaso número total de lecturas (<20000 lecturas), lo cual va unido a una peor calidad en los informes MultiQC y a un porcentaje de *trimming* mayor del 70%

En cuanto a los niveles de metilación de las regiones analizadas, actualmente se dispone del dato de 15 pacientes, de los cuales 11 son controles y 4 son casos LC. Se ha realizado un estudio preliminar utilizando la información de los 15 pacientes, lo que ha permitido analizar las diferencias en los porcentajes de metilación de los promotores de aproximadamente 19.500 genes codificantes de proteínas. Aplicando un filtro de $\Delta\beta \geq 0.1$ y $t\text{-test} < 0.05$ identificamos 68 promotores cuyos porcentajes de metilación diferían entre ambos grupos de comparación. Los casos LC presentaban mayores porcentajes de metilación en 53 promotores y los controles mayores porcentajes de metilación en 15 promotores. La lista completa se puede consultar en el **Anexo 3**.

Con el fin de conocer en qué procesos biológicos y rutas de señalización intracelular están implicados los genes identificados, se procedió a realizar la anotación funcional

de los genes mediante la plataforma DAVID Bioinformatics. El análisis de enriquecimiento identificó 7 procesos biológicos y una ruta de señalización relacionada con la lista de promotores analizada.

Categoría	Término	Genes	P Value	Fold Enrichment
Proceso biológico	GO:0048023: Regulación positiva del proceso biosintético de melanina	ATP7A, PMEL	0,03	60,9
	GO:2000271: Regulación positiva del proceso apoptótico de fibroblastos	NUPR1, BID	0,04	55,3
	GO:0035095: Respuesta conductual a la nicotina	CHRNA4, GRM2	0,04	55,3
	GO:0007268: Transmisión sináptica química	HRH1, DRD5, CHRNA4, GRM2	0,04	5,3
	GO:0055085: Transporte transmembrana	ABCA5, SEC14L3, ABCA13, SLC25A17	0,05	4,9
	GO:0002082: Regulación de la fosforilación oxidativa	MACROH2A1, ATP7A	0,05	40,6
	GO:0014059: Regulación de la secreción de dopamina	CHRNA4, GRM2	0,05	38,0
Ruta KEEG	hsa04080: Interacción ligando-receptor neuroactivo	HRH1, DRD5, CHRNA4	0,05	3,3
Ruta Wikipath	WP4846: Ruta del SARS-CoV-2 y COVID-19	TMPRSS2	0,04	51,8
	WP4891: Ruta de resultados adversos en COVID-19	TMPRSS2	0,05	35,6
	WP5485: Neuroinflamación post-COVID	TMPRSS2	0,08	23,7

Tabla 5: Resultados de la búsqueda con DAVID Informatics

Así mismo, el análisis de rutas identificó un gen, TMPRSS2, implicado en rutas relacionadas con la infección por el virus SARS-Cov2 según la base de datos Wikipathways.

6- DISCUSIÓN

En este trabajo presentamos un análisis preliminar orientado a explorar los patrones de metilación del ADN en pacientes diagnosticadas con LC y dolor musculoesquelético crónico. La cohorte analizada en este estudio está constituida exclusivamente por mujeres de mediana edad, dado que ambas características se han descrito como factores de riesgo para desarrollar LC (34,35). Además, se ha priorizado que las participantes presentaran dolor musculoesquelético, uno de los síntomas más relevantes, limitantes y persistentes de esta enfermedad, con un impacto significativo sobre la calidad de vida y la funcionalidad de las pacientes (36). La elección de esta cohorte responde, por tanto, a la necesidad de centrar la investigación en un subgrupo clínicamente relevante, no solo por su elevada susceptibilidad al síndrome post-COVID, sino también por la relevancia del dolor musculoesquelético como componente central del cuadro clínico.

En relación a las características clínicas y sociodemográficas de la muestra de pacientes incluida en este estudio, cabe destacar que, en general, las pacientes con LC presentaban un mayor porcentaje de comorbilidades en comparación con la muestra control, siendo las más frecuentes el asma y el hipotiroidismo. La presencia de comorbilidades previas al desarrollo de la COVID-19, ha sido ampliamente validada en múltiples estudios como un factor de riesgo significativo para el desarrollo del LC (37)

Respecto a las características y la sintomatología del cuadro de la COVID-19 que presentaron las pacientes, la mayoría cursaron con una infección leve-moderada, y solo un 24% requirieron hospitalización. Si bien la gravedad inicial de la infección aguda y los ingresos prolongados se han descrito como factores de riesgo para desarrollar LC (38) diversos estudios han demostrado que este síndrome puede aparecer incluso tras haber cursado con síntomas leves (39), lo cual concuerda con las características de nuestra muestra. En cuanto a la sintomatología, los casos incluidos en el estudio mostraron, en general, un mayor número de síntomas en comparación con la muestra control. La gran mayoría de las pacientes presentó fatiga, cefaleas y anosmia. Estos hallazgos coinciden con estudios previamente publicados que demuestran que presentar un mayor número de síntomas durante la fase aguda se asocia con mayores tasas de síndrome post-agudo por SARS-CoV-2 (PASC) (38)

Cabe reseñar que la mayor parte de los casos incluidos en el estudio se infectaron en las primeras olas de la pandemia. En un estudio observacional realizado en Italia se observó que la incidencia del LC en adultos hospitalizados fue mayor en la primera ola con la variante salvaje (48.1%) con respecto a la segunda ola (variante Alfa, 35.9%) y la tercera ola (variantes Delta y Ómicron, 16.5%) (40).

Es interesante destacar que, las mujeres incluidas en este estudio presentaron una alta tasa de desempleo, probablemente relacionada con la limitación de las secuelas post-covid en la vida diaria. Este hallazgo es consistente con lo observado en otros trabajos, como por ejemplo en un estudio observacional realizado en el estado de Michigan, donde aproximadamente el 40% de los pacientes previamente empleados no pudieron reincorporarse al trabajo debido a las consecuencias persistentes de la enfermedad, y un 25% de quienes regresaron necesitó reducir su jornada laboral (41).

Tal y como se comentó al inicio de esta discusión, todas las mujeres con LC incluidas en este estudio presentaban como síntoma común dolor musculoesquelético, siendo este uno de los síntomas más limitantes del síndrome (42). La gran mayoría de las pacientes referían un dolor de intensidad moderada, aunque resulta especialmente reseñable que un 32% presentó un dolor de intensidad grave, según la escala visual analógica (EVA). Además, el 80% de las pacientes experimentaba dolor generalizado, localizándose en promedio en 16 de las 29 áreas corporales evaluadas, lo que representa más de la mitad de cuerpo, destacándose especialmente las regiones de los muslos, la zona lumbar, las manos, el cuello, los pies y los brazos. Estos datos ponen de manifiesto el impacto significativo del dolor musculoesquelético en la calidad de vida y la funcionalidad de las pacientes con LC.

