



miR-185-5p COMO BIOMARCADOR DE GRAVIDADE DA DOENÇA DO CORONAVÍRUS 2019 (COVID-19)

Palavras-Chave: microRNAs, SARS-CoV-2, gravidade do paciente.

Autores(as):

CAROLINI MOTTA NERI [FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – UNICAMP];
MARÍLIA BERLOFA VISACRI [FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – USP];
ALINE DE SOUZA NICOLETTI [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS – UNICAMP];
CARLA REGINA S. C. 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 [LABORATÓRIO DE CARCINOGENESE UROGENITAL E IMUNOTERAPIA];
WAGNER J. FÁVARO [LABORATÓRIO DE CARCINOGENESE UROGENITAL E IMUNOTERAPIA];
JOSÉ LUIZ DA COSTA [FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – UNICAMP];
EDER DE CARVALHO PINCINATO [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS – UNICAMP];
Prof^a. Dr^a. PATRICIA MORIEL (orientadora) [FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – UNICAMP].

INTRODUÇÃO:

O coronavírus SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2) é o vírus causador da doença do coronavírus 2019 (COVID-19), que foi responsável por 6.948.764 mortes em todo o mundo até o dia 5 de julho de 2023¹. Os pacientes podem ou não apresentar resposta sintomática ao vírus, sendo que alguns evoluem o quadro com sintomas leves e outros podem progredir para um quadro grave da doença, com sintomas como síndrome respiratória aguda grave, disfunção múltipla de órgãos e até mesmo morte. Ainda, idosos e pessoas com comorbidades (como diabetes, obesidade, hipertensão, doenças cardiovasculares, entre outras) têm maior risco de desenvolvimento da forma grave da doença². Pacientes com as mesmas características clínicas podem evoluir de forma diferente

frente ao contato com o vírus da COVID-19. Uma possível explicação para esta variação pode estar relacionada à variação genética dos indivíduos, como a diferente expressão de microRNAs.

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de cadeia simples de RNA, formadas por aproximadamente 22 nucleotídeos não codificantes³ e podem ser encontrados em diversos fluidos biológicos, como urina, plasma, fluido lacrimal, saliva, leite materno, entre outros⁴. Devido a isso e também à sua expressão específica em diferentes tecidos e estados patológicos, estes vêm sendo alvo de investigações como possíveis biomarcadores de doenças⁵.

Um estudo analisando a expressão de microRNAs por sequenciamento de nova geração no plasma de pacientes com a doença do coronavírus 2019 (n=8). Os resultados obtidos mostraram que o miR-185-5p apresenta-se regulado negativamente em quadros graves/críticos quando comparado a pacientes que apresentaram quadros leves/moderados da COVID-19⁶. Baseado neste estudo, iremos validar este resultado em coorte maior e utilizando o método referência (RT-qPCR). Assim, o presente estudo objetivou validar o miR-185-5p como possível biomarcador de gravidade da COVID-19.

METODOLOGIA:

Caracterização dos pacientes e classificação da gravidade da doença

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

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos, com resultado positivo no teste referência para SARS-CoV-2 (reação em cadeia da polimerase em tempo real, RT-PCR), que estiveram internados no Hospital Estadual Sumaré Dr. Leandro Francheschini (HES), no Ambulatório que atende a comunidade da UNICAMP (CECOM) ou nas Unidades Básicas de Saúde de Paulínia. Os pacientes foram divididos em dois grupos, sendo eles aqueles que apresentaram quadro grave/crítico da COVID-19 (n=40) e aqueles que apresentaram quadro leve/moderado (n=45). Eles foram classificados quanto à idade, sexo, raça e comorbidades.

Para embasar a classificação da gravidade da COVID-19 apresentada pelos indivíduos, foram utilizados os critérios estabelecidos pelo NIH (*National Institutes of Health*)⁷. Os dados dos pacientes incluídos foram coletados a partir dos prontuários referentes à sua passagem pela unidade de saúde.

Extração e quantificação dos microRNAs

Os miRNAs foram extraídos dos plasmas previamente obtidos durante a infecção com o Sars-CoV-2. A extração foi realizada utilizando o *miRNeasy Serum/Plasma Kit* (Qiagen, Cat No. 217184), seguindo as instruções do fabricante.

Após a extração dos miRNAs, o próximo passo foi realizar a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando o *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (Applied Biosystems, Cat No./ID: A28007) e, por fim, a RT-PCR utilizando o *TaqMan™ Advanced miRNA Assays* (Applied Biosystems, Cat No./ID:A25576), usando a sonda específica para o hsa-miR-185-5p. Além disso, também foi realizada a RT-PCR do controle exógeno cel-miR-39 para normalização.

Por fim, as expressões relativas dos miRNAs foram obtidas através do método $2^{-\Delta CT}$, onde $\Delta CT = CT_{miR-185-5p \text{ paciente}} - CT_{cel-miR-39 \text{ paciente}}$.

