IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS CIRCULANTES COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DA DOENÇA DO CORONAVÍRUS 2019 (COVID-19)

Palavras-Chave: COVID-19, biomarcadores, microRNAs.

Autores/as:

Ariane Tedeschi Rampazzo [Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNICAMP]

Aline de Souza Nicoletti [Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP]

Marília Berlofa Visacri [Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP]

Carla Regina da Silva Correa da Ronda [Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNICAMP]

Rafael Nogueira de Souza [Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP]

Deise de Souza Ventura [Hospital Estadual Sumaré – UNICAMP]

Adriana Eguti [Hospital Estadual Sumaré – UNICAMP]

Lilian Ferreira de Souza Silva [Hospital Estadual Sumaré – UNICAMP]

Mauricio Wesley Perroud Junior [Hospital Estadual Sumaré – UNICAMP]

Rodrigo Ramos Catharino [Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNICAMP]

Leonardo Oliveira Reis [Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP]

Luiz Augusto Dos Santos [Hospital Municipal de Paulínia]

Nelson Durán [Instituto de Biologia – UNICAMP]

Wagner José Fávaro [Instituto de Biologia – UNICAMP]

Marcelo Lancelotti [Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNICAMP]

José Luiz da Costa [Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNICAMP]

Eder de Carvalho Pincinato [Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP]

Profª Drª Patricia Moriel (orientadora) [Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19), causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, se tornou a mais recente emergência mundial (ANKA et al., 2021). Tendo em vista que os microRNAs (miRNAs) são importantes biomarcadores, eles podem ser utilizados para o diagnóstico e prognóstico de diferentes doenças (MIRZAEI et al., 2018). Na infecção causada pelo SARS-CoV-2, o uso de miRNAs para diagnóstico tem se mostrado promissor, sendo necessária a detecção e validação de miRNAs

específicos para a COVID-19 (GUTERRES et al., 2020). Portanto, o objetivo desse trabalho foi identificar miRNAs circulantes como possíveis biomarcadores de COVID-19.

METODOLOGIA:

Trata-se de um estudo analítico, observacional, caso-controle. Para formar o grupo caso, foram incluídos sujeitos de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos, com COVID-19, isto é, que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR), que estiveram internados no Hospital Estadual Sumaré ou no Hospital Municipal de Paulínia, com plasma coletado durante a internação.

Para formar o grupo controle, foram incluídos sujeitos de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos, sem COVID-19, isto é, que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 negativo no teste referência (RT-PCR), recrutados no campus de Campinas da UNICAMP, com plasma coletado durante o recrutamento.

Os miRNAs foram extraídos a partir de 200 µl dos plasmas previamente obtidos e armazenados a - 80ºC. A extração foi realizada, usando o *miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Cat No. 217184)*. As amostras foram armazenadas a - 80ºC até a construção da biblioteca.

A construção da biblioteca de miRNAs foi realizada a partir de 5 µl das amostras de miRNAs usando o *QIAseq® miRNA Library Kit (Qiagen, Cat No. 331502)*. Em seguida, as amostras foram enviadas ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) na UNICAMP. As bibliotecas de miRNAs foram sequenciadas, por Sequenciamento de Nova Geração (NGS), usando a plataforma *HiSeq 2500 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) (75 bp single-end reads)*.

A análise da expressão diferencial de miRNAs entre sujeitos com COVID-19 e sem COVID-19 foi realizada através do programa *GeneGlobe (Qiagen)*. Os miRNAs com alterações na expressão (*Fold-Regulation* (FR) ≥ 1,6 ou ≤ - 1,6) e $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CAAE 36041420.0.000.5404 e CAAE 31049320.7.1001.5404). Todos os sujeitos ou seus responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) permitindo sua participação no estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram incluídos 12 sujeitos no estudo, oito com COVID-19 (casos) e quatro sem COVID-19 (controles). Foi realizado o pareamento entre os sujeitos dos grupos caso e controle em relação ao sexo e a idade. A caracterização dos sujeitos se encontra no Quadro 1.

Identificação	Sexo	Idade (anos)	Etnia	Comorbidades
Sujeitos com COVID-19 (casos)				
#1	Feminino	47	NR	HAS e diabetes
#2	Masculino	58	NR	Nenhuma
#3	Feminino	69	NR	Nenhuma
#4	Masculino	73	NR	HAS
#5	Feminino	55	Caucasiana	HAS, diabetes, insuficiência cardíaca e DRC
#6	Masculino	59	Não-caucasiana	Nenhuma
#7	Feminino	68	Caucasiana	HAS, diabetes, hipotireoidismo e obesidade
#8	Masculino	74	Não-caucasiana	HAS, diabetes e DRC
Sujeitos sem COVID-19 (controles)				
#1	Feminino	45	Caucasiana	Nenhuma
#2	Masculino	56	Caucasiana	Nenhuma
#3	Feminino	73	Caucasiana	Arritmia
#4	Masculino	77	Caucasiana	IAM e AVC

Abreviaturas: NR (não relatado); HAS (hipertensão arterial sistêmica); DRC (doença renal crônica); IAM (infarto agudo do miocárdio); e AVC (acidente vascular cerebral).

Quadro 1 – Caracterização dos sujeitos com COVID-19 (casos) e sem COVID-19 (controles).