Actualmente, existen pocas publicaciones disponibles que exploren en profundidad las dificultades asociadas a la identificación y caracterización del dolor crónico en pacientes con LC. En este contexto, los estudios epigenéticos aplicados a la investigación del dolor han mostrado que la detección de alteraciones en los patrones de metilación del ADN podría ser una herramienta útil para avanzar en la comprensión y caracterización de este síntoma (43,44)

Los resultados derivados del análisis de metilación de este estudio, constituyen una primera aproximación, demostrando la viabilidad de evaluar de manera eficaz la metilación genómica mediante la técnica RRBS, a partir del ADN extraído de sangre total de pacientes con LC. Además, el desarrollo bioinformático realizado ha permitido identificar diferencias en los porcentajes de metilación a nivel de regiones promotoras de genes codificantes de proteínas, lo cual resulta especialmente relevante dado el papel central que desempeñan estas regiones en la regulación génica. Esta aproximación metodológica no solo refuerza la aplicabilidad del RRBS como herramienta robusta para estudios epigenéticos en cohortes clínicas, sino que además sienta las bases para investigaciones futuras orientadas a identificar posibles biomarcadores epigenéticos asociados al LC y al dolor crónico.

A pesar de la limitación en el número de muestras analizadas, se ha completado un análisis con 15 pacientes (11 controles y 4 casos) como prueba de concepto, cuyos resultados se discutirán a continuación.

Se han identificado diferencias en los porcentajes de metilación de 68 promotores de genes codificantes de proteínas en las mujeres con LC. Tras realizar una anotación funcional de estos genes con la herramienta “DAVID bioinformatic” se identificaron una serie de procesos biológicos y rutas de señalización potencialmente relacionadas con el LC y el desarrollo de dolor musculoesquelético. Entre los genes destacados figura NUPR1, implicado en la señalización de quimiocinas, que previamente se ha descrito infrarregulado en lavados broncoalveolares de pacientes con COVID(45). Las mujeres con LC de este estudio presentaron una mayor metilación de NUPR1, lo que podría reflejar un nivel inferior de expresión de este gen. También participan en los procesos biológicos identificados los genes HRH1, DRD5 y CHRNA4, cuyos porcentajes de metilación también fueron superiores en las pacientes con LC. Todos ellos forman parte de una vía común identificada en “KEEG_pathway” de DAVID Bioinformatics bajo el nombre de: “interacciones neuroactivas entre ligando y receptor” (Neuroactive ligand-receptor interaction), una vía estrechamente relacionada con la experiencia neurosensorial del dolor (46). **Ver anexo 4.** Dicha vía representa la señalización entre los neurotransmisores y sus receptores neuronales y no neuronales, principalmente involucrados en la neurotransmisión.

El receptor HRH1 (histamina 1) es el receptor subtipo mayoritario de los ganglios dorsales y se ha vinculado previamente con el dolor vesical(47). DRD5 codifica un receptor de dopamina y su estimulación en modelos animales de Parkinson y dolor mecánico crónico asociado se ha asociado con alivio del dolor (48). CHRNA4, que codifica la subunidad alfa 4 del receptor neuronal de la acetilcolina, se ha asociado con una intensidad de dolor en pacientes con la misma enfermedad (49). El gen GRM2, que codifica receptor metabotrópico de glutamato tipo 2, ha sido asociado a efectos analgésicos en modelos de dolor neuropático e inflamatorio en la corteza cingulada anterior en modelos murinos (50). Por otro lado, la metilación diferencial en el gen GRM2 se ha descrito en pacientes con fibromialgia, observando que el empleo de L-acetilcarnitina para el dolor crónico ejerce una regulación epigenéticamente positiva de estos receptores, especialmente en el asta dorsal de la médula espinal, favoreciendo una anestesia más prolongada que otros neuromoduladores (51,52). Otro gen de interés identificado en este análisis preliminar es MACROH2A1, ya sus niveles de expresión en vesículas extracelulares de pacientes con COVID refractarios, se asoció con mayor

gravedad, llegándose incluso a proponer como posible biomarcador de la enfermedad (53)

Por último, a partir de la plataforma WikiPathways se identificó el gen TMPRSS2, cuyo porcentaje de metilación fue superior en los pacientes LC. Este gen codifica para la proteína transmembrana-serina 2, cuya función hasta hace poco era desconocida, pero se sabe que actúa como cebador en el reconocimiento de la proteína S del virus por el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2-R). Dicho receptor permite la inclusión del virus en las células favoreciendo su infección y son abundantes en el epitelio pulmonar, así como en el tejido nervioso. La unión viral por otra parte favorece una menor producción de la enzima ECA-2, el cual tiene un efecto protector a nivel pulmonar y neuroprotector contra la toxicidad y la degeneración (54). Recientemente se ha visto que una mayor actividad de esta proteasa puede desencadenar un aumento de la neuroinflamación y disrupción de la barrera hematoencefálica a través de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores inflamatorios (55,56), lo que ha posicionado a esta molécula como una posible diana terapéutica en pacientes con enfermedad crítica según hallazgos del estudio internacional GenOMICC y otros estudios acerca de las presentaciones graves de COVID-19 (57)

Cabe señalar que los hallazgos presentados en este estudio tienen la limitación de provenir de un número reducido de pacientes, por lo que será necesario completar el análisis con la cohorte completa antes de poder extraer conclusiones más sólidas y generalizables, así como su validación posterior en otras cohortes de pacientes. Así mismo, será necesario llevar a cabo futuras investigaciones centradas en esclarecer el papel específico que estos genes u otros que, identificados más adelante, pueden desempeñar en el desarrollo del LC y del dolor musculoesquelético crónico. No obstante, queda demostrado que la aproximación empleada para evaluar los niveles de metilación en pacientes con LC es factible y representa una herramienta prometedora para profundizar en la comprensión de esta enfermedad e identificar posibles biomarcadores epigenéticos que faciliten una mejor clasificación y manejo clínico de los pacientes.

7- CONCLUSIONES

Las pacientes incluidas en el presente estudio cursaron la infección aguda por SARS-CoV-2 de forma leve o moderada, lo que coincide con estudios previos que demuestran que el LC puede desarrollarse incluso tras cuadros no graves.

Se identificó un notable impacto social y laboral entre las pacientes, reflejado en altas tasas de desempleo y limitación funcional, probablemente como consecuencia directa de las secuelas persistentes de la enfermedad.

Las pacientes con LC con dolor musculoesquelético crónico presentaban una intensidad media-alta de dolor, predominando los casos de intensidad moderada (60%) y severa (32%), con una duración media prolongada de aproximadamente 19 meses.

Las pacientes incluidas en el estudio presentaron dolor era generalizado en el 80% de los casos, afectando principalmente muslos, región lumbar, manos, cuello, pies y brazos, comprometiendo más del 50% del cuerpo. Además, este se caracterizó por ser punzante, constante, no relacionado con el movimiento, predominantemente diurno, con sensaciones de adormecimiento y hormigueo,

El estudio confirmó la viabilidad técnica del análisis de metilación del ADN en sangre total mediante la técnica de RRBS, abriendo la puerta a futuras investigaciones epigenéticas en cohortes clínicas con LC.