Análise dos resultados

Para a análise estatística, foi utilizado o *Statistics Program for Social Science for Windows* (SPSS® 16.0, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). O nível de significância adotado para o estudo foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A tabela 1 abaixo mostra os dados demográficos e clínicos dos pacientes, caracterizando-os de acordo com sexo, idade, raça e comorbidades.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos.

		Pacientes leves e moderados (n=45)	Pacientes graves e críticos (n=40)	p
Idade	(Média ± SD)	42,0 ± 11,8	54,7 ± 14,2	0,002 ¹
Sexo	<i>Feminino</i>	25 (55,6%)	16 (40,0%)	0,3184 ²
	<i>Masculino</i>	20 (44,4%)	24 (60,0%)	
Comorbidades	<i>Não</i>	14 (66,7%)	7 (33,3%)	0,1464 ²
	<i>Sim</i>	31 (48,4%)	33 (51,6%)	

¹Teste de Mann-Whitney; ² Teste de Chi-square.

Ao analisar os valores de $2^{-\Delta CT}$ obtidos segundo a metodologia descrita anteriormente, observa-se que o hsa-miR-185-5p foi menos expresso em pacientes com o quadro grave/crítico quando comparado aos pacientes que manifestaram a doença em sua forma leve/moderada. Esses resultados encontram-se expressos na Figura 1.

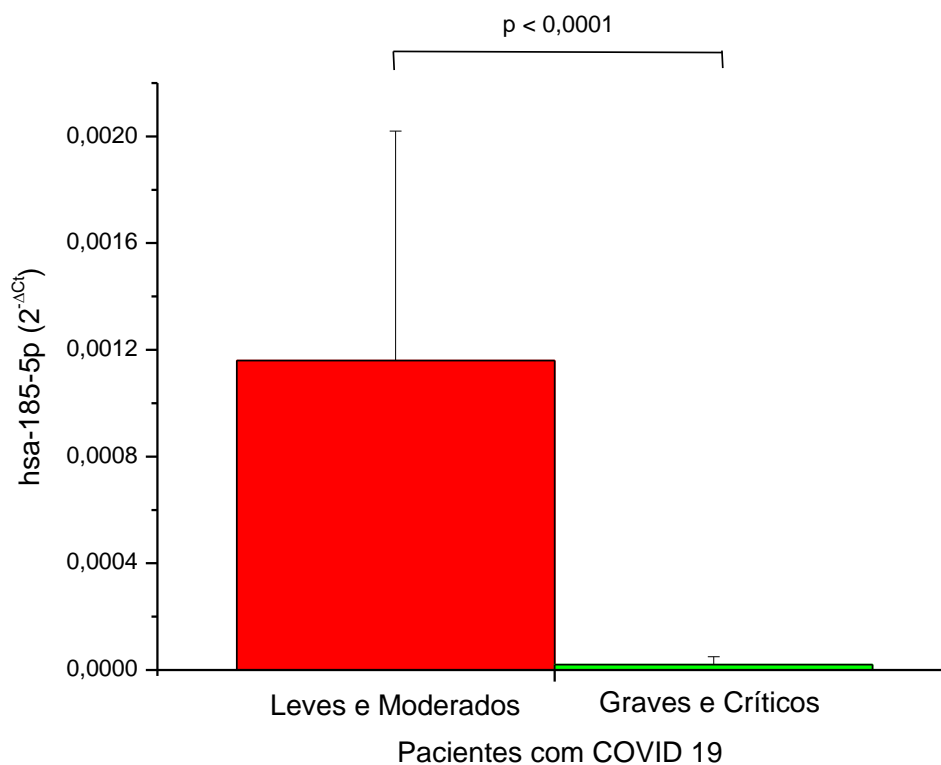


Figura 1. Expressões relativas do hsa-miR-185-5p no plasma dos pacientes. Teste de Mann-Whitney.

CONCLUSÕES:

Desta forma, pode-se concluir que o miR-185-5p é um potencial biomarcador de gravidade da doença do coronavírus 2019. Ademais, este microRNA pode ser um possível alvo para o desenvolvimento de terapias a serem utilizadas no tratamento da COVID-19 grave e crítica.

Agradecemos 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

1. WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard . p. <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 05/07/2023.
2. CDC. Symptoms of COVID-19. p. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>. 2022. Acesso em: 06/07/2023.
3. LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, n. 5543, p. 853-858, Oct 2001.
4. WEBER, J. A.; BAXTER, D. H.; ZHANG, S.; HUANG, D. Y. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56, n. 11, p. 1733-1741, Nov 2010.
5. WANG, K.; ZHANG, S.; MARZOLF, B.; TROISCH, P. et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, n. 11, p. 4402-4407, Mar 2009.
6. NICOLETTI, A. S., VISACRI, M. B., DA RONDA, C. R. D. S. C., VASCONCELOS, P. E. D. N. S., QUINTANILHA, J. C. F., et al. Differentially expressed plasmatic microRNAs in Brazilian patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19): preliminary results. *Molecular biology reports*, 49(7), 6931–6943. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07338-9>
7. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. Available at <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>. Acesso em 06/07/2023.