Foram encontrados 18 miRNAs que estão expressos diferentemente entre os grupos caso e controle. Há 13 miRNAs positivamente regulados e cinco miRNAs negativamente regulados nos casos. Esses resultados são apresentados na Tabela 1.

A Figura 1 apresenta a diferença na expressão dos miRNAs entre casos e controles. O eixo X contém o valor logarítmico de *Fold Change* (logFC), indicando a diferença de expressão gênica entre os casos e controles. O eixo Y se refere ao valor negativo do log do valor de P, sendo a mudança de expressão do miRNA. Cada ponto da figura representa um miRNA. Os miRNAs com diferença significativa na expressão entre os dois grupos estão indicados nas cores azul e vermelho. Em azul, os miRNAs negativamente regulados e, em vermelho, miRNAs positivamente regulados.

miRNA	FR	FC	Valor de P
	Positivamente regulados		
miR-6780b-3p	1,89	1,89	< 0,001
miR-6883-3p	1,81	1,81	< 0,001
miR-4769-5p	1,79	1,79	< 0,001
miR-6873-3p	1,79	1,79	< 0,001
miR-320b	1,78	1,78	0,001
miR-7111-3p	1,73	1,73	0,002
miR-4755-3p	1,72	1,72	< 0,001
miR-320c	1,69	1,69	0,003
miR-6511a-3p	1,68	1,68	0,003
miR-320d	1,67	1,67	0,002
miR-5187-3p	1,63	1,63	< 0,001
miR-4508	1,63	1,63	0,005
miR-4659a-5p	1,62	1,62	< 0,001
	Negativamente regulados		
miR-4433b-5p	-2,15	0,46	< 0,001
miR-16-2-3p	-1,97	0,51	< 0,001
miR-126-3p	-1,77	0,56	< 0,001
miR-150-5p	-1,65	0,61	0,004
miR-224-5p	-1,61	0,62	0,001

Abreviaturas: FR (*fold regulation*); FC (*fold change*), miRNA (microRNA).

Tabela 1 – miRNAs diferentemente expressos em sujeitos com COVID-19 (casos) comparados com aqueles sem COVID-19 (controles) (FR ≥ 1,6 ou FR ≤ - 1,6).

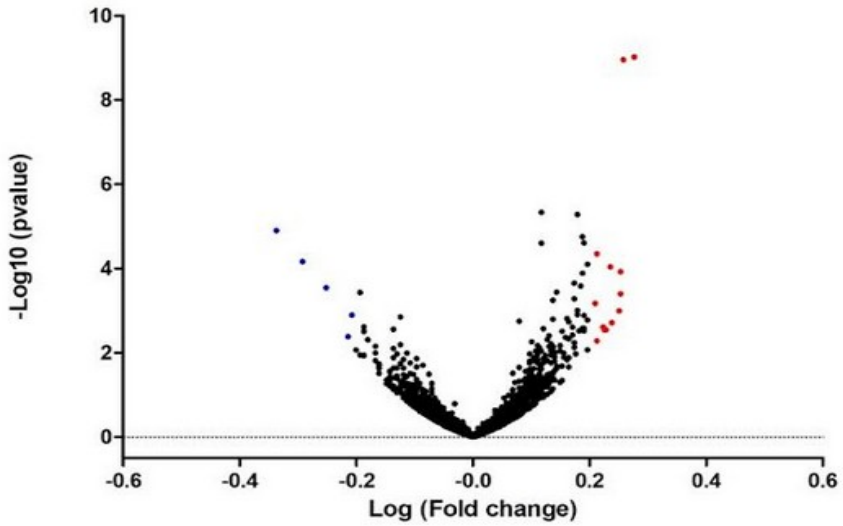

Figura 1 - Expressão diferencial de miRNAs entre sujeitos com COVID-19 (casos) e sem COVID-19 (controles).

CONCLUSÃO:

Os miRNAs diferentemente expressos entre sujeitos com COVID-19 e sem COVID-19, especialmente o miR-4433b-5p, são possíveis biomarcadores da doença causada pelo SARS-CoV-2, podendo estar relacionados com as vias de infecção do vírus. Estes achados devem ser validados em um número maior de sujeitos e pela técnica padrão ouro (RT-qPCR).

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [códigos 2021/12387-3 e 2021/04669-9] e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [código 001 e 88881.504454/2020-01] pelo apoio financeiro.

BIBLIOGRAFIA:

ANKA, A. U; TAHIR, M. I.; ABUBAKAR, S. D.; ALSABBAGH, M.; ZIAN, Z.; HAMEDIFAR, H.; SABZEVARI, A.; AZIZI, G. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 93, e12998, 2021.

MIRZAEI, H.; MOMENI, F.; SAADATPOUR, L.; SAHEBKAR, A.; GOODARZI, M.; MASOUDIFAR, A.; KOUHPAYEH, S.; SALEHI, H.; MIRZAEI, H. R.; JAAFARI, M. R. MicroRNA: Relevance to stroke diagnosis, prognosis, and therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, p. 856-865, 2018.

GUTERRES, A.; LIMA, C. H. DE A.; MIRANDA, R. L.; GADELHA, M. R. What is the potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in COVID-19? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104417, 2020.