En un estudio preliminar, empleando 4 casos y 11 controles se identificaron diferencias en los porcentajes de metilación en 68 regiones promotoras de genes codificantes de proteínas, entre los cuales destacan algunos genes previamente relacionados con la percepción del dolor y/o la infección aguda COVID-19.

Aunque el tamaño muestral fue limitado, los resultados preliminares obtenidos sientan una base para futuros estudios ampliados, así como para la validación en otras poblaciones de pacientes.

La aproximación epigenética empleada en este trabajo representa una herramienta prometedora para avanzar en la identificación de biomarcadores específicos del LC y del dolor musculoesquelético crónico, con potencial aplicación en la clasificación clínica y el diseño de estrategias terapéuticas personalizadas

8- REFLEXIONES FINALES

Este trabajo señala la posibilidad de un patrón de metilación diferencial en promotores de genes en pacientes LC cuya sintomatología predominante es el dolor musculoesquelético con respecto a controles. Asimismo, los promotores de genes codificantes de proteínas que se han aislado parecen guardar relación en algunos procesos biológicos y en una vía de señalización relacionada con la neurotransmisión. Aunque hay hallazgos en la literatura sobre la posible relación de algunos de estos con algunas características del dolor, no hay apenas información que los relacione con la infección por COVID y mucho menos con el LC y con el dolor neuropático asociado a esta última entidad. El escaso poder estadístico consecuente de la escasa muestra final analizada conlleva que estos resultados no tengan una significación biológica ni se puedan sacar conclusiones sólidas. No obstante, al completarse el estudio del cual me baso en mi TFG es posible que se obtengan resultados más extrapolables al conjunto de los pacientes LC y más amplio al poder analizar cuerpos de genes, así como promotores. Por otro lado, este TFG muestra la utilidad del empleo de técnicas como el RRBS, centrada en la secuenciación de regiones altamente metiladas, y determinar patrones epigenéticos de pronóstico y tratamiento que puedan actuar como futuros biomarcadores en un futuro, sobre todo a medida que la Medicina Personalizada vaya cobrando fuerza.

9- AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi profunda gratitud a Raquel, mi cotutora, la cual ha estado en continuo contacto conmigo y me tutelado y orientado en todos los procesos desde la toma de muestras hasta el análisis de calidad de las mismas y de la metilación diferencial. También por permitirme el acceso a ciertos datos pertinentes y mostrarme el uso de herramientas como DAVID Bioinformatics para hacer el análisis funcional.

Asimismo, agradezco a Laura Barrero, fisioterapeuta y estudiante predoctoral en el IBGM, su continua atención y supervisión en el análisis estadístico de las variables socio-demográficas, clínicas y relativas a la infección y al dolor de la cohorte. Y no quiero olvidar a Amaia Tellería, bioinformática, quien me ha permitido tener acceso a los MultiQC para el análisis de la calidad de las muestras y a los resultados de la metilación diferencial de los genes trabajando contra reloj para que pudiera tener material con el que trabajar en mi TFG.

Finalmente quiero agradecer al Dr Juan José Tellería por aceptar ser mi tutor y poder realizar mi TFG en base a este proyecto de investigación tan interesante.

No quiero olvidar a la Unidad de Estrategias Activas de Afrontamiento del Dolor en Atención Primaria (SACYL, Valladolid, España) por facilitar el reclutamiento de los pacientes LC.

10-BIBLIOGRAFÍA

1. Michelen M, Manoharan L, Elkheir N, Cheng V, Dagens A, Hastie C, et al. Characterising long COVID: a living systematic review. *BMJ Glob Health*. 27 de septiembre de 2021;6(9):e005427.
2. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Global Health; Board on Health Sciences Policy; Committee on Examining the Working Definition for Long COVID. A Long COVID Definition: A Chronic, Systemic Disease State with Profound Consequences [Internet]. Goldowitz I, Worku T, Brown L, Fineberg HV, editores. Washington (DC): National Academies Press (US); 2024. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK605676/>
3. CDC. COVID-19. 2025. Long COVID Basics. Disponible en: <https://www.cdc.gov/covid/long-term-effects/index.html>
4. Post COVID-19 condition (Long COVID) [Internet].. Disponible en: <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/post-covid-19-condition>
5. Davis HE, Assaf GS, McCorkell L, Wei H, Low RJ, Re'em Y, et al. Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. *EClinicalMedicine*. 15 de julio de 2021;38:101019.
6. Al-Aly Z, Topol E. Solving the puzzle of Long Covid. *Science*. 23 de febrero de 2024;383(6685):830-2.
7. Fernández-de-las-Peñas C, Raveendran AV, Giordano R, Arendt-Nielsen L. Long COVID or Post-COVID-19 Condition: Past, Present and Future Research Directions. *Microorganisms*. 11 de diciembre de 2023;11(12):2959.
8. Chen B, Julg B, Mohandas S, Bradfute SB. Viral persistence, reactivation, and mechanisms of long COVID. *eLife*. 12:e86015.
9. Peluso MJ, Ryder D, Flavell RR, Wang Y, Levi J, LaFranchi BH, et al. Tissue-based T cell activation and viral RNA persist for up to 2 years after SARS-CoV-2 infection. *Sci Transl Med*. 3 de julio de 2024;16(754):eadk3295.
10. Clinical characteristics with inflammation profiling of long COVID and association with 1-year recovery following hospitalisation in the UK: a prospective observational study. *Lancet Respir Med*. agosto de 2022;10(8):761-75.
11. Lai YJ, Liu SH, Manachevakul S, Lee TA, Kuo CT, Bello D. Biomarkers in long COVID-19: A systematic review. *Front Med (Lausanne)*. 20 de enero de 2023;10:1085988.
12. Espín E, Yang C, Shannon CP, Assadian S, He D, Tebbutt SJ. Cellular and molecular biomarkers of long COVID: a scoping review. *eBioMedicine*. 8 de abril de 2023;91:104552.

13. Gao Z wei, Zhang H zhong, Liu C, Dong K. Autoantibodies in COVID-19: frequency and function. *Autoimmun Rev.* marzo de 2021;20(3):102754.
14. Yin K, Peluso MJ, Luo X, Thomas R, Shin MG, Neidleman J, et al. Long COVID manifests with T cell dysregulation, inflammation and an uncoordinated adaptive immune response to SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* febrero de 2024;25(2):218-25.
15. Shabani Z, Liu J, Su H. Vascular Dysfunctions Contribute to the Long-Term Cognitive Deficits Following COVID-19. *Biology (Basel).* 9 de agosto de 2023;12(8):1106.
16. Plummer AM, Matos YL, Lin HC, Ryman SG, Birg A, Quinn DK, et al. Gut-brain pathogenesis of post-acute COVID-19 neurocognitive symptoms. *Front Neurosci.* 28 de septiembre de 2023;17:1232480.
17. Fineberg HV, Brown L, Worku T, Goldowitz I, editores. *A Long COVID Definition: A Chronic, Systemic Disease State with Profound Consequences* [Internet]. Washington, D.C.: National Academies Press; 2024 Disponible en: <https://www.nap.edu/catalog/27768>
18. Aiyegbusi OL, Hughes SE, Turner G, Rivera SC, McMullan C, Chandan JS, et al. Symptoms, complications and management of long COVID: a review. *J R Soc Med.* septiembre de 2021;114(9):428-42.
19. Komaroff AL, Lipkin WI. ME/CFS and Long COVID share similar symptoms and biological abnormalities: road map to the literature. *Front Med (Lausanne).* 2 de junio de 2023;10:1187163.
20. Fan Y, Liang X. Causal relationship between COVID-19 and chronic pain: A mendelian randomization study. *PLoS One.* 19 de enero de 2024;19(1):e0295982.
21. Wu Y, Xu X, Chen Z, Duan J, Hashimoto K, Yang L, et al. Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses. *Brain Behav Immun.* julio de 2020;87:18-22.
22. Ji RR, Chameissian A, Zhang YQ. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science.* 4 de noviembre de 2016;354(6312):572-7.
23. Mauceri D. Role of Epigenetic Mechanisms in Chronic Pain. *Cells.* 22 de agosto de 2022;11(16):2613.
24. Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. *Genes Dis.* 31 de enero de 2018;5(1):1-8.
25. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 de enero de 2006;103(5):1412-7.
26. Corley MJ, Pang APS, Dody K, Mudd PA, Patterson BK, Seethamraju H, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of peripheral blood reveals an epigenetic signature associated with severe COVID-19. *J Leukoc Biol.* julio de 2021;110(1):21-6.
27. Balnis J, Madrid A, Hogan KJ, Drake LA, Chieng HC, Tiwari A, et al. Blood DNA methylation and COVID-19 outcomes. *Clinical Epigenetics.* 25 de mayo de 2021;13(1):118.
28. Lee Y, Riskedal E, Kalleberg KT, Istre M, Lind A, Lund-Johansen F, et al. EWAS of post-COVID-19 patients shows methylation differences in the immune-response associated gene, IFI44L, three months after COVID-19 infection. *Sci Rep.* 7 de julio de 2022;12:11478.
29. Menachery VD, Schäfer A, Burnum-Johnson KE, Mitchell HD, Einfeld AJ, Walters KB, et al. MERS-CoV and H5N1 influenza virus antagonize antigen presentation by altering the epigenetic landscape. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 de enero de 2018;115(5):E1012-21.

30. Sabit H, Arneth B, Altrawy A, Ghazy A, Abdelazeem RM, Adel A, et al. Genetic and Epigenetic Intersections in COVID-19-Associated Cardiovascular Disease: Emerging Insights and Future Directions. *Biomedicines*. 16 de febrero de 2025;13(2):485.
31. Dey A, Vaishak K, Deka D, Radhakrishnan AK, Paul S, Shanmugam P, et al. Epigenetic perspectives associated with COVID-19 infection and related cytokine storm: an updated review. *Infection*. diciembre de 2023;51(6):1603-18.
32. Balnis J, Madrid A, Hogan KJ, Drake LA, Adhikari A, Vancavage R, et al. Whole-Genome Methylation Sequencing Reveals that COVID-19-induced Epigenetic Dysregulation Remains 1 Year after Hospital Discharge. *Am J Respir Cell Mol Biol*. mayo de 2023;68(5):594-7.
33. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics [Internet]. Disponible en: <https://icd.who.int/browse/2025-01/mms/en#849253504>
34. Subramanian A, Nirantharakumar K, Hughes S, Myles P, Williams T, Gokhale KM, et al. Symptoms and risk factors for long COVID in non-hospitalized adults. *Nat Med*. 2022;28(8):1706-14.
35. Dessie ZG, Zewotir T. Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. *BMC Infect Dis*. 21 de agosto de 2021;21:855.
36. Fernández-de-Las-Peñas C, de-la-Llave-Rincón AI, Ortega-Santiago R, Ambite-Quesada S, Gómez-Mayordomo V, Cuadrado ML, et al. Prevalence and risk factors of musculoskeletal pain symptoms as long-term post-COVID sequelae in hospitalized COVID-19 survivors: a multicenter study. *Pain*. 1 de septiembre de 2022;163(9):e989-96.
37. Tsampasian V, Elghazaly H, Chattopadhyay R, Debski M, Naing TKP, Garg P, et al. Risk Factors Associated With Post-COVID-19 Condition. *JAMA Intern Med*. junio de 2023;183(6):566-80.
38. Fernández-de-Las-Peñas C, Notarte KI, Peligro PJ, Velasco JV, Ocampo MJ, Henry BM, et al. Long-COVID Symptoms in Individuals Infected with Different SARS-CoV-2 Variants of Concern: A Systematic Review of the Literature. *Viruses*. 25 de noviembre de 2022;14(12):2629.
39. Fischer A, Badier N, Zhang L, Elbéji A, Wilmes P, Oustric P, et al. Long COVID Classification: Findings from a Clustering Analysis in the Predi-COVID Cohort Study. *Int J Environ Res Public Health*. 30 de noviembre de 2022;19(23):16018.
40. Azzolini E, Levi R, Sarti R, Pozzi C, Mollura M, Mantovani A, et al. Association Between BNT162b2 Vaccination and Long COVID After Infections Not Requiring Hospitalization in Health Care Workers. *JAMA*. 16 de agosto de 2022;328(7):676-8.
41. Chopra V, Flanders SA, O'Malley M, Malani AN, Prescott HC. Sixty-Day Outcomes Among Patients Hospitalized With COVID-19. *Ann Intern Med*. 11 de noviembre de 2020;M20-5661.
42. Fernández-de-Las-Peñas C, de-la-Llave-Rincón AI, Ortega-Santiago R, Ambite-Quesada S, Gómez-Mayordomo V, Cuadrado ML, et al. Prevalence and risk factors of musculoskeletal pain symptoms as long-term post-COVID sequelae in hospitalized COVID-19 survivors: a multicenter study. *Pain*. 1 de septiembre de 2022;163(9):e989-96.
43. Mauceri D. Role of Epigenetic Mechanisms in Chronic Pain. *Cells*. 22 de agosto de 2022;11(16):2613.
44. Polli A, Godderis L, Ghosh M, Ickmans K, Nijs J. Epigenetic and miRNA Expression Changes in People with Pain: A Systematic Review. *J Pain*. 2020;21(7-8):763-80.

45. Haslbauer JD, Savic Prince S, Stalder AK, Matter MS, Zinner CP, Jahn K, et al. Differential Gene Expression of SARS-CoV-2 Positive Bronchoalveolar Lavages: A Case Series. *Pathobiology*. abril de 2024;91(2):158-68.
46. Wangzhou A, Paige C, Neerukonda SV, Naik DK, Kume M, David ET, et al. A ligand-receptor interactome platform for discovery of pain mechanisms and therapeutic targets. *Sci Signal*. 16 de marzo de 2021;14(674):eabe1648.
47. Grundy L, Caldwell A, Garcia Caraballo S, Erickson A, Schober G, Castro J, et al. Histamine induces peripheral and central hypersensitivity to bladder distension via the histamine H1 receptor and TRPV1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1 de febrero de 2020;318(2):F298-314.
48. Buhidma Y, Hobbs C, Malcangio M, Duty S. Periaqueductal grey and spinal cord pathology contribute to pain in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis*. 26 de abril de 2023;9:69.
49. Zhang LM, Zhang XP, Chen YQ, Ye W. Association of CHRNA4 gene rs1044396 and rs1044397 polymorphisms with Parkinson's disease symptoms and smoking. *Genet Mol Res*. 12 de mayo de 2015;14(2):5112-22.
50. Chen S, Kadakia F, Davidson S. Group II metabotropic glutamate receptor expressing neurons in anterior cingulate cortex become sensitized after inflammatory and neuropathic pain. *Mol Pain*. 2020;16:1744806920915339.
51. Notartomaso S, Mascio G, Bernabucci M, Zappulla C, Scarselli P, Cannella M, et al. Analgesia induced by the epigenetic drug, L-acetylcarnitine, outlasts the end of treatment in mouse models of chronic inflammatory and neuropathic pain. *Mol Pain*. enero de 2017;13:1744806917697009.
52. Gerra MC, Carnevali D, Pedersen IS, Donnini C, Manfredini M, González-Villar A, et al. DNA methylation changes in genes involved in inflammation and depression in fibromyalgia: a pilot study. *Scand J Pain*. 27 de abril de 2021;21(2):372-83.
53. Kawasaki T, Takeda Y, Edahiro R, Shirai Y, Nogami-Itoh M, Matsuki T, et al. Next-generation proteomics of serum extracellular vesicles combined with single-cell RNA sequencing identifies MACROH2A1 associated with refractory COVID-19. *Inflamm Regen*. 30 de noviembre de 2022;42:53.
54. Chiappelli F. Towards Neuro-CoViD-19. *Bioinformation*. 30 de abril de 2020;16(4):288-92.
55. Welcome MO, Mastorakis NE. Neuropathophysiology of coronavirus disease 2019: neuroinflammation and blood brain barrier disruption are critical pathophysiological processes that contribute to the clinical symptoms of SARS-CoV-2 infection. *Inflammopharmacology*. agosto de 2021;29(4):939-63.
56. Nicoliche T, Bartolomeo CS, Lemes RMR, Pereira GC, Nunes TA, Oliveira RB, et al. Antiviral, anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin and curcuminoids in SH-SY5Y cells infected by SARS-CoV-2. *Sci Rep*. 10 de mayo de 2024;14(1):10696.
57. GWAS and meta-analysis identifies 49 genetic variants underlying critical COVID-19 - PMC [Internet]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10208981/>

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de extracción de muestras

1. Preparación de la Muestra:

- En un tubo de microcentrifugación de 1.5 mL, pipetear **250 µL** de sangre entera.
Nota: Si el volumen de la muestra es menor de 200 µL, completarlo con PBS; si es mayor, ajustar proporcionalmente el volumen de todos los reactivos.

2. Lisis y Unión del ADN:

- Añadir **250 µL** de Binding Buffer y **50 µL** de Proteinasa K (PCR grade, previamente reconstituida).
- Mezclar inmediatamente y, en caso de trabajar con sangre, incubar durante 15 min a +56 °C para favorecer la lisis y la inactivación de ADNasas endógenas. (en este momento, meter también el Buffer de elución en el baño y cuando pasen los 15 minutos y quitemos la muestra de sangre, subir temperatura a 70°C para el paso 9)

3. Precipitación del ADN:

- Incorporar **125 µL** de isopropanol y mezclar bien para homogeneizar la muestra.

4. Aplicación en el Tubo de Filtro:

- Transferir la mezcla a la parte superior del tubo de filtro “High Pure” (ubicado en un tubo de recolección), pipeteamos la mezcla y rellenamos con el resto de la muestra hasta 700 µL. (675 µL de mezcla y 25 µL de relleno de muestra aprox)

5. Centrifugación Inicial:

- Centrifugar durante 1 min a 8,000 × g.
- Retirar el tubo de filtro, desechar el líquido de flujo (flow-through) y el tubo de recolección, y transferir el filtro a un tubo de recolección nuevo para continuar.

6. Eliminación de Inhibidores:

- Añadir 500 µL de Buffer de Eliminación de Inhibidores tapa negra (al reservorio superior del filtro y centrifugar 1 min a 8,000 × g.
- Desechar el flow-through y reemplazar el tubo de recolección.

7. Lavado del Filtro:

- Realizar dos lavados consecutivos:
- Añadir 500 µL de Buffer de lavado tapa azul, centrifugar 1 min a 8,000 × g y desechar el flow-through y el tubo de recolección. Repetir el lavado con otros 500 µL de Buffer de Lavado.

8. Eliminación de Residuos de Lavado:

- Dejar el ensamblaje (tubo de filtro y tubo de recolección) en la centrífuga y centrifugar durante 10 segundos a velocidad máxima (aproximadamente 13,000 × g) para eliminar cualquier residuo de Buffer de Lavado.

9. Elución del ADN:

- Desechar el tubo de recolección y transferir el tubo de filtro a un microtubo estéril de 1.5 mL, libre de nucleasas.
- Añadir 110 µL de Buffer de elución tapa incolora previamente calentado a +70 °C y centrifugar 1 min a 8,000 × g.

- El ADN purificado se recoge en el microtubo y queda listo para su uso en PCR y otras aplicaciones moleculares.

Anexo 2. Consentimiento informado para la extracción de muestras biológicas



DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS

HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID

SERVICIO / UNIDAD: UNIDAD DE ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO ACTIVO PARA EL DOLOR CRÓNICO

INVESTIGADOR RESPONSABLE: [REDACTED]

TELÉFONO DE CONTACTO: [REDACTED] **EMAIL:** [REDACTED]

NOMBRE DE LA LÍNEA DE TRABAJO: DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL DOLOR MUSCULOESQUELÉTICO PERSISTENTE EN PACIENTES COVID-19 EN ATENCIÓN PRIMARIA.

VERSIÓN DE DOCUMENTO: (Número de versión, fecha): versión 1, 1-06-2021

I) Finalidad de la línea de trabajo propuesta:

Pedimos su colaboración en una investigación que se está liderando desde la Gerencia de Atención Primaria de Valladolid Este, Oeste y la Universidad de Valladolid. El objetivo del estudio es investigar sobre las características del dolor persistente en pacientes que hayan pasado el Covid-19. Actualmente no se llega a comprender los mecanismos

neurofisiológicos y genéticos subyacentes al desarrollo del dolor persistente musculoesquelético postcovid. De ahí la necesidad de realizar este estudio.

En caso de participar en el estudio, tendrá que cumplimentar un conjunto de preguntas y cuestionarios, así como realizar una valoración de su condición física y permitir que le extraigamos una pequeña cantidad de sangre. Cumplimentará unas preguntas sobre su situación socio-demográfica y de salud, el cuestionario EQ-5D, la escala Tampa de Kinesiofobia, el Cuestionario de Catastrofismo, el Cuestionario de Ansiedad y Depresión, el Inventario de Sensibilización Central, la Escala de Gradación de Dolor Crónico y la Escala Visual Analógica. A continuación, se realizarán también pruebas de algometría para determinar el umbral doloroso a la presión y una prueba de fuerza manual con dinamómetro. Además, se realizará la prueba de la marcha de 6 minutos para valorar la capacidad aeróbica. Finalmente, se le solicitará la donación de una pequeña cantidad de

sangre (10mL) en la que se realizarán diferentes determinaciones potencialmente relacionadas con su patología. De la misma muestra se extraerá ADN para estudios posteriores. Todas las variables se medirán en el mismo día del estudio.

Los resultados de estos estudios ayudarán probablemente a diagnosticar y/o tratar de manera más precisa a los enfermos con una enfermedad como la suya.

II) Algunas consideraciones sobre su participación:

Es importante que Vd., como potencial donante de muestras, conozca varios aspectos importantes:

A) La donación de muestras es totalmente voluntaria.

B) Puede plantear todas las dudas que considere sobre su participación en este estudio.

C) Se solicita su autorización para la toma y uso en investigación biomédica de muestras de sangre periférica. En dichas muestras se obtendrán y/o analizarán marcadores inflamatorios y metabólicos y se extraerá ADN para generar una genoteca específica de la patología estudiada utilizando los métodos que el investigador principal considere necesarios para avanzar en la línea de trabajo arriba expuesta.

D) Se le tomará un volumen relativamente pequeño (**10 ml**) de sangre venosa mediante una punción en el brazo en toma única. La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días.

E) No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y éstas no tendrán valor comercial. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual en el donante.

F) Las muestras y los productos obtenidos de las mismas serán almacenados y custodiados en el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), lugar designado para este fin por el Investigador Principal del Estudio. La persona responsable de la custodia es el Dr. Juan José Tellería. La muestra quedará allí depositada de forma indefinida (siempre que no se haya consumido en su totalidad en el curso de los trabajos asociados a la misma). Si en dicho momento se propusiera el paso de las muestras a un Biobanco oficialmente reconocido, se le volverá a solicitar su consentimiento para ello.

G) Los datos personales serán tratados según lo dispuesto en la normativa que resulte de aplicación según el Reglamento (UE) 2016/679, de 27 de abril, General de Protección de datos, y su normativa de datos personales de desarrollo tanto a nivel nacional como europeo.

H) La información obtenida se almacenará en una base de datos, en soporte informático, registrada en la Agencia Española de Protección de Datos, según la legislación vigente.

I) Los datos registrados serán tratados estadísticamente de forma codificada. En todo momento el donante tendrá derecho de acceso, modificación, oposición, rectificación o cancelación de los datos depositados en la base de datos siempre que expresamente lo solicite. Para ello deberá ponerse en contacto con el investigador principal. Los datos quedarán custodiados bajo la responsabilidad del Investigador Principal del Estudio, Dr. [REDACTED] Así mismo, tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no queda satisfecho.

J) Las muestras y/o la información clínica asociada a las mismas podrán ser utilizadas por el grupo del investigador principal en estudios futuros de investigación relacionados con la línea de trabajo arriba expuesta. Dichas muestras y/o la información clínica asociada a las mismas podrán ser cedidas a otros investigadores designados por el Investigador Principal para trabajos relacionados con esta línea, siempre al servicio de proyectos que tengan alta calidad científica y respeto por los principios éticos. En estos dos últimos casos, se solicitará antes autorización al CEIm (Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos) Área de Salud Valladolid Este.

K) La falta de consentimiento o la revocación de este consentimiento previamente otorgado no supondrá perjuicio alguno en la asistencia sanitaria que Vd. recibe/recibirá.

L) Es posible que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Vd. tiene derecho a conocerla y transmitirla a sus familiares si así lo desea.

M) Sólo si Vd. lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información asociada al estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO.

Estudio: DOLOR PERSISTENTE EN PACIENTES COVID-19.

Yo, _____

(Nombre y apellidos del paciente ó representante legal)

He leído la información que me ha sido entregada.

He recibido la hoja de información que me ha sido entregada.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado del estudio con _____

(Nombre y apellidos del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1.- Cuando quiera.

- 2.- Sin tener que dar explicaciones.
- 3.- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Por la presente, otorgo mi consentimiento informado y libre para:

- El fin para el que se utilizarán mis muestras y datos personales según lo recogido en la hoja de información al paciente que me ha sido entregada.
- Accedo a que los médicos del HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID contacten conmigo en el futuro en caso de que se necesite obtener nuevos datos. ☐ SI ☐ NO (marcar con una X lo que proceda)
- Accedo a que los médicos del HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID contacten conmigo en caso de que los estudios realizados sobre mis muestras / datos aporten información relevante para mi salud o la de mis familiares ... SI ☐ NO (marcar con una X lo que proceda)

Una vez firmada, me será entregada una copia del documento de consentimiento.

FIRMA DEL PACIENTE / REPRESENTANTE LEGAL
FECHA

NOMBRE Y APELLIDOS

EN CALIDAD DE (Parentesco, tutor legal, etc.)

Yo he explicado por completo los detalles relevantes de este estudio al paciente nombrado anteriormente y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en nombre del paciente.

FIRMA DEL INVESTIGADOR

NOMBRE Y APELLIDOS

FECHA

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO.

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO (CONTACTAR CON EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)

Yo _____ revoco el consentimiento de participación en el estudio, arriba firmado con fecha _____

Firma:

Anexo 3. Promotores seleccionados con metilación diferencial entre casos y controles. Análisis preliminar.

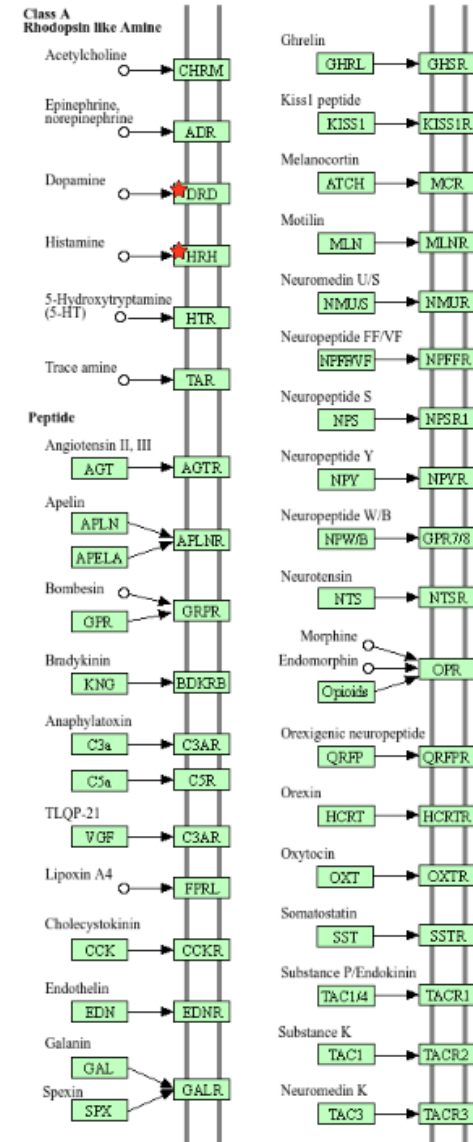
gene_id	Gene_Symbol	mean_DCC	mean_DCE	delta	p_t
ENSG00000179869	ABCA13	0,8409	0,5625	-0,2784	0,01106
ENSG00000107742	SPOCK2	0,5848	0,3155	-0,2694	0,01628
ENSG00000188039	NWD1	0,7466	0,4962	-0,2504	0,03677
ENSG00000155657	TTN	0,8848	0,6786	-0,2062	0,03197
ENSG00000179583	CIITA	1	0,7976	-0,2024	0,01933
ENSG00000114268	PFKFB4	0,9024	0,7	-0,2024	0,04821
ENSG00000164082	GRM2	0,3759	0,1924	-0,1835	0,02107
ENSG00000185479	KRT6B	0,9566	0,7818	-0,1747	0,01173
ENSG00000079393	DUSP13B	0,6087	0,4469	-0,1618	0,03246
ENSG00000102144	PGK1	0,4716	0,3132	-0,1584	0,01572
ENSG00000165240	ATP7A	0,4716	0,3132	-0,1584	0,01572
ENSG00000110934	BIN2	0,5337	0,405	-0,1288	0,00032
ENSG00000188155	KRTAP10-6	0,5836	0,4598	-0,1238	0,02008
ENSG00000135702	CHST5	0,7542	0,6338	-0,1204	0,00534
ENSG00000015475	BID	0,2473	0,1461	-0,1012	0,00661
ENSG00000079257	LXN	0,1604	0,2612	0,1008	0,03886
ENSG00000160994	TEKTL1	0,3519	0,4533	0,1014	0,02755
ENSG00000185664	PMEL	0,1631	0,2646	0,1015	0,04814
ENSG00000196639	HRH1	0,8697	0,9734	0,1037	0,00124
ENSG00000167632	TRAPPC9	0,1669	0,2708	0,104	0,00877
ENSG00000115648	MLPH	0,8825	0,9875	0,105	0,00146
ENSG00000106536	POU6F2	0,2435	0,3487	0,1051	0,04930
ENSG00000134825	TMEM258	0,128	0,2341	0,1061	0,04539
ENSG00000182919	C11orf54	0,1184	0,2251	0,1067	0,03111
ENSG00000101204	CHRNA4	0,5198	0,628	0,1082	0,01169
ENSG00000171357	LURAP1	0,1682	0,2771	0,1089	0,01142
ENSG00000132313	MRPL35	0,4379	0,5468	0,109	0,00623
ENSG00000104957	YJU2B	0,3138	0,4235	0,1097	0,03802
ENSG00000152454	ZNF256	0,2757	0,3855	0,1097	0,00237
ENSG00000100372	SLC25A17	0,2105	0,3218	0,1113	0,00465
ENSG00000144231	POLR2D	0,4125	0,5248	0,1123	0,01223
ENSG00000196290	NIF3L1	0,4381	0,5513	0,1132	0,00536
ENSG00000283992	SLURP2	0,7982	0,9117	0,1135	0,02134
ENSG00000156103	MMP16	0,0834	0,1977	0,1143	0,04692
ENSG00000124733	MEA1	0,8789	1	0,1211	0,00440
ENSG00000222009	BTBD19	0,7747	0,8978	0,1231	0,00680
ENSG00000283594	FAM236C	0,8761	1	0,1239	0,00362
ENSG00000154265	ABCA5	0,115	0,2393	0,1244	0,04857
ENSG00000184954	OR6C70	0,8585	0,9833	0,1249	0,00110
ENSG00000135077	HAVCR2	0,1611	0,2876	0,1265	0,03807
ENSG00000105427	CNFN	0,7702	0,9022	0,1319	0,03309
ENSG00000100413	POLR3H	0,0898	0,2258	0,136	0,00175
ENSG00000010244	ZNF207	0,3815	0,5197	0,1381	0,02275
ENSG00000166532	RIMKLB	0,7891	0,9275	0,1383	0,03197
ENSG00000176046	NUPR1	0,7871	0,9292	0,1421	0,04677

ENSG00000169676	DRD5	0,225	0,3683	0,1433	0,04406
ENSG00000150753	CCT5	0,1823	0,3257	0,1434	0,01564
ENSG00000072133	RPS6KA6	0,4945	0,6416	0,1471	0,00476
ENSG00000163431	LMOD1	0,203	0,3521	0,149	0,01747
ENSG00000168702	LRP1B	0,2354	0,3938	0,1583	0,00326
ENSG00000124380	SNRNP27	0,2623	0,4221	0,1598	0,00003
ENSG00000183549	ACSM5	0,8204	0,9844	0,164	0,00190
ENSG00000184012	TMPRSS2	0,7244	0,891	0,1666	0,01537
ENSG00000166441	RPL27A	0,2111	0,3826	0,1715	0,03104
ENSG00000133246	PRAM1	0,3768	0,5549	0,1781	0,02035
ENSG00000161944	ASGR2	0,669	0,8481	0,1791	0,00752
ENSG00000188396	DYNLT4	0,2079	0,396	0,1881	0,00906
ENSG00000134072	CAMK1	0,197	0,3861	0,1891	0,01408
ENSG00000113648	MACROH2A1	0,2264	0,417	0,1905	0,03969
ENSG00000100012	SEC14L3	0,7995	1	0,2005	0,00069
ENSG00000124440	HIF3A	0,1659	0,37	0,2041	0,03259
ENSG00000157514	TSC22D3	0,7801	1	0,2199	0,00160
ENSG00000003756	RBM5	0,462	0,7142	0,2522	0,04219
ENSG00000147130	ZMYM3	0,716	0,9744	0,2584	0,00015
ENSG00000124466	LYPD3	0,6096	0,8697	0,2602	0,02743
ENSG00000172543	CTSW	0,5439	1	0,4561	0,00036
ENSG00000206177	HBM	0,3329	0,816	0,4831	0,03749
ENSG00000111912	NCOA7	0,3029	0,7962	0,4933	0,04517

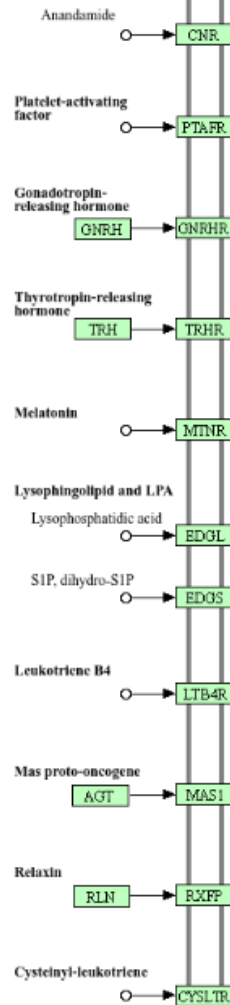
Anexo 4. Vía de la “Interacción neuroactiva entre ligando y receptor” (KEEG_PATHWAY)

NEUROACTIVE LIGAND-RECEPTOR INTERACTION

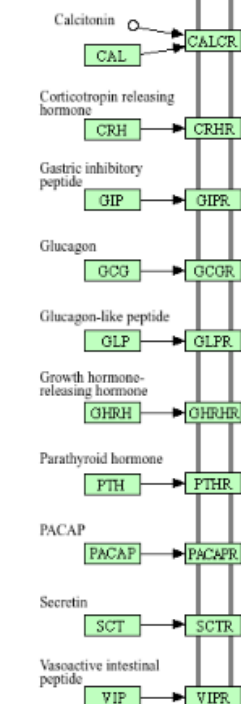
GPCRs



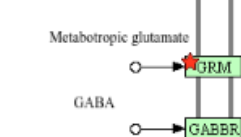
Cannabinoid



Class B Secretin like



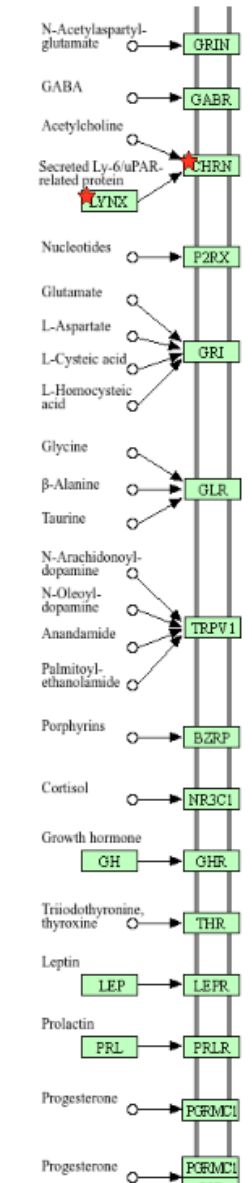
Class C Metabotropic glutamate / pheromone



Other



Channels /other receptors





EVALUACIÓN DEL PERFIL EPIGENÉTICO DEL PACIENTE LONG COVID CON DOLOR MUSCULOESQUELÉTICO CRÓNICO: ESTUDIO DE METILACIÓN DEL ADN.



Autor: Gonzalo Díez Cadenas **Tutores:** Juan José Tellería Orriols y Raquel Almansa Mora
Facultad de Medicina. Departamento de Biología Celular, Genética, Histología y Farmacología

INTRODUCCIÓN

El **Long-COVID (LC)** es un síndrome multisistémico que afecta a pacientes tras una infección aguda por SARS-CoV-2, con **síntomas persistentes** como fatiga, disfunción cognitiva o dolor crónico entre otros. El **dolor musculoesquelético crónico** es uno de los síntomas más prevalentes e incapacitantes. Diversos estudios sugieren que alteraciones epigenéticas, como la **metilación del ADN**, pueden estar implicadas en el **desarrollo del LC y la persistencia del dolor**, pudiendo servir como **biomarcadores** para la identificación y manejo de estos pacientes.

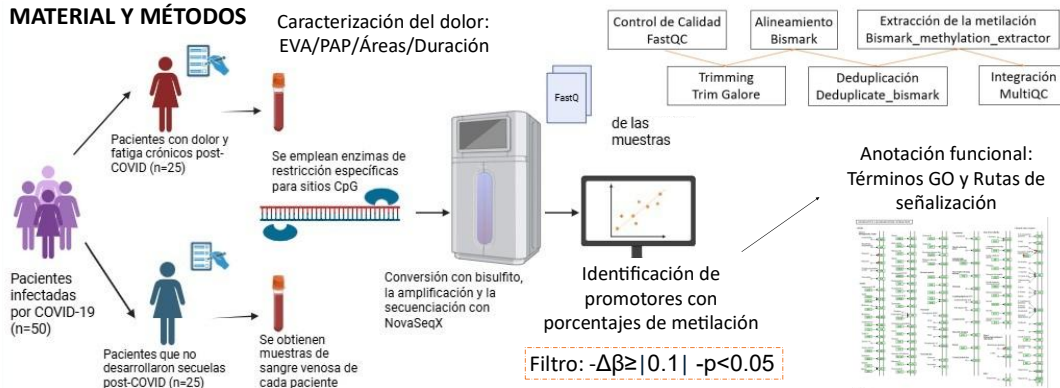
OBJETIVOS

Objetivo principal: explorar si los pacientes con LC y dolor musculoesquelético presentan un perfil de metilación del ADN diferencial respecto a individuos sin secuelas post-COVID.

Objetivos secundarios: Evaluar la utilidad de la técnica RRBS y el desarrollo de un pipeline bioinformático para la determinación de perfiles de metilación diferenciales en muestras de sangre de pacientes con LC.

Caracterizar el dolor, evaluando su intensidad, expansión, localización y duración.

MATERIAL Y MÉTODOS



RESULTADOS

Caracterización de la cohorte LC

Mujeres de 47.88 años (± 6.36 años)
Antecedentes de COVID leve/moderada.
52 % Comorbilidades
80% con dolor generalizado.
60% intensidad moderada / 32% intensidad grave.
Duración media: 18.84 ± 8.0 meses

Estudio de metilación del ADN

22 muestras analizadas
15 muestras procesadas con datos de metilación.

4 casos 11 controles

≈ 19.500 promotores de genes codificantes de proteínas analizados

68 promotores con diferente % de metilación.

Algunos genes de interés relacionados con LC y/o dolor: NUPR1, HRH1, DRD5, CHRNA4, GRM2, MACROH2A1, TMPRSS2



CONCLUSIONES

- El dolor crónico es de moderada-alta intensidad, generalizado y punzante.
- La viabilidad del análisis de RRBS, abre puerta a futuras investigaciones
- Se observaron diferencias en la metilación de ciertos promotores de genes previamente relacionados con dolor e infección por COVID
- Potencial búsqueda de biomarcadores relacionados

BIBLIOGRAFÍA

